



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

Pamella Campos Silva

**Efeitos metabólicos e testicular da administração em longo prazo  
de diferentes dietas hiperlipídicas em ratos adultos**

Rio de Janeiro  
2013

Pamella Campos Silva

**Efeitos metabólicos e testicular da administração em longo prazo de diferentes dietas hiperlipídicas em ratos adultos**

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.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório

Coorientador: Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Rio de Janeiro

2013

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

S586 Silva, Pamela Campos.  
Efeitos metabólicos e testicular da administração em longo prazo de diferentes dietas hiperlipídicas em ratos adultos / Pamela Campos Silva. – 2013.  
60 f.

Orientadora: Bianca Martins Gregório.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Testículo – Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Ácidos graxos. 4. Ácidos graxos insaturados. 5. Dieta hiperlipídica. 6. Rato Wistar. I. Costa, Waldemar Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.681

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

---

Assinatura

---

Data

Pamella Campos Silva

**Efeitos metabólicos e testicular da administração em longo prazo de diferentes dietas hiperlipídicas em ratos adultos**

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 28 de agosto de 2013.

Orientadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Amorim de Moraes Nascimento  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Carla Braga Mano Gallo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha família, que sempre incentivou meu crescimento intelectual e profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, por proporcionar a existência e qualidade do curso e pelo incentivo ao progresso da ciência.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bianca Martins Gregório e ao meu co-orientador Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, exemplos de dedicação a profissão, pelos ensinamentos, auxílio e confiança, durante este período.

A amiga Angélica Furriel de Almeida da Silva pela lealdade, cumplicidade e conhecimento compartilhado.

Aos amigos do Laboratório de Estrutura e Ultra-estrutura da Unidade de Pesquisa Urogenital, pela cooperação e boa convivência.

Aos meus pais, Rose Mary Campos Vale Silva e Jorge Santos da Silva que sempre me apoiaram incondicionalmente e com amor e carinho me confortaram nos momentos difíceis em que meus ideais pareciam distantes.

Ao meu namorado, Diego César Ripper Mendes, pelo companheirismo, incentivo e paciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro na forma de Bolsa de mestrado.

A Deus, por tudo que foi citado acima.

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.  
Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança.

Albert Einstein

## RESUMO

SILVA, Pamella Campos. *Efeitos metabólicos e testicular da administração em longo prazo de diferentes dietas hiperlipídicas em ratos adultos*. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A obesidade e suas complicações metabólicas afetam o sistema endócrino e vários órgãos, tais como os testículos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ingestão de diferentes dietas hiperlipídicas (rica em ácidos graxos saturados e/ou poliinsaturados) na massa corporal, no metabolismo de carboidratos e na morfologia testicular em ratos aos sete meses de idade. 39 ratos machos Wistar (três meses de idade) foram divididos em 4 grupos: SC (*standard chow*; n = 9), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados; n = 10), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados; n = 10), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados; n = 10). A massa corporal foi monitorada semanalmente, até o final do experimento. Ao sacrifício (sete meses de idade), amostras de sangue foram coletadas e os testículos foram dissecados, pesados e processados para análises histomorfométrica, imunohistoquímica e bioquímica. Os depósitos de gordura genital foram dissecados e pesados. Os dados foram analisados por ANOVA e pós-teste de Bonferroni, considerando  $p < 0,05$ . As dietas hiperlipídicas promoveram aumento na massa corporal dos animais quando comparado ao grupo SC ( $p < 0,0001$ ). Corroborando com esse resultado, os depósitos de gordura genital dos grupos hiperlipídicos (HF-S, HF-P e HF-SP) apresentaram aumento de 67%, 91% e 90% ( $p = 0,0004$ ) em relação ao grupo SC, respectivamente. Quanto aos parâmetros séricos, os animais dos grupos HF-S e HF-SP apresentaram hiperglicemia ( $p = 0,0060$ ), hiperinsulinemia ( $p = 0,0030$ ), hipercolesterolemia ( $p = 0,0021$ ). Todos os grupos hiperlipídicos apresentaram hiperleptinemia ( $p = 0,0019$ ). Os níveis de triglicerídeos e testosterona não diferiram entre os grupos. Em relação ao testículo, os grupos SC, HF-P e HF-SP apresentaram maior altura do epitélio seminífero quando comparado ao grupo HF-S ( $p = 0,0003$ ). No que diz respeito ao diâmetro dos túbulos seminíferos, verificou-se uma diminuição no grupo HF-SP, em comparação ao grupo SC ( $p = 0,0010$ ). A proliferação celular foi reduzida no grupo HF-S comparado ao grupo SC ( $p = 0,0450$ ). Não foram observadas diferenças na massa testicular e na concentração de colágeno. Diante do exposto, a administração de dieta HF, independentemente da qualidade do lipídio, promoveu o sobrepeso em ratos adultos. No entanto, a dieta rica em ácidos graxos saturados (banha de porco) promoveu alterações no metabolismo dos carboidratos e na morfologia testicular, com redução no diâmetro dos túbulos seminíferos, na altura do epitélio seminífero e na proliferação das células da linhagem espermatogênica. Estas alterações estão possivelmente relacionadas à distúrbios na espermatogênese.

Palavras-chave: Ácidos graxos poliinsaturados. Ácidos graxos saturados. Dietas hiperlipídicas. Obesidade. Rato Wistar. Testículos.

## ABSTRACT

Obesity and its metabolic complications affects the endocrine system and multiple organs such as the testes. This study aimed to evaluate the effects of different high-fat diets (rich in saturated and / or polyunsaturated fatty acids) on body mass, carbohydrate metabolism and testicular morphology in rats at seven months old. 39 male Wistar rats (three months old) were divided into four groups: SC (standard chow, n = 9), HF-S (high fat diet rich in saturated fatty acids, n = 10), HF-P (high fat diet rich in polyunsaturated fatty acids, n = 10), HF-SP (high fat diet rich in saturated and polyunsaturated fatty acids, n = 10). Body mass was monitored weekly until the end of the experiment. At the sacrifice (seven months old), blood samples were collected and the testes were dissected, weighed and processed for histomorphometrical, immunohistochemical and biochemical analysis. Genital fat deposits were dissected and weighed. Data were analyzed by one-way ANOVA and Bonferroni post hoc test, considering  $p < 0.05$ . Different high-fat diets promoted an increased in body mass compared with the SC group ( $p < 0.0001$ ). Accordingly, the genital fat deposits were higher in the high-fat groups (HF-S, HF-P, HF-SP) than in the SC group, showing an increase of 67%, 91% and 90%, respectively ( $p = 0.0004$ ). Regarding serum parameters, the animals in the HF-S and HF-SP groups presented hyperglycemia ( $p = 0.0060$ ), hyperinsulinemia ( $p = 0.0030$ ), hypercholesterolemia ( $p = 0.0021$ ). All of the hyperlipidemic groups showed hyperleptinemia ( $p = 0.0019$ ). Serum triglyceride and serum testosterone levels did not differ among the groups. Concerning the testis, the SC, HF-P and HF-SP groups showed an increase on seminiferous epithelium height compared with the HF-S group ( $p = 0.0003$ ). As the seminiferous tubule diameter, there was a decrease in the HF-SP group in comparison with the SC group ( $p = 0.0010$ ). Cell proliferation was reduced in HF-S group compared with the SC group ( $p = 0.0450$ ). Among the groups, no difference was observed in the testicular mass and in collagen level. In conclusion, the high fat diet administration, independent of the lipid quality, promotes overweight. Diet rich in saturated fatty acids (lard) alters the carbohydrate metabolism and the testicular morphology with reductions of seminiferous epithelium height, seminiferous tubule diameter and cell proliferation which could be related to a disturbance of spermatogenesis.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids. Saturated fatty acids. High-fat diets. Obesity. Wistar rats. Testes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química do ácido graxo saturado.....	15
Figura 2 –	Estrutura química do ácido graxo poliinsaturado.....	16
Figura 3 –	Corte transversal do testículo mostrando alguns lóbulos testiculares com os túbulos seminíferos.....	20
Figura 4 –	Corte esquemático ilustrando uma porção do túbulo seminífero e do tecido conjuntivo frouxo.....	21
Figura 5 –	Esquema geral do aparelho reprodutor masculino, com ênfase na estrutura testicular.....	22
Figura 6 –	Esquema ilustrando a espermatogênese.....	25
Tabela 1 –	Composição das dietas experimentais. Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo a recomendação da AIN-93M.....	30
Figura 7 –	Dissecção dos depósitos de gordura genital e dos testículos.....	31
Figura 8 –	Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “ <i>straight</i> ” (destacada pelo círculo azul) para a mensuração do diâmetro do túbulo seminífero (100X), a partir do software Image J®.....	34
Figura 9 –	Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “ <i>straight</i> ” (destacada pelo círculo azul) para a mensuração da altura do epitélio seminífero (200X), a partir do software Image J®.....	35
Figura 10 –	Imagem ilustrando a aplicabilidade das ferramentas “ <i>cell counter</i> ” e “ <i>freehand selections</i> ” (destacada pelo círculo azul) para a mensuração da proliferação celular (400X), utilizando o software Image J®.....	36
Gráfico 1 –	Evolução da massa corporal dos animais dos três aos sete meses de idade.....	38
Gráfico 2 –	Depósito de gordura epididimária dos diferentes grupos aos sete meses de idade.....	39
Tabela 2 –	Metabolismo de carboidratos (valores de glicose e insulina), perfil lipídico (valores de triglicerídeos e colesterol total), níveis de leptina e testosterona, e parâmetros testiculares.....	41
Figura 11 –	Fotomicrografias referentes ao diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero nos animais aos sete meses de	

	idade (200x).....	42
Figura 12 –	Fotomicrografias referentes à proliferação das células da linhagem espermatogênica nos animais aos sete meses de idade (400x).....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1N –	Haploide
2N –	Diploide
4N –	Tetraploide
AGPI –	Ácido graxo poliinsaturado
AGS –	Ácido graxo saturado
AIN –	<i>American Institute of Nutrition</i>
ALA –	Ácido alfa-linolênico
ANOVA –	<i>Analysis of variance</i>
CEUA –	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA –	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB –	<i>Diaminobenzidine</i>
DHA –	Ácido docosahexaenóico
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DP –	Desvio padrão
ELISA –	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPA –	Ácido eicosapentaenoico
FSH –	Hormônio folículo estimulante
HDL –	<i>High Density Lipoproteins</i>
HF –	<i>High-fat</i>
HF-P –	Dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados
HF-S –	Dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados
HF-SP –	Dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados
IBRAG –	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

IMC –	Índice de massa corporal
LDL –	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LH –	Hormônio luteinizante
n-3 –	Ômega 3
n-6 –	Ômega 6
OMS –	Organização Mundial de Saúde
PBS/BSA-	<i>Phosphate Buffered Saline/ Bovine Serum Albumin</i>
PCNA –	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
RPM –	Rotações por minuto
SC –	<i>Standard chow</i>
SOCS3 –	Supressor de sinalização de citocina 3
WHO –	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
1.1	<b>Ácidos graxos</b> .....	14
1.2	<b>Tecido adiposo e leptina</b> .....	17
1.3	<b>Morfofisiologia testicular</b> .....	19
1.4	<b>Espermatogênese</b> .....	23
1.5	<b>Lipídeos e testículo</b> .....	26
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
2.1	<b>Geral</b> .....	28
2.2	<b>Específicos</b> .....	28
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	29
3.1	<b>Animais e dieta</b> .....	29
3.2	<b>Biometria e ingestão alimentar dos animais</b> .....	30
3.3	<b>Morte</b> .....	31
3.4	<b>Bioquímica sérica e níveis hormonais</b> .....	32
3.5	<b>Imunohistoquímica do testículo</b> .....	32
3.6	<b>Testículo: estrutura e quantificação</b> .....	33
3.7	<b>Análise bioquímica do testículo</b> .....	37
3.8	<b>Análise estatística</b> .....	37
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<b>Ingestão alimentar e massa corporal</b> .....	38
4.2	<b>Depósitos de gordura genital</b> .....	39
4.3	<b>Metabolismo de carboidratos (valores de glicose e insulina)</b> .....	40
4.4	<b>Perfil lipídico, níveis de leptina e testosterona</b> .....	40
4.5	<b>Parâmetros testiculares</b> .....	40
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	44
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
	<b>ANEXO - Comitê de ética em pesquisa</b> .....	60

## INTRODUÇÃO

Neste novo milênio, a obesidade e suas comorbidades associadas atingem proporções pandêmicas no mundo ocidental (1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de meio bilhão de adultos são obesos, e cerca de três milhões de pessoas morrem como resultado da obesidade. Só nos Estados Unidos, entre 2009 e 2010, a obesidade ocorreu em 35,7% dos adultos e aproximadamente 17% dos jovens, com menos de 20 anos de idade. A prevalência da obesidade não diferiu entre homens e mulheres (2, 3). O Brasil também é um dos países afetados pela obesidade. Em 2008, 51,7% da população total apresentava-se com sobrepeso (índice de massa corporal acima de 25 kg/m<sup>2</sup>), enquanto que 18,8% já eram considerados obesos (índice de massa corporal superior a 30 kg/m<sup>2</sup>) (2).

A ingestão de lipídeos em excesso, independentemente da qualidade da gordura, desencadeia a obesidade (4). A obesidade é acompanhada por maior incidência de resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia. Em conjunto, essa constelação de anormalidades metabólicas é chamada de síndrome metabólica (5). A síndrome metabólica é prevalente em países com estilos de vida ocidental, afetando em torno de 34-39% da população adulta nos EUA (6).

Nos últimos anos, vários estudos mostraram uma relação inversa entre o índice de massa corporal (IMC) e os parâmetros reprodutivos masculinos, embora o mecanismo pelo qual a fertilidade seja afetada ainda esteja obscuro (7). O lipídio presente na dieta afeta o padrão de organização da membrana plasmática nos diferentes tecidos. Nos testículos, altera a disponibilidade de receptores de gonadotrofinas, que são hormônios protéicos, como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), comprometendo assim a produção de testosterona pelas células de Leydig (intersticiais) e a espermatogênese pelas células dos túbulos seminíferos, respectivamente (8). Porém, existem poucos dados relacionando os efeitos dos ácidos graxos saturados (AGSs) e poliinsaturados (AGPIs) sobre a morfologia testicular.

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Ácidos graxos

Recentemente, os padrões dietéticos sofreram diversas transformações, sendo a mais recorrente a mudança no tipo de gordura consumida, com aumento no consumo de gordura saturada em detrimento da gordura poliinsaturada (9, 10). Esta mudança na composição da dieta pode ter um grande efeito sobre a organização da membrana plasmática nos tecidos humanos e conseqüentemente afetar o metabolismo e a saúde (11).

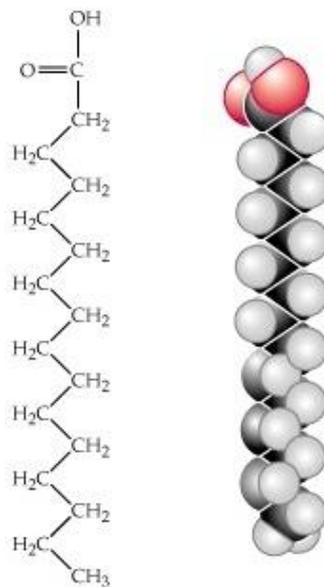
Os ácidos graxos são componentes substanciais dos lipídios, um dos três macronutrientes principais, junto com proteínas e carboidratos (12). Também estão presentes nas membranas celulares, como componentes dos fosfolipídios, sendo importantes para a sua fluidez e a sua funcionalidade. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com uma típica estrutura RCOOH, que contém uma extremidade metil, uma cadeia de hidrocarboneto (R) e um grupamento terminal carboxílico (13).

Os ácidos graxos diferem no tamanho da cadeia carbônica e no número de duplas ligações existentes entre os átomos de carbono. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica, esses podem ser classificados em ácidos graxos de cadeia curta (de 2 a 4 átomos de carbono), cadeia média (de 6 a 10 átomos de carbono) e cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono). Já quanto à presença de insaturações, os ácidos graxos são classificados, de acordo com sua estrutura, em ácidos graxos saturados (sem dupla ligação na molécula), monoinsaturados (uma dupla ligação na molécula) ou poliinsaturados (duas ou mais duplas ligações na molécula) (14).

Em tecidos animal e vegetal, os ácidos graxos mais abundantes apresentam de 16 a 18 átomos de carbono, por exemplo, os ácidos esteárico, palmítico, oleico e linoléico. Os ácidos graxos de origem animal possuem de 12-24 átomos de carbono em sua cadeia, com 0-6 duplas ligações. No entanto, os ácidos graxos contendo menos de 14 e mais de 22 átomos de carbono estão presentes apenas em pequenas concentrações. Aproximadamente metade dos ácidos graxos de origem vegetal e animal são insaturados e contêm de 1-6 duplas ligações (13).

Os AGSs são caracterizados por apresentarem cadeia retilínea com um número variável de átomos de carbono (cadeias de 8 a 18 átomos de carbono), e apresentam maior ponto de fusão quando comparados aos ácidos graxos insaturados (14) (Figura 1). O ponto de fusão dos ácidos graxos aumenta proporcionalmente com o tamanho da cadeia de hidrocarboneto e diminui com o aumento do número de duplas ligações (13).

Figura 1: Estrutura química do ácido graxo saturado.



Legenda: Ausência de dupla ligação na cadeia carbônica.  
 Fonte: Adaptado de Castro & Cardoso, 2010.

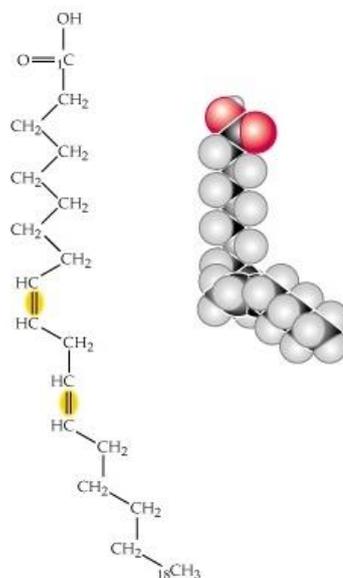
Os AGSs são metabolizados pelas células por meio da beta-oxidação, um processo que permite a produção mitocondrial de grandes quantidades de acetil coenzima A (acetil-CoA), que entra no ciclo do ácido cítrico. No fígado, a acetil-CoA citoplasmática é a precursora para a síntese de novos ácidos graxos saturados e colesterol, que, em conjunto com os triglicerídeos, são utilizados para a construção de VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa). Logo, uma dieta rica em AGS contribui para aumentar a produção hepática de lipoproteínas (15).

Os AGSs são normalmente encontrados na forma sólida (gordura) e em produtos de origem animal como banha de porco e manteiga (16). Também estão presentes em fontes como o óleo de coco, manteiga de cacau, manteiga de karité

(17). O aumento na ingestão de gordura saturada, e também colesterol, aumenta as lipoproteínas de baixa densidade no sangue (LDL ou “mau” colesterol), que está relacionado com o aumento da doença cardíaca coronariana, diabetes, mortalidade e alterações testiculares (18-20). Ademais, pode potencializar a peroxidação lipídica, e assim danificar macromoléculas (enzimas, DNA), estimulando acentuadamente a proliferação celular em diversos tecidos (21).

Os AGPIs (n-3 e n-6), são ácidos graxos essenciais ao organismo, devendo, portanto, serem obtidos a partir da alimentação. A estrutura química de um AGPI é apresentada na figura 2. O ácido alfa-linolênico (ALA), encontrado principalmente em peixes marinhos e em produtos de origem vegetal, como o óleo de canola, é precursor do eicosapentaenóico-EPA (22) e do docosahexaenóico-DHA (23), em seres humanos. Ele pode ser convertido em EPA e DHA pela ação da delta-6 dessaturase/alongase e delta-5 dessaturase/alongase, respectivamente. No entanto, nos seres humanos, a eficiência da conversão é muito limitada (24, 25). Nesse contexto, o aumento da ingestão de peixes marinhos (salmão, arenque, anchova, atum) e óleo de peixe é recomendado para a obtenção de EPA e DHA, diretamente a partir da dieta. Recomendações nutricionais de 250 mg/dia de EPA/DHA foram estabelecidas para as sociedades ocidentais (26).

Figura 2: Estrutura química do ácido graxo poliinsaturado.



Legenda: presença de dupla ligação na cadeia carbônica.  
Fonte: Adaptado de Castro & Cardoso, 2010.

Os AGPIs encontram-se geralmente líquido à temperatura ambiente, presentes em óleos de origem vegetal, como os óleos de canola, soja e girassol. Encontram-se também em outras fontes de origem vegetal, tais como nozes, semente de linhaça e mostarda, assim como em peixes, crustáceos e moluscos (27).

Os AGPIs da série n-3 (ácidos  $\alpha$ -linolênico-ALA, eicosapentaenóico-EPA e docosahexaenóico-DHA) são considerados antiinflamatórios (28), pois atuam na redução da inflamação no sangue e no tecido adiposo branco (29), melhorando o metabolismo lipídico (30) e diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (31). Segundo Tvrzicka (2011), a ingestão de gordura poliinsaturada auxilia na diminuição da lipogênese e de lipoproteínas de baixa densidade no sangue (LDL) (13). Ademais, alguns estudos apontam que esse tipo de ácido graxo pode melhorar a função testicular. No estudo de Gromadzka-Ostrowska (2002), verificou-se que a dieta à base de óleo de canola estimulou a função testicular em ratos, devido ao elevado nível de testosterona encontrado no soro (32).

Os ácidos graxos encontram-se armazenados nos adipócitos, sob a forma de triglicerídios (três moléculas de ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol) (14). Os adipócitos são células que armazenam lipídios e fazem parte do tecido adiposo. Alguns trabalhos apontam que tanto dietas ricas em AGS, quanto em AGPI podem elevar a massa corporal (33). Hoje é sabido que o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, conforme elucidaremos abaixo.

## 1.2 Tecido adiposo e leptina

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo frouxo estruturado em lóbulos de adipócitos, rodeado por uma rica rede de capilar e nervos (34). O tecido adiposo tem como função primordial servir como depósito de energia, sob a forma de triglicerídeos que se encontram acumulados nos adipócitos. Além disso, ainda pode atuar como isolante térmico, auxiliando na manutenção da temperatura corporal e como amortecedor, protegendo contra choques mecânicos.

Dados atuais da literatura ainda o consideram como o maior órgão endócrino no organismo humano, o qual secreta adipocinas que influenciam o perfil metabólico e o processo inflamatório (35). As adipocinas têm um papel chave na regulação do

metabolismo sistêmico. A produção desregulada de adipocinas, devido a disfunção do tecido adiposo branco e o excesso de adiposidade, pode contribuir para a patogênese da obesidade e resistência à insulina (36) e para a inflamação crônica associada à síndrome metabólica (37).

Em 1994, a leptina foi a primeira adipocina a ser caracterizada, sendo produzida principalmente pelo tecido adiposo branco (38). Porém esta não é a única fonte do hormônio, órgãos como ovários e testículos podem produzi-la em pequenas quantidades (39).

A leptina é o hormônio que está envolvido na regulação da massa corporal. Age no hipotálamo para reduzir a ingestão alimentar e aumentar a utilização de energia, sendo os seus níveis relacionados diretamente com a massa de gordura corporal (20). No obeso existem elevadas concentrações de leptina, devido ao aumento da adiposidade, onde esta não consegue exercer o seu papel na regulação de controle alimentar (40). Esse paradoxo pode ser explicado, em parte, pela resistência à leptina através de um aumento dos níveis de supressor de sinalização da citocina 3 (SOCS3) - um inibidor de sinalização da leptina (41).

É sabido que a leptina atua no metabolismo da gordura, com efeito direto no metabolismo da glicose. De modo que a leptina inibe a biossíntese e a secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas (42), o que indiretamente afeta o metabolismo da glicose. Portanto, foi sugerido que o aumento da leptina pode ter um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina em humanos (43).

Além das suas ações metabólicas, sabe-se que receptores de leptina estão presentes no testículo (44, 45). Isso constitui a base para que a leptina também exerça papel fundamental na função gonadal e na reprodução (46). A leptina atua como sinalizador metabólico para o sistema reprodutivo, informando que as reservas energéticas e de gordura estão disponíveis para a demanda exigida na reprodução (47, 48). Apesar de muitos trabalhos mostrarem que a leptina apresenta um papel importante na reprodução, os mecanismos pelos quais a leptina regula a reprodução ainda não foram esclarecidos (49).

Nos testículos ocorrem interações entre a leptina e a testosterona. A avaliação do efeito testicular da leptina revela sua capacidade em inibir a secreção de testosterona. Alguns estudos relatam que em homens obesos a leptina pode desempenhar um papel na diminuição da testosterona implicando o hipogonadismo (50, 51). O tratamento de doentes com deficiência de leptina, através da

administração da mesma, reduz a obesidade mórbida, o hipogonadismo e o diabetes mellitus tipo 2 (52). Porém, a ausência de resposta à administração de leptina, designado de resistência à leptina, é muitas vezes observada em pacientes obesos (53).

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 (54). Dados do Estudo de envelhecimento masculino em Massachusetts mostraram que níveis mais baixos de testosterona total foram preditivos ao desenvolvimento da síndrome metabólica (55). Em contraste, outros dados sugerem que a síndrome metabólica é um fator de risco independente do hipogonadismo em homens de meia-idade (56), e que a deficiência androgênica parece ser um marcador para a síndrome metabólica, e não a causa (57). Sendo assim, os dados disponíveis sugerem que hipogonadismo é um marcador precoce de perturbações no metabolismo da insulina e da glicose, que pode evoluir para a síndrome metabólica.

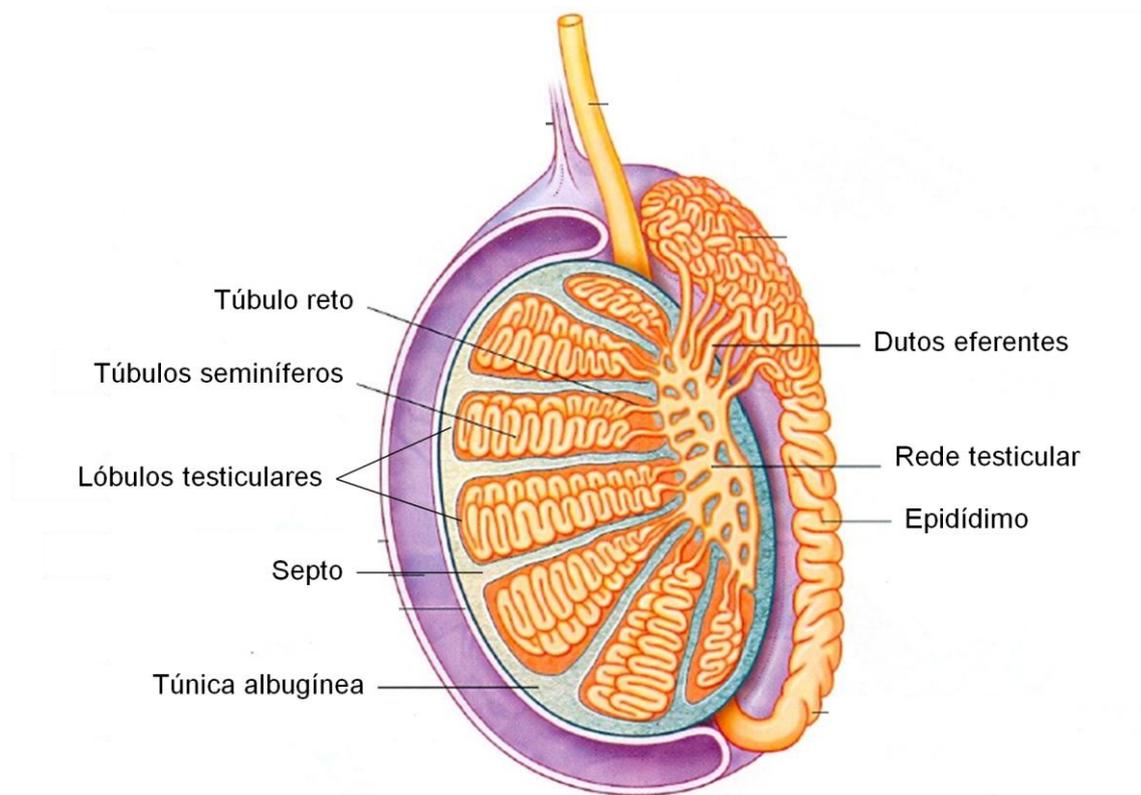
### 1.3 Morfofisiologia testicular

Os testículos são órgãos pares localizados no saco escrotal, fora da cavidade abdominal, apresentando funções exócrina e endócrina (58). Esta localização possibilita a manutenção dos testículos a uma temperatura de 2 a 3°C abaixo da temperatura corporal, afim de facilitar a espermatogênese. Dados existentes na literatura mostram que a temperatura de 34-35°C é essencial para a eficácia da espermatogênese (59). O volume dos testículos, palpado clinicamente, está relacionado à atividade funcional da espermatogênese, de modo que durante a puberdade esse volume alcança maior proporcionalidade (60).

Histologicamente, é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, denominada túnica albugínea, que emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, que o divide em 250 a 300 compartimentos piramidais, intercomunicantes, que constituem os lóbulos do testículo (59, 61) (Figura 3). Cada lóbulo é ocupado por um a quatro túbulos seminíferos, que se alojam como novelos dentro de um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos, canais linfáticos,

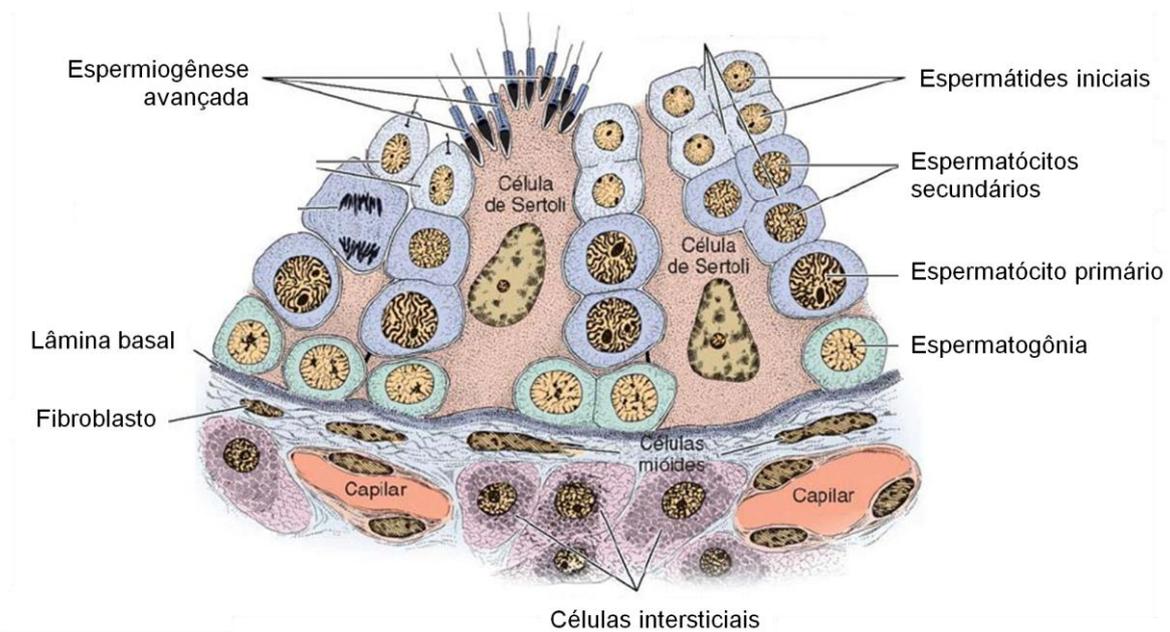
nervos, células intersticiais (células de Leydig) produtoras de andrógenos testiculares e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (58, 62) (Figura 4). As células de Leydig sintetizam testosterona e estradiol sob o estímulo do hormônio luteinizante (LH), secretado pela hipófise (63), e ocupam a maior parte do espaço entre os túbulos seminíferos.

Figura 3. Corte transversal do testículo mostrando alguns lóbulos testiculares com os túbulos seminíferos (local de produção dos espermatozóides).



Legenda: Sequencialmente, os espermatozóides armazenam-se no epidídimo.

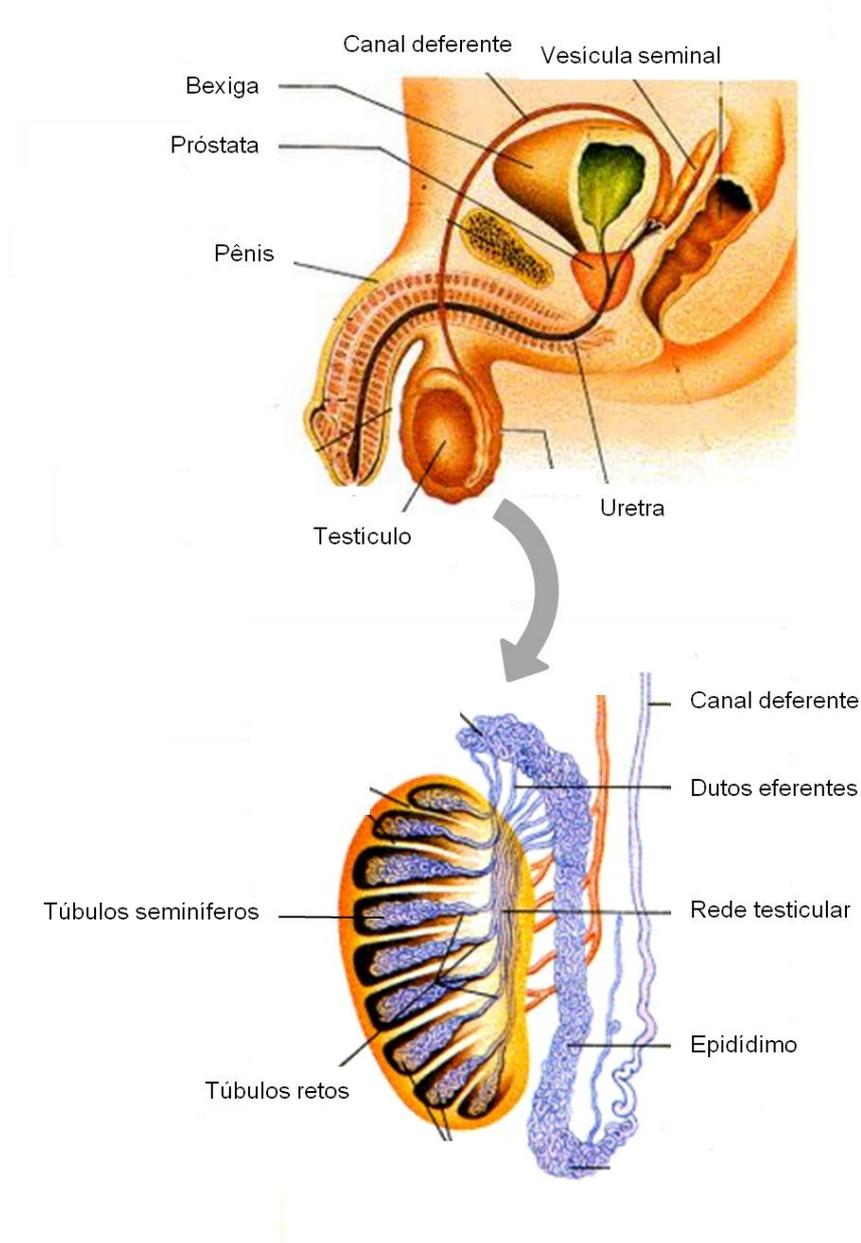
Figura 4. Corte esquemático ilustrando uma porção do túbulo seminífero (contendo células da linhagem espermatogênica e células de Sertoli) e do tecido conjuntivo frouxo.



Fonte: Adaptado de Junqueira & Carneiro, 2008.

Os túbulos seminíferos são responsáveis pela produção das células reprodutoras masculinas, os espermatozoides que se dirigem para curtos ductos, denominados túbulos retos, os quais unem os túbulos seminíferos à rede testicular, constituída por um sistema de canais altamente anastomosados. Os espermatozoides saem da rede testicular através de dez a vinte tubos chamados de dutos eferentes, que se fundem com o epidídimo (64) (Figura 5).

Figura 5. Esquema geral do aparelho reprodutor masculino, com ênfase na estrutura testicular.



Os túbulos seminíferos são ocós, altamente contorcidos com 30-70 cm de comprimento e 150-250  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Em cada testículo estão presentes cerca de 1000 túbulos seminíferos, com um comprimento total de quase 0,5 Km (61). O túbulo seminífero consiste em um lúmen central revestido por um epitélio especializado contendo duas populações distintas de células: as células de Sertoli e as células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos e

espermátides) (Figura 4). As células de Sertoli atuam na regulação endócrina das gonadotrofinas hipofisárias, no processo de espermiogênese e como barreira hematotesticular (65).

O epitélio seminífero é circundado por uma lâmina basal e por uma bainha de tecido conjuntivo, formada principalmente por delicados feixes entrelaçados de fibras de colágeno tipo I, várias camadas de fibroblastos e células mióides contráteis, que são responsáveis pela movimentação do fluido e propulsão de espermatozóides através do lume tubular (58). O lume tubular contém fluido secretado pelas células de Sertoli e espermatozóides recém-espermiados (62).

O testículo ainda pode ser dividido funcionalmente em dois compartimentos: o compartimento intertubular ou intersticial e o compartimento tubular, constituído de túbulos seminíferos (58). Sabe-se que o compartimento tubular representa a maior parte do testículo, preenchendo de 70% a 90% do parênquima testicular na maioria dos mamíferos estudados (66, 67).

#### 1.4 Espermatogênese

As células da linhagem espermatogênica, presentes nos túbulos seminíferos, são responsáveis pela espermatogênese, que consiste na produção de espermatozóides. Todo o processo de produção do espermatozóide ocorre ao longo de aproximadamente 10 semanas (68). O processo espermatogênico pode ser dividido didaticamente em três fases, de acordo com as diferentes características morfológicas e funcionais (58, 69) (Figura 6):

##### (a) Fase proliferativa

O processo de espermatogênese inicia-se com uma célula germinativa primitiva, a espermatogônia, que apresenta 46 cromossomos e 4N de DNA, e está situada próxima a lâmina basal do epitélio. Durante a puberdade as espermatogônias começam a se dividir por mitose e a produzirem sucessivas gerações de células. Estas células-filhas podem seguir dois caminhos: continuar se dividindo, mantendo-se como células-tronco de outras espermatogônias, sendo estas chamadas de espermatogônias de tipo A, ou podem se diferenciar durante sucessivos ciclos de divisão para se tornarem espermatogônias de tipo B. As

espermatogônias de tipo B são células progenitoras que se diferenciam nas maiores células da linhagem espermatogênica, os espermatócitos primários, que apresentam 46 cromossomos e 4N de DNA.

(b) Fase meiótica

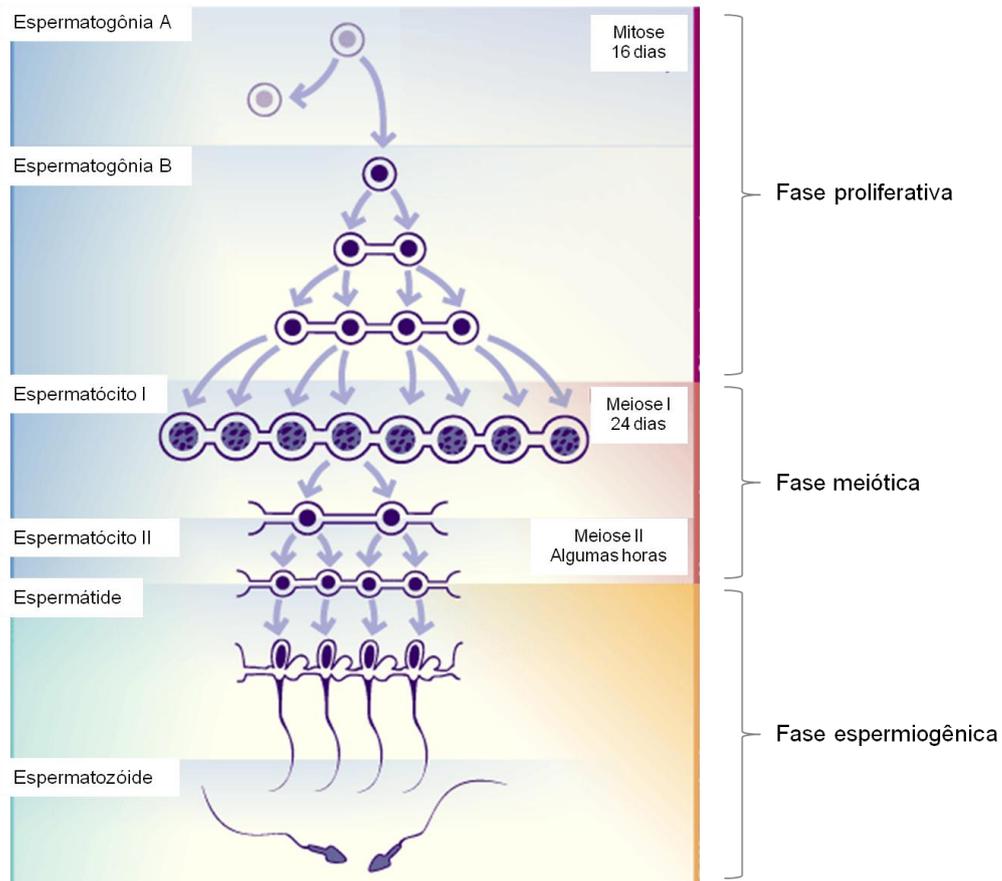
Os espermatócitos primários entram na primeira divisão meiótica, originando duas células menores chamadas de espermatócitos secundários, que possuem 23 cromossomos e 2N de DNA. Esses entram na segunda divisão meiótica, resultando em duas células, as espermatídes, que contêm 23 cromossomos e 1N de DNA (haploide).

(c) Fase de diferenciação ou espermiogênica

As espermatídes arredondadas passam por drásticas alterações morfológicas e funcionais, como a formação do acrossoma e do flagelo, e a condensação nuclear, resultando em uma célula altamente especializada, o espermatozóide maduro.

As células germinativas não estão organizadas ao acaso e sim em condições celulares distintas, denominadas estádios (66, 70). À medida que as células da linhagem espermatogênica são diferenciadas, suas sucessoras deslocam-se em direção ao lúmen do túbulo seminífero. Desta maneira, os espermatozoides ao serem formados são projetados para o lúmen, seguindo em direção aos túbulos retos (71). Para que o processo espermatogênico ocorra de maneira satisfatória é necessária a integridade funcional da membrana basal (72), como também a interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli e células de Leydig (66, 73-75).

Figura 6. Esquema ilustrando a espermatogênese (fase proliferativa, fase meiótica e fase espermiogênica).



## 1.5 Lipídeos e testículo

Os AGPIs de cadeia longa são um dos principais componentes dos fosfolípidos inerentes às membranas celulares e contribuem para sua fluidez e flexibilidade (76). O colesterol também faz parte das membranas animais. A fluidez da membrana é maior quando as concentrações de colesterol são mais baixas (77). A composição dos ácidos graxos presentes nas membranas afetam suas propriedades físicas, influenciando assim a conformação e função das proteínas ligadas à membrana (78, 79).

Em mamíferos, os AGPIs biologicamente importantes incluem o ácido docosahexaenóico [DHA; 22:06 (n-3)], que é sintetizado a partir do ácido graxo essencial  $\alpha$ -linolênico [ALA; 18:3 (n-3)] e o ácido araquidónico [AA; 20:4 (n-6)], que é derivado do ácido linoleico [LA; 18:2 (n-6)] (80, 81). Essas conversões ocorrem por intermédio de alternadas etapas de alongamento e dessaturação (82).

As membranas plasmáticas das células testiculares são ricas em AGPIs, com predominância de diferentes ácidos graxos, dependendo da espécie. O testículo de rato tem um elevado teor de ácido docosapentaenóico [DPA; 22:05 (n-6)] (83, 84), enquanto que ácido docosahexaenóico [DHA; 22:06 (n-3)] é predominante no testículo humano (85) e de macaco (86).

A maturação dos testículos durante a puberdade, em mamíferos, aumenta a proporção de AGPIs de cadeia longa nas membranas plasmáticas dos testículos, como mostrado em ratos (87), javalis (88), touros (89), macacos (90), e humanos (91). Os maiores níveis de AGPIs entre os diferentes tipos de células testiculares (células de Leydig, células de Sertoli e as células germinativas) foram encontrados nas células germinativas (92), que não possuem requisitos enzimáticos para uma eficiente síntese do mesmo, dependendo, portanto, da sua captação (82, 93). As células de Sertoli parecem atuar na conversão dos ácidos graxos essenciais presentes na dieta em ácido docosapentaenóico [DPA; 22:05 (n-6)] e ácido docosahexaenóico [DHA 22:06 (n-3)] (94). Consequentemente, um transporte de AGPIs das células de Sertoli para as células germinativas, foi postulado (82). Embora os mecanismos anteriormente mencionados sejam elusivos, os AGPIs são aparentemente essenciais para a fertilidade masculina (95, 96).

Como os AGPIs são considerados saudáveis, é crescente o número de indivíduos que os consomem em demasia, o que pode interferir na homeostase. As proporções de diferentes AGPIs nas membranas celulares refletem as quantidades consumidas na dieta (97). Descobertas experimentais sugerem a possibilidade de que AGPI podem diferencialmente, afetar as respostas celulares através de alterações na fluidez da membrana e na característica dos receptores (98).

O testículo é um órgão que apresenta um peculiar metabolismo do ácido graxo. Apesar de ser rico em AGPIs, o testículo é continuamente subtraído desses ácidos graxos, à medida que os espermatozoides são transportados para o epidídimo (82). Os AGPIs de cadeia longa têm sido detectados na membrana plasmática dos espermatozoides da espécie humana (99) e numa variedade de espécies animais, incluindo mamíferos (carneiro, boi, javali) (100) e aves (galinhas, patos, perus) (101).

A observação de que a espermatogênese está associada aos aumentos das gotículas lipídicas na membrana celular (102-104), salienta a estreita relação entre o metabolismo lipídico e o desenvolvimento das células germinativas. O metabolismo lipídico nos espermatozoides é importante tanto para a produção de energia, quanto para a estrutura celular (76). No espermatozoide, os ácidos graxos insaturados oferecem à membrana plasmática a fluidez necessária para a fusão das membranas, durante a fecundação (98).

Durante a maturação dos espermatozoides no epidídimo, a membrana acrossômica sofre uma série de alterações físicas, químicas, e funcionais. Estas mudanças incluem a adição de fosfatidilcolina, altamente insaturado, ocasionando a diminuição da estabilidade da membrana. Porém, de forma simultânea, a adição de colesterol e a manutenção da distribuição assimétrica dos fosfolípidios minimizam esses efeitos, melhorando a estabilização da membrana do espermatozoide maduro (82).

Sendo assim, essa razão AGPI – colesterol (na proporção ideal) é necessária para manutenção da fluidez da membrana plasmática testicular e para produção de gametas férteis.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar em ratos wistar os efeitos da ingestão em longo prazo (quatro meses) de diferentes dietas hiperlipídicas (rica em ácidos graxos saturados e/ou poliinsaturados) na massa corporal, no metabolismo de carboidratos e na morfologia testicular.

### 2.2 Específicos

- Acompanhar a evolução da massa corporal e o comportamento glicêmico, o metabolismo lipídico e os níveis séricos de testosterona e leptina dos animais dos diferentes grupos de estudo aos sete meses de idade;
- Comparar a morfologia do testículo (altura do epitélio seminífero e o diâmetro do túbulo seminífero) dos animais dos diferentes grupos experimentais aos sete meses de idade;
- Avaliar por meio de método imunohistoquímico a expressão do antígeno de proliferação celular no testículo dos animais dos diferentes grupos de estudo aos sete meses de idade;
- Realizar por meio de método bioquímico a quantificação de colágeno no testículo dos animais dos diferentes grupos de estudo aos sete meses de idade.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NIH Nº. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG, CEUA0272012), e seguiu as orientações propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos machos Wistar provenientes da colônia da Unidade de Pesquisa Urogenital, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. No biotério, os animais foram alocados em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade controladas ( $60\pm 10\%$ ), com ciclos de 12 horas de claro e escuro (07h às 19h) e ciclo de exaustão de ar (15 min./hora).

Machos adultos com três meses de idade (12 semanas de idade) foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o teor de lipídios da dieta: SC (*standard chow*; n=9), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados; n=10), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados; n=10), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados; n=10). As dietas SC (14% proteínas, 76% carboidratos, 10% de lipídios) e as diferentes dietas hiperlipídicas HF (14% proteínas, 36% carboidratos, 50% de lipídios) seguiram as recomendações da AIN-93M. O óleo de soja foi usado em todas as dietas experimentais para evitar a deficiência de ácidos graxos essenciais, sendo as dietas HF acrescidas de banha de porco (AGS) e/ou óleo de canola (AGPI). O conteúdo de vitaminas e minerais foi o mesmo em todas as dietas e também seguiu as recomendações da AIN-93M (105). As dietas experimentais foram confeccionadas pela Pragsoluções ([www.pragsolucoes.com.br](http://www.pragsolucoes.com.br)) e a composição está demonstrada na tabela 1.

Tabela 1: Composição das dietas experimentais. Mistura de vitaminas\* e de minerais\*\* segundo a recomendação da AIN-93M (Reeves, Nielsen et al. 1993).

<b>Ingredientes (g/Kg)</b>	<b>SC</b>	<b>HF-S</b>	<b>HF-P</b>	<b>HF-SP</b>
Amido de milho	465,70	192,60	192,60	192,60
Caseína	140,00	175,00	175,00	175,00
Sacarose	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de soja	40,00	40,00	40,00	40,00
Óleo de canola	0,00	0,00	238,00	119,00
Banha de porco	0,00	238,00	0,00	119,00
Fibra	50,00	50,00	50,00	50,00
L-cistina	1,80	1,80	1,80	1,80
Cloreto colina	2,50	2,50	2,50	2,50
BHT	0,008	0,060	0,060	0,060
Mix de minerais*	35,00	35,00	35,00	35,00
Mix vitamínico**	10,00	10,00	10,00	10,00
TOTAL (g)	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
<b>Energia (Kcal/Kg)</b>	<b>3810,00</b>	<b>5000,00</b>	<b>5000,00</b>	<b>5000,00</b>
Hidrato de carbono(%)	76,00	36,00	36,00	36,00
Proteína (%)	14,00	14,00	14,00	14,00
Lipídeo (%)	10,00	50,00	50,00	50,00

Legenda: SC (*standard chow*), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados).

Os grupos controle e hiperlipídicos receberam as respectivas dietas durante 16 semanas (dos três aos sete meses de idade). Todos os grupos de estudo receberam água e ração *ad libitum*. A ingestão alimentar e o estado de saúde dos animais foram registrados diariamente. A massa corporal foi monitorada semanalmente, até o final do experimento.

### 3.2 Biometria e ingestão alimentar dos animais

Ao longo do experimento, conforme mencionado previamente, a massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente, por meio de balança digital de precisão 0,1g (Urano). A ingestão alimentar foi estimada diariamente, mediante a

subtração entre a quantidade total de ração e a quantidade remanescente na caixa. Em caso de sobra, por conta do alto teor lipídico, a ração era desprezada.

### 3.3 Morte

Aos sete meses de idade, após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico intraperitonealmente. O tórax foi aberto e o sangue foi coletado por punção cardíaca através do átrio direito, e imediatamente centrifugado e armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  para análises séricas (glicose, insulina, triglicérides, colesterol total, leptina e testosterona). Posteriormente, os testículos e os depósitos de gordura genital foram dissecados (figura7). Os depósitos de gordura genital foram pesados e fixados em 1,27 mol/l formaldeído em 0,1M tampão fosfato, pH 7,2. Quanto aos testículos, a massa foi aferida, sendo em seguida imediatamente fixados para microscopia ótica (solução de bouin e 1,27 mol/l formaldeído em 0,1M tampão fosfato, pH 7,2, respectivamente).

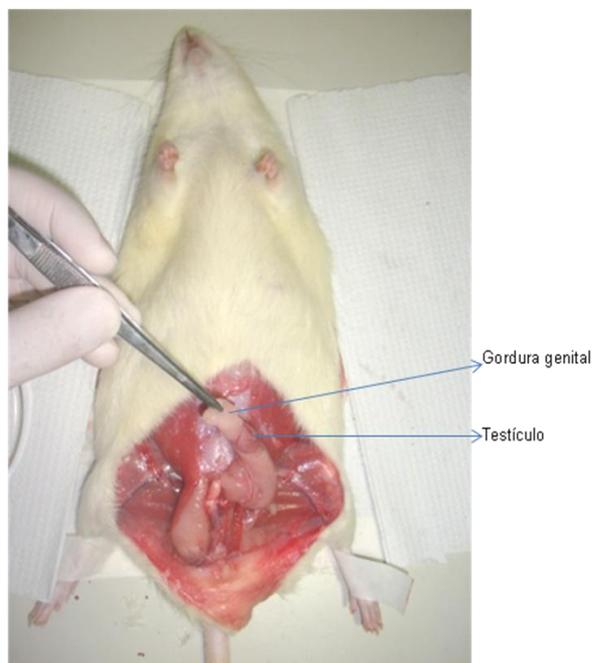


Figura 7 – Dissecção dos depósitos de gordura genital e dos testículos para posteriores análises histomorfométrica, imunohistoquímica e bioquímica.

### 3.4 Bioquímica sérica e níveis hormonais

O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, por 8 min) à temperatura ambiente e armazenado à -20°C até a realização de análises bioquímicas. As concentrações de glicose (monoreagente-K082), triglicerídeos (monoreagente-K117) e colesterol total (monoreagente-K083) foram determinados através do método colorimétrico (Bioclin Systems II, Quisaba, Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As dosagens séricas de insulina, leptina e testosterona foram analisadas pelo método de ELISA a partir de kits comercialmente disponíveis: insulina para ratos/camundongos (Millipore - Cat. EZRMI-13 k – *St Charles, Missouri, USA*); leptina para ratos (Millipore - Cat. EZRL-83K, *St Charles, Missouri, USA*); testosterona (Uscn - Cat. E90458Ge – *Wuhan, China*), respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, com um coeficiente de variação de 1,4%.

### 3.5 Imunohistoquímica do testículo

Após remoção, os testículos sofreram todo o procedimento histológico de rotina e foram seccionados com cinco µm de espessura. Após a desparafinização, a recuperação antigênica dos testículos foi realizada com TRIS-EDTA (pH 9,0) por 12 horas (*overnight*), à 60°C. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% e as reações inespecíficas foram inibidas com tampão fosfato salino/albumina sérica bovina (PBS/BSA 5%). A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo anti-PCNA (PC10, Ref: 180110, Invitrogen, *Camarillo, USA*). Posteriormente, foi feita a incubação com anticorpo secundário e a reação foi amplificada a partir do sistema biotina-estreptavidina (Kit Invitrogen, Ref: 859643, *Frederick, USA*). A imunocoloração foi visualizada após a incubação das secções com 3,3 diaminobenzidina tetracloro-DAB (Ref: 859643, Invitrogen, *Frederick, USA*) e contra-coradas com Hematoxilina de Mayer. Simultaneamente, foram obtidas as lâminas controle negativo (sem a adição do anticorpo primário).

### 3.6 Testículo: estrutura e quantificação

No momento do sacrifício, os testículos foram dissecados e pesados. Na sequência, o polo superior do órgão foi removido e a porção remanescente do testículo foi imediatamente fixada em solução de bouin por 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi clivado e imerso em fixador para microscopia de luz (1.27mol/L de formaldeído, em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 horas em temperatura ambiente. Assim sendo, os fragmentos testiculares foram desidratados em alcoóis com concentrações crescentes até alcançar o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluído em paraplast plus<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich C., *St.Louis, MO, USA*). O material foi seccionado com cinco  $\mu\text{m}$  de espessura e corado com hematoxilina-eosina.

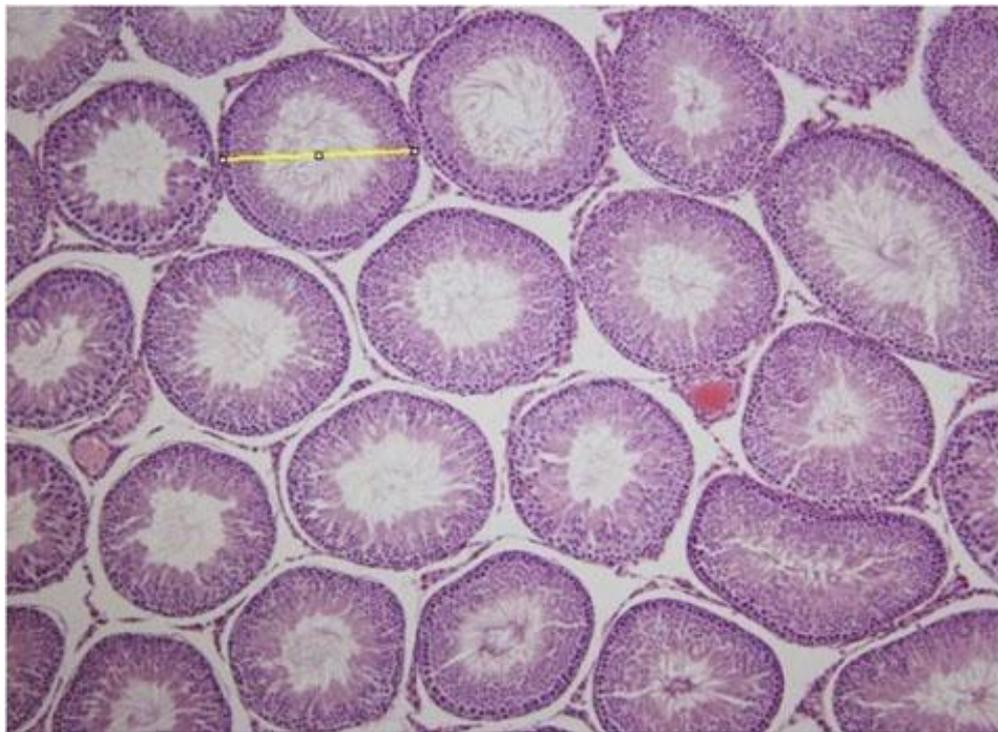
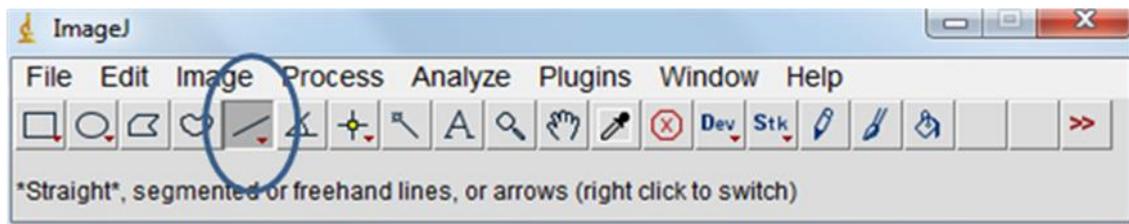
Para a análise morfométrica e quantitativa dos testículos foi utilizado um sistema de vídeo-microscopia com microscópio de luz Olympus BX51 (*Tokyo, Japan*) acoplado a uma câmara digital (Olympus DP70 - *Tokyo, Japan*). As imagens foram capturadas com o auxílio do software ImagePro plus, version 5.0 (Media Cybernetics, *Silver spring, MD, USA*). O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram mensurados utilizando o software Image J<sup>®</sup> (*Image Processing and Analysis in Java*). Após a calibração do sistema, ambas as medidas foram determinadas a partir da ferramenta "*straight*" (Figura 8 e figura 9).

Para mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos, duas retas perpendiculares, de um polo ao outro, de cada secção transversal do túbulo seminífero foram medidas e a média foi calculada. No que tange a altura do epitélio seminífero, quatro porções equidistantes de cada secção transversal dos túbulos seminíferos foram mensuradas, partindo da célula mais basal até a mais próxima do lúmen, sendo a média calculada. As análises morfométricas foram realizadas com um aumento de 100x para o diâmetro dos túbulos seminíferos e um aumento de 200x para a altura do epitélio seminífero. Para cada análise, foram avaliados 25 campos / animal.

A taxa de proliferação celular foi mensurada com o auxílio das ferramentas "*cell counter*" e "*freehand selections*" (Figura 10). Todos os núcleos das células da linhagem espermatogênica imunomarcados com o anticorpo anti-PCNA foram quantificados e tiveram a sua área de localização delimitada. As fotomicrografias

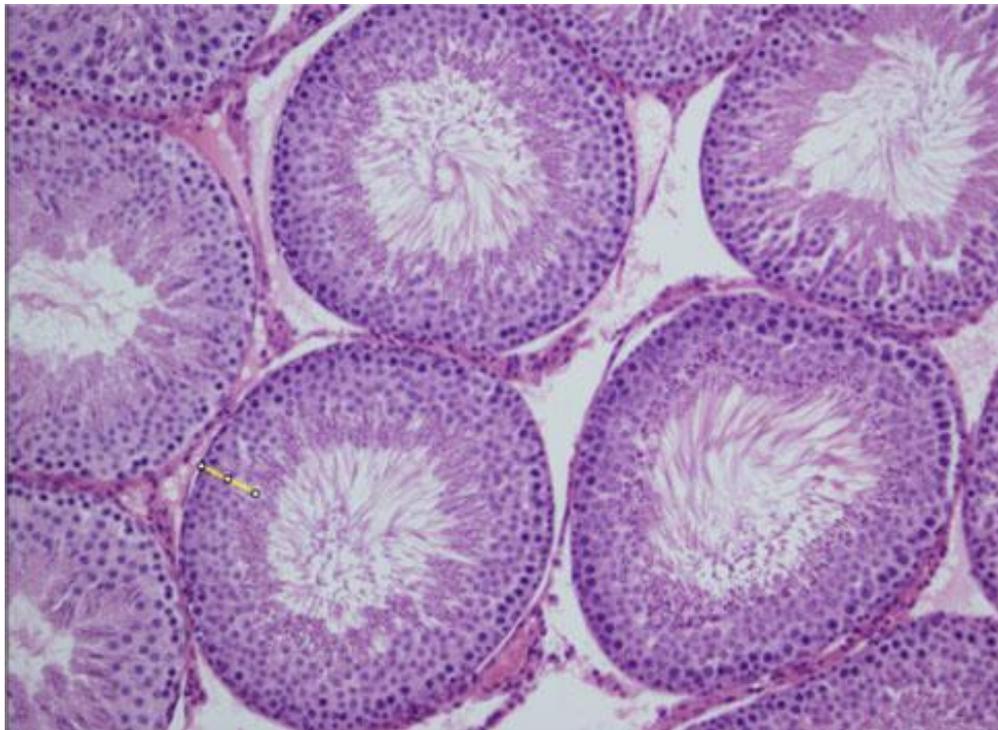
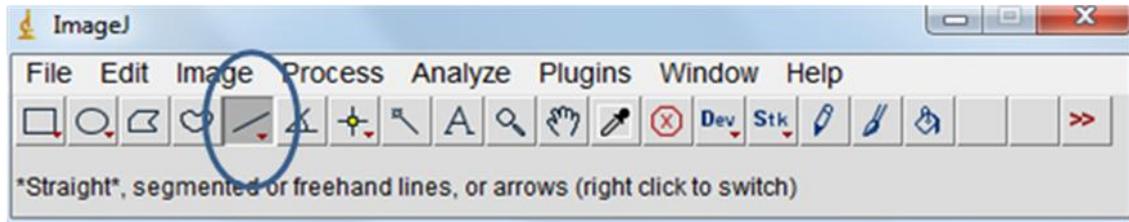
foram obtidas utilizando-se o aumento de 400x. Para esta análise, também foram avaliados 25 campos / animal.

Figura 8 – Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “*straight*” (destacada pelo círculo azul) para a mensuração do diâmetro do túbulo seminífero (100X), a partir do software Image J®.



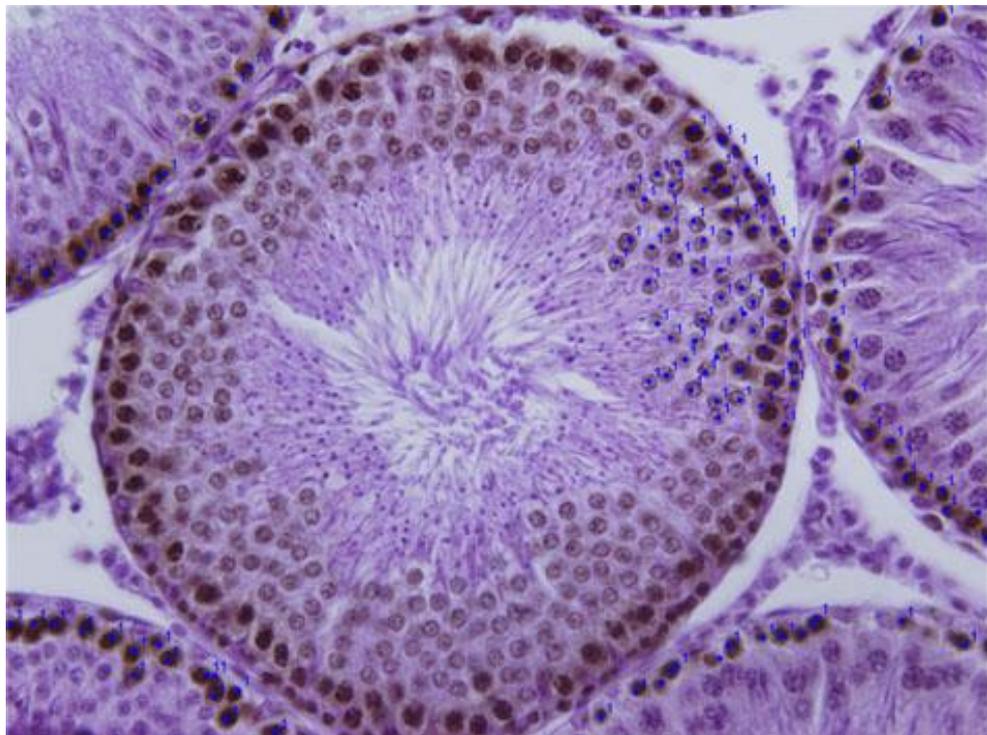
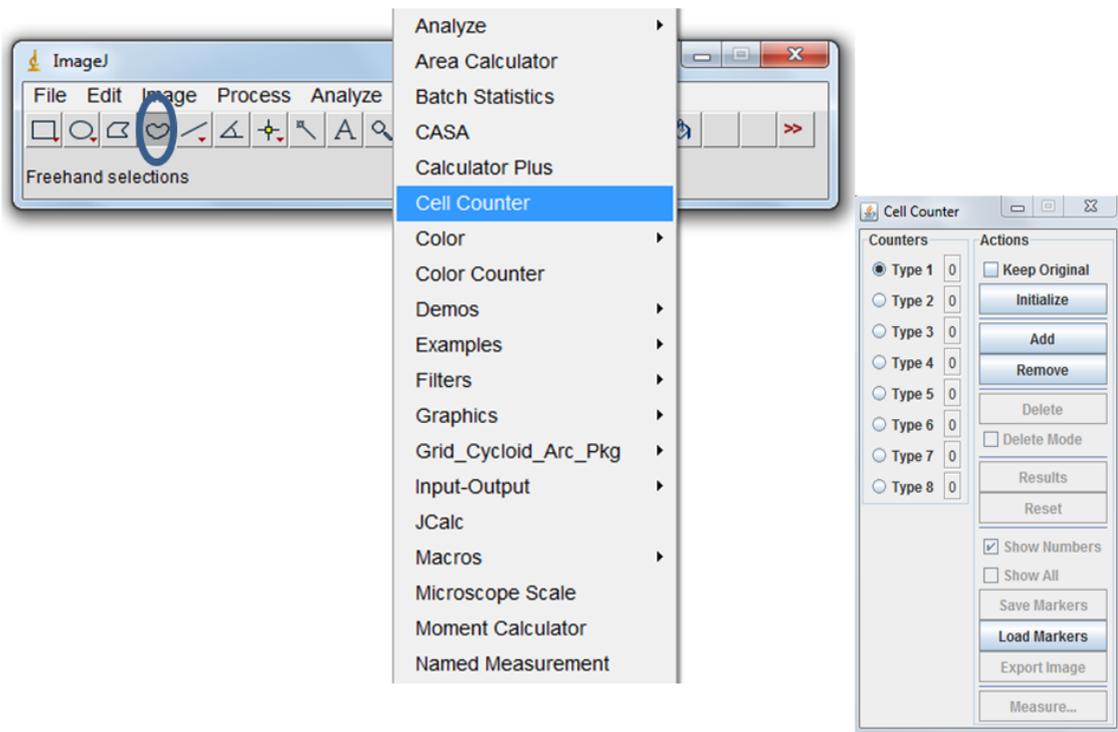
Na fotomicrografia em destaque, a sua seleção permite traçar uma linha reta de um pólo ao outro do túbulo seminífero, passando pelo centro.

Figura 9 – Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “*straight*” (destacada pelo círculo azul) para a mensuração da altura do epitélio seminífero (200X), a partir do software Image J®.



Na fotomicrografia em destaque, a sua seleção permite traçar uma linha reta da célula mais basal até a mais próxima do lúmen.

Figura 10 – Imagem ilustrando a aplicabilidade das ferramentas “cell counter” e “freehand selections” (destacada pelo círculo azul) para a mensuração da proliferação celular (400X), utilizando o software Image J®.



Na fotomicrografia em destaque, a seleção da ferramenta “cell counter” permite a contagem dos núcleos das células da linhagem espermatogênica imunomarcados, e a ferramenta “freehand selections” delimitou os túbulos seminíferos que continham núcleos imunomarcados.

### 3.7 Análise Bioquímica do testículo

Após a eutanásia, parte das amostras dos testículos foi fixada em acetona durante 24 horas à 4°C. Em seguida, o material foi clivado (2mm x 2mm) e delipidado por intermédio de duas trocas de 24 horas cada, em 40 mL de clorofórmio/metanol (2:1, v/v), à temperatura ambiente. O material foi incubado à 60°C durante 30 minutos. Dessa forma, obteve-se um preparo de tecido seco, a partir do qual foi obtida a concentração de colágeno total pela dosagem colorimétrica de hidroxiprolina. De 5 a 15 mg de tecido seco testicular foram delipidados e hidrolisados em ácido clorídrico (HCl) 6N durante 18 horas à 118°C (106). A dosagem foi realizada nos hidrolisados neutralizados utilizando o método da cloramina T (107). Os resultados foram expressos em microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de hidroxiprolina por miligrama (mg) de tecido seco.

### 3.8 Análise estatística

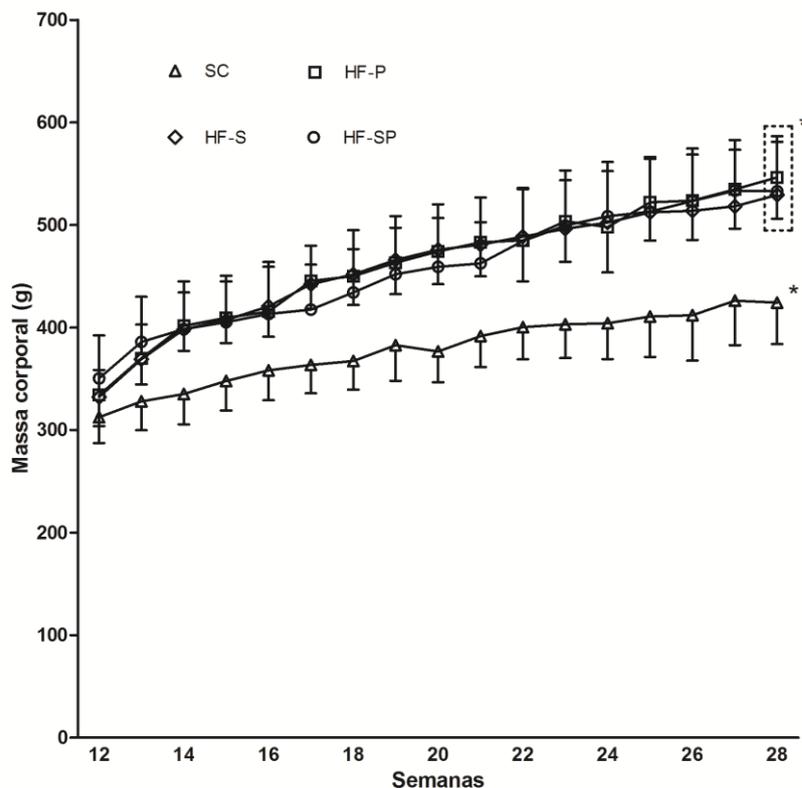
Todos os dados foram testados para a curva de distribuição normal e homogeneidade de variância, sendo reportados como média e desvio padrão da média (DP). As diferenças entre os grupos foram estabelecidas por análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de *Bonferroni*. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$  (108) e todas as análises foram realizadas no software de análise estatística *GraphPad Prism* versão 5.03 para *Windows* (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Ingestão alimentar e massa corporal

Durante todo o experimento, os grupos HF-S, HF-P e HF-SP mostraram um aumento da ingestão alimentar quando comparados aos animais do grupo SC (dados não mostrados). Esse padrão foi acompanhado por um aumento significativo da massa corporal nos grupos HF-S ( $529,30 \pm 57,39\text{g}$ ), HF-P ( $546,40 \pm 40,13\text{g}$ ) e HF-SP ( $532,90 \pm 48,27\text{g}$ ) quando comparado ao grupo SC ( $424,22 \pm 40,29\text{g}$ ,  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 1).

Gráfico 1- Evolução da massa corporal dos animais dos três aos sete meses de idade.

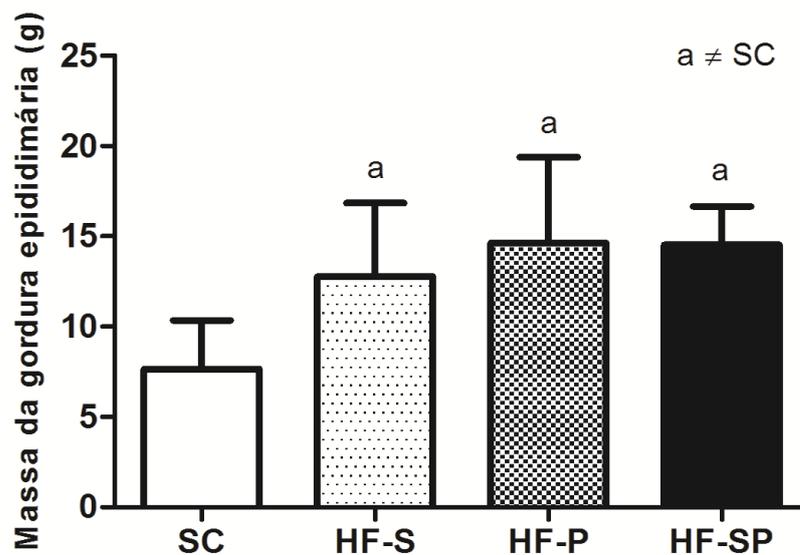


Legenda: SC (*standard chow*), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados). Símbolos iguais representam diferença estatística  $p < 0,05$ .

## 4.2 Depósitos de gordura genital

O gráfico 2 mostra que todos os animais alimentados com a dieta HF apresentaram maior massa de gordura epididimária (HF-S:  $12,79 \pm 4,05\text{g}$ ; HF-P:  $14,64 \pm 4,75\text{g}$ ; HF-SP:  $14,54 \pm 2,12\text{g}$ ) quando comparado ao grupo SC ( $7,65 \pm 2,70\text{g}$ ,  $p = 0,0004$ ) correspondendo a um aumento de 67%, 91% e 90% desse compartimento, respectivamente.

Gráfico 2 – Depósito de gordura epididimária dos diferentes grupos aos sete meses de idade.



Legenda: SC (*standard chow*), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados). Os dados foram expressos como média  $\pm$  DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . [a] indica diferença estatística para o grupo SC.

#### **4.3 Metabolismo de carboidratos (valores de glicose e insulina)**

Os animais dos grupos HF-S e HF-SP apresentaram hiperglicemia ( $p=0,0060$ ) (Tabela 2). De modo semelhante, os níveis de insulina foram significativamente maiores nos mesmos grupos em comparação ao grupo SC ( $p = 0,0030$ ), o que pode implicar em resistência à insulina (Tabela 2).

#### **4.4 Perfil lipídico, níveis de leptina e testosterona**

Os níveis de triglicerídeos e testosterona não diferiram entre os grupos (Tabela 2). No entanto, os valores de colesterol total foram superiores nos grupos HF-S e HF-SP em comparação ao grupo SC ( $p = 0,0021$ ), o que corresponde a um aumento de 30% e 31% desse nível, respectivamente (Tabela 2). Os níveis de leptina foram mais elevados em todos os animais que receberam a dieta HF quando comparado ao grupo SC ( $p = 0,0019$ ) (Tabela 2).

#### **4.5 Parâmetros testiculares**

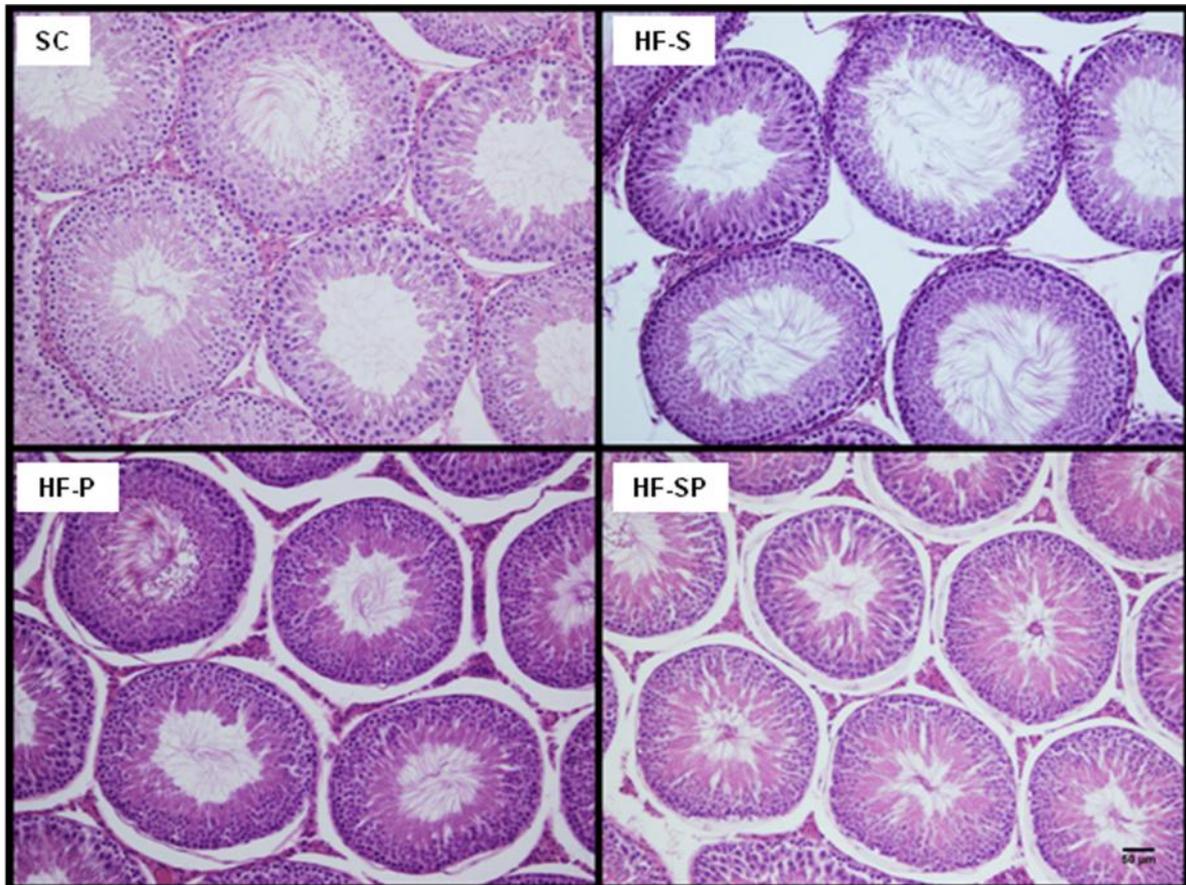
A massa testicular foi igual em todos os grupos (Tabela 2). A figura 11 mostra a altura do epitélio seminífero e o diâmetro dos túbulos seminíferos e a figura 12 mostra a proliferação das células da linhagem espermatogênica no testículo dos diferentes grupos. Os grupos SC, HF-P e HF-SP apresentaram o epitélio seminífero mais alto quando comparado ao grupo HF-S ( $p=0,0003$ ). No que diz respeito ao diâmetro dos túbulos seminíferos, verificou-se uma diminuição no grupo HF-SP, em comparação ao grupo SC ( $p=0,0010$ ). A proliferação celular foi reduzida no grupo HF-S comparado ao grupo SC ( $p=0,0450$ ) (Tabela 2). O colágeno não diferiu entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Metabolismo de carboidratos (valores de glicose e insulina), perfil lipídico (valores de triglicerídeos e colesterol total), níveis de leptina e testosterona, e parâmetros testiculares.

<b>Análise sérica</b>	<b>SC</b>	<b>HF-S</b>	<b>HF-P</b>	<b>HF-SP</b>
Glicose (mmol/L)	7,87 ± 1,62	10,62 ± 2,36 <sup>a</sup>	9,85 ± 1,61	11,09 ± 1,65 <sup>a</sup>
Insulina (µIU/mL)	1,49 ± 0,41	2,75 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,83	2,85 ± 0,92 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	86,29 ± 23,68	95,63 ± 8,60	83,63 ± 17,52	84,25 ± 5,04
Colesterol total (mg/ dL)	80,56 ± 11,75	104,80 ± 12,95 <sup>a</sup>	100,10 ± 10,38	105,20 ± 19,65 <sup>a</sup>
Leptina (ng/mL)	6,79 ± 3,73	12,04 ± 1,02 <sup>a</sup>	11,49 ± 1,73 <sup>a</sup>	11,63 ± 1,61 <sup>a</sup>
Testosterona (ng/mL)	5,48 ± 0,83	4,73 ± 1,14	4,28 ± 1,25	5,11 ± 0,89
<b>Parâmetros testiculares</b>	<b>SC</b>	<b>HF-S</b>	<b>HF-P</b>	<b>HF-SP</b>
Massa testicular (g)	1,46 ± 0,09	1,51 ± 0,07	1,52 ± 0,07	1,53 ± 0,08
Altura do epitélio seminífero (µm)	44,84 ± 1,46	41,66 ± 2,60 <sup>a</sup>	46,12 ± 2,24 <sup>b</sup>	44,92 ± 1,92 <sup>b</sup>
Diâmetro do túbulo seminífero (µm)	310,60 ± 6,99	303,30 ± 8,26	297,90 ± 10,15	291,40 ± 11,46 <sup>a</sup>
Proliferação celular (µm/mm <sup>2</sup> )	3,24x10 <sup>-3</sup> ± 0,83x10 <sup>-3</sup>	2,25x10 <sup>-3</sup> ± 0,57x10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	2,89x10 <sup>-3</sup> ± 0,23x10 <sup>-3</sup>	2,75x10 <sup>-3</sup> ± 0,36x10 <sup>-3</sup>
Colágeno (µg/mg)	2,09 ± 0,23	2,08 ± 0,21	1,94 ± 0,68	2,07 ± 0,37

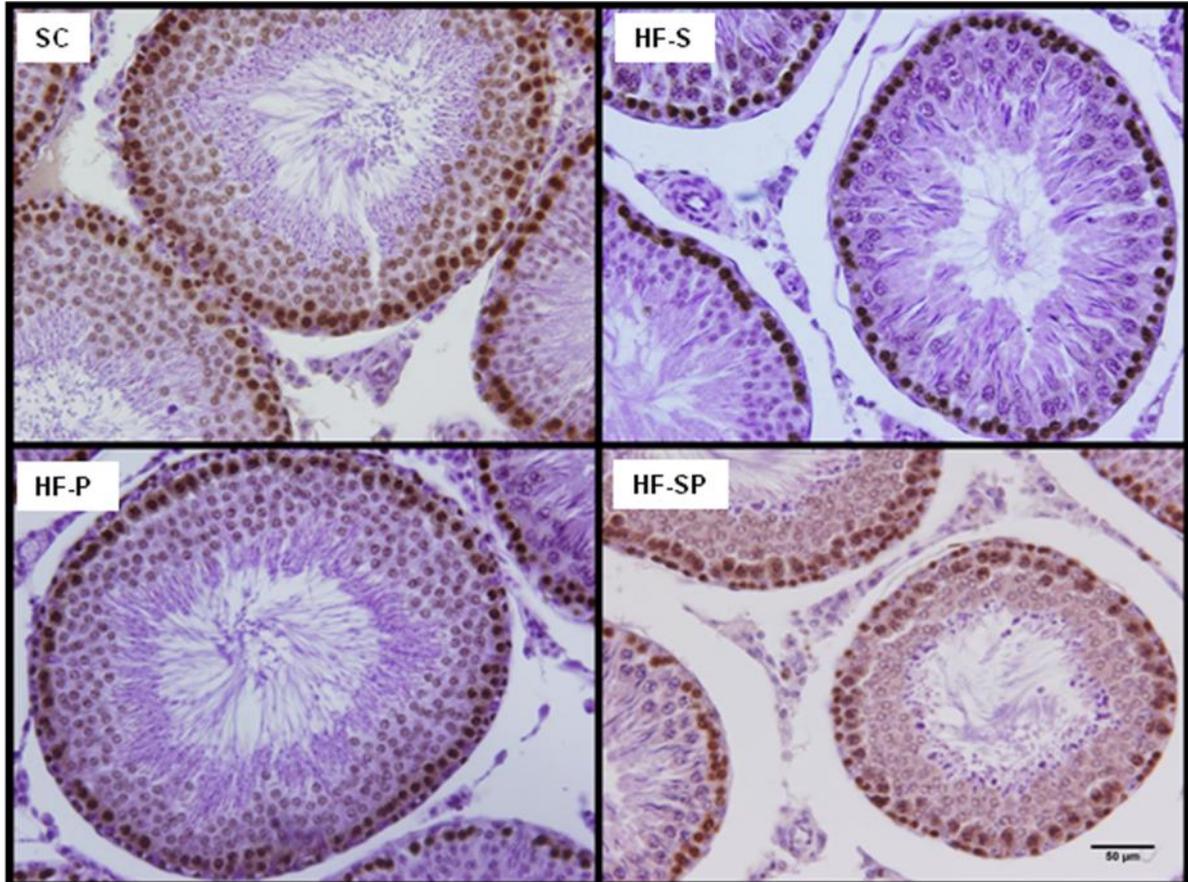
Legenda: SC (*standard chow*), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados). Os dados foram expressos como média ± DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, p<0,05. [a] indica diferença estatística para o grupo SC; [b] indica diferença estatística para o grupo HF-S.

Figura 11 - Fotomicrografias referentes ao diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero nos animais aos sete meses de idade (200x).



Legenda e principais achados: SC (*standard chow*), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados). Os grupos HF-S e HF-SP mostraram redução na altura do epitélio seminífero e no diâmetro do túbulo seminífero, respectivamente, o que pode comprometer a produção espermática.

Figura 12 – Fotomicrografias referentes à proliferação das células da linhagem espermatozóide nos animais aos sete meses de idade (400x).



Legenda e principais achados: SC (*standard chow*), HF-S (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados), HF-P (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos poliinsaturados), HF-SP (dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e poliinsaturados). O grupo HF-S mostrou redução na proliferação das células da linhagem espermatozóide, o que pode comprometer a produção de espermatozoides.

## 5. DISCUSSÃO

O aumento na prevalência da obesidade confere danos significativos à saúde. Mudanças ambientais e comportamentais são as principais causas da obesidade (109). O rápido aumento na prevalência da obesidade, durante os últimos 20 anos, não pode ser justificado por alterações genéticas que, teoricamente, não poderiam ter ocorrido em tão curto período de tempo (110). Modelos de obesidade, induzidos por dieta, foram desenvolvidos para mimetizar essa doença. Archer e Mercer (2007) e Tan, Gundlach et al. (2005) utilizaram esses modelos para estabelecer uma relação entre a obesidade e as alterações testiculares (111, 112).

A composição dos ácidos graxos presentes na dieta tem um importante papel na regulação da massa corporal. Comparando os efeitos metabólicos desencadeados por diferentes dietas hiperlipídicas, acredita-se que as dietas à base de ácidos graxos saturados e colesterol induzem efeitos deletérios sobre a composição corporal e o metabolismo, além de serem predisponentes ao desenvolvimento de resistência à insulina, enquanto que as dietas contendo ácidos graxos poliinsaturados exercem efeitos contrários (15, 113-116). Estudos em animais (117) e em humanos (118) mostram que os ácidos graxos poliinsaturados são mais suscetíveis a beta oxidação lipídica, enquanto que os ácidos graxos saturados são mais propensos a acumularem-se no tecido adiposo. No presente estudo, ambas as dietas foram capazes de promover o aumento da massa corporal. Hariri, Gougeon et al. (2010) e Buettner, Parhofer et al. (2006) também observaram excesso de peso em animais alimentados com dieta hiperlipídica, independentemente da qualidade do lipídeo (33, 119).

Além do aumento da massa corporal, todos os grupos HF apresentaram aumento de gordura genital, confirmando o sobrepeso. Os grupos HF-S e HF-SP apresentaram aumento nos níveis séricos de glicose, insulina e colesterol total. Sendo assim, o consumo de gordura saturada, em diferentes concentrações (50% e 25% da energia total da dieta), foi capaz de ocasionar alterações metabólicas. Em contrapartida, o grupo HF-P não apresentou essas alterações. Em homens, evidências recentes correlacionam a síndrome metabólica ao hipogonadismo (120, 121). Fernandes-Santos, Evangelista Carneiro et al. (2009) e Nascimento, Barbosa-da-Silva et al. (2010) também mostraram que camundongos C57BL/6

desenvolveram obesidade, resistência à insulina e alterações no perfil lipídico quando alimentados com uma dieta rica em ácidos graxos saturados (122, 123). Também foram observadas alterações metabólicas em ratos após a administração de dieta hiperlipídica, semelhantes à síndrome metabólica (124).

Estudos experimentais (20, 125) e epidemiológicos (126) mostram que a produção de leptina está relacionada com a adiposidade. Em nosso estudo, simultaneamente ao aumento do tecido adiposo branco, as dietas HF aumentaram os níveis séricos de leptina coerente com o fato que o tecido adiposo branco é a principal fonte de leptina em animais adultos (127). A leptina regula a ingestão alimentar, o metabolismo energético e a função reprodutiva (128, 129). Foi proposto que uma concentração específica de leptina é necessária para manter a função reprodutiva normal, e níveis abaixo ou acima desse limiar são críticos para a influência desse peptídeo. A leptina age principalmente sobre os receptores hipotalâmicos. Sendo assim alterações na disponibilidade desse hormônio podem gerar efeitos negativos sobre a função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (129, 130). No entanto, a relação entre altos níveis séricos de leptina e o sistema reprodutor masculino não é clara.

A hiperleptinemia parece estar envolvida na redução dos níveis de testosterona sérica. Vigueras-Villasenor, Rojas-Castaneda et al. (2011) observou em ratos Sprague-Dawley alimentados com uma dieta HF do desmame aos 90 dias, uma redução nos níveis de testosterona (20). Da mesma forma, Bakos, Mitchell et al. (2010) observou que a administração de dieta HF durante nove semanas, provocou uma diminuição nos níveis de testosterona em comparação ao grupo controle, mostrando os efeitos negativos da obesidade sobre o hormônio sexual masculino (131). Em nosso estudo não foi observada uma diminuição dos níveis de testosterona, apesar de ter ocorrido aumento dos níveis de leptina. É possível que a massa corporal dos animais não tenha sido suficiente para produzir um decréscimo significativo nos níveis de testosterona sérica.

Existem poucos estudos que correlacionam a obesidade às alterações no testículo, e os existentes não são conclusivos. Dados recentes na literatura mostraram que em homens inférteis a prevalência da obesidade foi três vezes mais acentuada em comparação aos homens com infertilidade idiopática ou a qualquer tipo de infertilidade vinculada ao sexo feminino (109). Um dos parâmetros utilizados para a avaliação da espermatogênese é o diâmetro dos túbulos seminíferos (132,

133). Em situações fisiológicas normais, estudos prévios mostraram que o aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos está correlacionado com a retenção de fluido (134). Constatamos em nosso trabalho que o diâmetro dos túbulos seminíferos foi menor no grupo HF-SP o que pode indicar uma diminuição na produção de espermatozóides. Em contrapartida, a ingestão de ácidos graxos n-3 foi capaz de exercer efeito benéfico na atividade espermatogênica, uma vez que o diâmetro dos túbulos seminífero e altura do epitélio seminífero foram similares ao grupo controle. A dieta acrescida de banha de porco no grupo HF-SP possivelmente foi a causa da redução no diâmetro do túbulo seminífero observada. Yang, Cui et al. (2005) mostraram que a administração de dieta hiperlipídica em ratos foi capaz de induzir a obesidade e a deterioração do epitélio seminífero (135).

Quanto à altura do epitélio seminífero, o grupo HF-S mostrou uma diminuição significativa quando comparado ao grupo controle indicando, mais uma vez, a influência negativa da dieta rica em colesterol na espermatogênese. Por outro lado, os grupos HF-P e HF-SP apresentaram resultados semelhantes ao grupo SC, mostrando um papel benéfico dos ácidos graxos poliinsaturados no testículo. É sabido que o colesterol faz parte da composição das membranas das células animais promovendo a rigidez da membrana plasmática quando em excesso (77). O esperado, portanto é que o aumento na ingestão dos ácidos graxos poliinsaturados possa melhorar as propriedades físico-químicas das membranas plasmáticas e com isso favorecer a espermatogênese aqui avaliada pela altura do epitélio seminífero. Sebokova, Garg et al. (1990) observaram acúmulo de colesterol na membrana plasmática das células germinativas a partir da administração de dietas hipercolesterolêmicas (136).

A proliferação celular foi significativamente reduzida no grupo HF-S, mostrando que algum estágio da espermatogênese foi afetado pelo colesterol. Níveis elevados de colesterol podem estimular a produção de radicais de oxigênio, e aumentar os níveis de peroxidação lipídica em vários tecidos, comprometendo seriamente a integridade funcional das células (137). Purohit (1999) obteve o mesmo resultado em ratos hiperlipidêmicos (138) e em coelhos (139). Esse autor observou que a espermatogênese ficou estacionada no estágio de espermátócito primário, pois foram vistos poucos espermátócitos secundários. Estas observações estão de acordo com os nossos resultados.

A obesidade causa mudanças na composição e organização dos componentes da matriz extracelular. Essas alterações podem estar relacionadas a mudanças organizacionais e estruturais do colágeno, que influenciam as propriedades mecânicas e a progressão para o estado de doença (140). Esses autores observaram alterações significativas no teor de hidroxiprolina no tendão de ratos obesos.

Entretanto ainda não foram descritas alterações do colágeno no testículo de ratos obesos. Em nosso estudo, a quantidade de hidroxiprolina no testículo de ratos foi semelhante em todos os grupos mostrando que as diferentes dietas hiperlipídicas não alteraram a quantidade de colágeno.

## 6. CONCLUSÃO

Dessa forma, este estudo mostrou que a administração de dieta hiperlipídica, independentemente da qualidade do lipídio, promoveu o excesso de peso em ratos adultos. No entanto, as dietas ricas em ácido graxo saturado (banha de porco) promoveu alterações no metabolismo dos carboidratos e na morfologia testicular, com redução no diâmetro dos túbulos seminíferos, na altura do epitélio seminífero e na proliferação das células da linhagem espermatogênica. Estas alterações estão possivelmente relacionadas à distúrbios na espermatogênese.

## REFERÊNCIAS

1. Katulanda P, Jayawardena MA, Sheriff MH, Constantine GR, Matthews DR. Prevalence of overweight and obesity in Sri Lankan adults. *Obes Rev.* 2010 Nov;11(11):751-6.
2. WHO. Noncommunicable diseases country profiles 2011. Geneva 2011.
3. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity in the United States, 2009-2010. *NCHS Data Brief.* 2012 Jan(82):1-8.
4. Wang X, Cheng M, Zhao M, Ge A, Guo F, Zhang M, et al. Differential effects of high-fat-diet rich in lard oil or soybean oil on osteopontin expression and inflammation of adipose tissue in diet-induced obese rats. *Eur J Nutr.* 2012 Jul 31.
5. Pedersen SD. Metabolic complications of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013 Apr;27(2):179-93.
6. Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, Anton B, Ladenson PW. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jun;94(6):1853-78.
7. Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod.* 2005 Jan;20(1):208-15.
8. Sebokova E, Garg ML, Clandinin MT. Modulation of receptor-mediated gonadotropin action in rat testes by dietary fat. *Am J Physiol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1988 Jun;254(6 Pt 1):E708-12.
9. Austin GL, Ogden LG, Hill JO. Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normalweight, overweight, and obese individuals: 1971-2006. *Am J Clin Nutr* 2011;93(4):836-43.
10. Sheehy T, Sharma S. The nutrition transition in Barbados: trends in macronutrient supply from 1961 to 2003. *B J Nutr* 2010;104(8):1222-9.
11. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. [Review]. 1999 May-Jun;60(5-6):421-9.
12. Nelson DL, Cox MM. Lipid Biosynthesis. *Principles of Biochemistry.* New York: W.H. Freeman and Company; 2005. p. 787-815.

13. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(2):117-30.
14. Castro TG, Cardoso MA. Lipídeos. In: Vannucchi H, editor. *Nutrição Humana: nutrição e metabolismo.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 36-42.
15. Cascio G, Schiera G, Di Liegro I. Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Current diabetes reviews.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2012 Jan;8(1):2-17.
16. Larsson K, Quinn PJ. Occurrence and Characteristics of Oils and Fats. *The Lipid Handbook.* London: Chapman and Hall; 1994. p. 47-223.
17. Akihisa T, Kojima N, Kato N, Ichimura Y, Suzuki H, Fukatsu M, et al. Triterpene alcohol and fatty acid composition of shea nuts from seven African countries. *J Oleo Sci.* 2010;59(7):351-60.
18. Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, Hermansen K, Hu FB, Jakobsen MU, et al. The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr.* 2011;93(4):684-8.
19. Feskens EJ. Can diabetes be prevented by vegetable fat? *Diabetes Care.* 2001 Sep;24(9):1517-8.
20. Viguera-Villasenor RM, Rojas-Castaneda JC, Chavez-Saldana M, Gutierrez-Perez O, Garcia-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O, et al. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem.* 2011 Feb;113(2):214-20.
21. Homma Y, Kondo Y, Kaneko M, Kitamura T, Nyou WT, Yanagisawa M, et al. Promotion of carcinogenesis and oxidative stress by dietary cholesterol in rat prostate. *Carcinogenesis.* 2004 Jun;25(6):1011-4.
22. Jones PJH, Kubow S. Lipids, sterols, and their metabolites. In: ME S, editor. *Modern nutrition in health and disease.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006. p. 92–122.
23. Gogus U, Smith C. n-3 omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science and Technology* 2010;45:417–36.
24. Barcelo-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res.* 2009 Nov;48(6):355-74.
25. De Caterina R, Madonna R, Bertolotto A, Schmidt E. n-3 fatty acids in the treatment of diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007;30:1012–26.

26. EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol 2010.
27. Jafari T, Fallah AA, Azadbakht L. Role of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review of epidemiological and clinical studies. *Maturitas*. 2013 Feb 2.
28. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res*. 2012;65:211-22.
29. Lankinen M, Schwab U, Erkkila A, Seppanen-Laakso T, Hannila ML, Mussalo H, et al. Fatty fish intake decreases lipids related to inflammation and insulin signaling--a lipidomics approach. *PLoS One*. 2009;4(4):e5258.
30. Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Jan;116(1):1-16.
31. Defilippis AP, Blaha MJ, Jacobson TA. Omega-3 Fatty acids for cardiovascular disease prevention. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2010;12(4):365-80.
32. Gromadzka-Ostrowska J, Przepiorka M, Romanowicz K. Influence of dietary fatty acids composition, level of dietary fat and feeding period on some parameters of androgen metabolism in male rats. *Reprod Biol*. 2002 Nov;2(3):277-93.
33. Hariri N, Gougeon R, Thibault L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res*. 2010 Sep;30(9):632-43.
34. Marques MB, Langouche L. Endocrine, metabolic, and morphologic alterations of adipose tissue during critical illness. *Crit Care Med*. 2013;41(1):317-25.
35. Bulcao C, Ferreira SR, Giuffrida FM, Ribeiro-Filho FF. The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev*. 2006 Feb;2(1):19-28.
36. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
37. Mantzoros CS, Li T, Manson JE, Meigs JB, Hu FB. Circulating adiponectin levels are associated with better glycemic control, more favorable lipid profile, and reduced inflammation in women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4542-8.
38. 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 Dec 1;372(6505):425-32.

39. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril*. 2002 Mar;77(3):433-44.
40. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev*. 2002 Oct;60(10 Pt 2):S1-14; discussion S68-84, 5-7.
41. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA. Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Aug;14 Suppl 5:254S-8S.
42. Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes*. 2004 Feb;53 Suppl 1:S152-8.
43. Li Y, Ding L, Hassan W, Abdelkader D, Shang J. Adipokines and hepatic insulin resistance. *Journal of Diabetes Research*. 2013.
44. Isidori AM, Caprio M, Strollo F, Moretti C, Frajese G, Isidori A, et al. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3673-80.
45. Moulana M, Lima R, Reckelhoff JF. Metabolic syndrome, androgens, and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2011 Apr;13(2):158-62.
46. Bluher S, Mantzoros CS. Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007 Dec;14(6):458-64.
47. Chehab FF. The reproductive side of leptin. *Nat Med*. 1997 Sep;3(9):952-3.
48. Rosenbaum M, Leibel RL. Leptin: a molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. *Trends Endocrinol Metab*. 1998 Apr;9(3):117-24.
49. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia*. 2007 Feb;39(1):22-7.
50. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *Journal of Endocrinology*. 1999;161:211-8.
51. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism: clinical and experimental*. [Review]. 2013 Apr;62(4):457-78.
52. Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, et al. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4531-6.
53. Lafontan M, Viguerie N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Dec;6(6):580-5.

54. Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, 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. *J Endocrinol.* 2001 Aug;170(2):413-23.
55. Kupelian V, Page ST, Araujo AB, Travison TG, Bremner WJ, McKinlay JB. Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):843-50.
56. Goulis DG, Tarlatzis BC. Metabolic syndrome and reproduction: I. testicular function. *Gynecol Endocrinol.* 2008 Jan;24(1):33-9.
57. Chen RY, Wittert GA, Andrews GR. Relative androgen deficiency in relation to obesity and metabolic status in older men. *Diabetes Obes Metab.* 2006 Jul;8(4):429-35.
58. Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Bolesta: Cache River Press* 1990. p. 1-40.
59. Kierszenbaum AL. Espermatogênese. *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 573-600.
60. Bronson R. Biology of the male reproductive tract: its cellular and morphological considerations. *Am J Reprod Immunol.* 2011;65(3):212-9.
61. Gartner LPH, J.L. *Tratado de Histologia.* Elsevier; 2003. p. 401-18.
62. Setchell BP. Male reproductive organs and semen. *Reproduction in Domestic Animals.* San Diego: Academic Press; 1991. p. 221-50.
63. Millette CF. Reproductive physiology of men. In: Seibel M, editor. *Infertility: A Comprehensive Text.* Stamford Appleton & Lange 1997. p. 221–53.
64. Junqueira LC, Carneiro JC. *Aparelho Reprodutor Masculino. Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 415-27.
65. Yan HH, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Ectoplasmic specialization: a friend or a foe of spermatogenesis? *Bioessays.* 2007 Jan;29(1):36-48.
66. França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. *Male reproduction: a multidisciplinary overview.* Madrid: Churchill Communications Europe España; 1998. p. 198-219.
67. Godinho CL. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. 1999. p. 74.

68. Russell LD, Saxena NK, Turner TT. Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. *Tissue Cell*. 1989;21(3):361-79.
69. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1994. p. 1363-434.
70. Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci*. 1977 May;44(5):818-33.
71. Amann RP, Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci*. 1983 Jul;57 Suppl 2:380-403.
72. Dym M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev*. 1994 Feb;15(1):102-15.
73. Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev*. 1991 Feb;12(1):45-77.
74. Pescovitz OH, Srivastava CH, Breyer PR, Monts BA. Paracrine control of spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 1994 Apr;5(3):126-31.
75. Schalat S, Meinhardt A, Nieschlag E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology*. 1997;137:101-17.
76. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E, et al. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception*. 2002 Apr;65(4):301-4.
77. Demel RA, De Kruyff B. The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Oct 26;457(2):109-32.
78. Uauy R, Mena P, Rojas C. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proc Nutr Soc*. 2000 Feb;59(1):3-15.
79. Horrocks LA, Farooqui AA. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004 Apr;70(4):361-72.
80. Mohammed BS, Sankarappa S, Geiger M, Sprecher H. Reevaluation of the pathway for the metabolism of 7,10,13, 16-docosatetraenoic acid to 4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1995 Feb 20;317(1):179-84.
81. Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem*. 1991 Oct 25;266(30):19995-20000.

82. Saether T, Tran TN, Rootwelt H, Christophersen BO, Haugen TB. Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearyl-CoA desaturase 2 in rat testis. *Biol Reprod.* 2003 Jul;69(1):117-24.
83. Chanmugam PS, Boudreau MD, Hwang DH. Dietary (n-3) fatty acids alter fatty acid composition and prostaglandin synthesis in rat testis. *J Nutr.* 1991 Aug;121(8):1173-8.
84. Retterstol K, Haugen TB, Christophersen BO. The pathway from arachidonic to docosapentaenoic acid (20:4n-6 to 22:5n-6) and from eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid (20:5n-3 to 22:6n-3) studied in testicular cells from immature rats. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jan 3;1483(1):119-31.
85. Nissen HP, Heinze I, Kreysel HW, Schirren C. Fatty acid composition of neutral lipids of human semen. *Andrologia.* 1978 Sep-Oct;10(5):390-2.
86. Connor WE, Lin DS, Neuringer M. Biochemical markers for puberty in the monkey testis: desmosterol and docosahexaenoic acid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jun;82(6):1911-6.
87. Davis JT, Bridges RB, Coniglio JG. Changes in lipid composition of the maturing rat testis. *Biochem J.* 1966 Jan;98(1):342-6.
88. Johnson LA, Pursel VG. Effect of age of boars on testicular lipids and fatty acids. *J Anim Sci.* 1975 Jan;40(1):108-13.
89. Ahluwalia B, Holman RT. Fatty acid distribution in the bovine pre- and postpartum testis. *Lipids.* 1966 May;1(3):197-201.
90. Lin DS, Neuringer M, Connor WE. Selective changes of docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in monkey testis during puberty. *J Lipid Res.* 2004 Mar;45(3):529-35.
91. Coniglio JG, Grogan WM, Jr., Rhamy RK. Lipid and fatty acid composition of human testes removed at autopsy. *Biol Reprod.* 1975 Mar;12(2):255-9.
92. Beckman JK, Coniglio JG. A comparative study of the lipid composition of isolated rat Sertoli and germinal cells. *Lipids.* 1979 Mar;14(3):262-7.
93. Beckman JK, Coniglio JG. The metabolism of polyunsaturated fatty acids in rat Sertoli and germinal cells. *Lipids.* 1980 Jun;15(6):389-94.
94. Retterstol K, Tran TN, Haugen TB, Christophersen BO. Metabolism of very long chain polyunsaturated fatty acids in isolated rat germ cells. *Lipids.* 2001 Jun;36(6):601-6.
95. Stoffel W, Holz B, Jenke B, Binczek E, Gunter RH, Kiss C, et al. Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* 2008 Sep 3;27(17):2281-92.

96. Stroud CK, Nara TY, Roqueta-Rivera M, Radlowski EC, Lawrence P, Zhang Y, et al. Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res.* 2009 Sep;50(9):1870-80.
97. Fischer S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. *Adv Lipid Res.* 1989;23:169-98.
98. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod.* 2007 Aug;77(2):190-201.
99. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1995 Nov;42(3):334-46.
100. Poulos A, Sharp P, Johnson D, White I, Fellenberg A. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. *Biochem J.* 1986 Dec 15;240(3):891-5.
101. Surai PF, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, Brillard JP, Wishart GJ, et al. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998 Jul;120(3):527-33.
102. Ghosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert LE, Jr., Russell LD. Structural manifestations of the rat Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology.* 1992 Jul;131(1):485-97.
103. Ghosh S, Bartke A, Grasso P, Reichert LE, Jr., Russell LD. Structural response of the hamster Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. *Anat Rec.* 1992 Dec;234(4):513-29.
104. Hodgson YM, Irby DC, Kerr JB, de Kretser DM. Studies of the structure and function of the Sertoli cell in a seasonally breeding rodent. *Biol Reprod.* 1979 Dec;21(5):1091-8.
105. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.
106. Cabral CA, Sampaio FJ, Cardoso LE. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol.* 2003 Dec;170(6 Pt 1):2512-6.
107. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Biochem.* 1963;35:1961-5.

108. Zar J. Biostatistical analysis, Prentice-Hall. 4 ed: Biostatistical analysis, Prentice-Hall, Upper Saddle River; 1999.
109. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT. Obesity and male reproductive potential. *J Androl*. 2006 Sep-Oct;27(5):619-26.
110. Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science*. 1998 May 29;280(5368):1371-4.
111. Archer ZA, Mercer JG. Brain responses to obesogenic diets and diet-induced obesity. *Proc Nutr Soc*. 2007 Feb;66(1):124-30.
112. Tan HM, Gundlach AL, Morris MJ. Exaggerated feeding response to central galanin-like peptide administration in diet-induced obese rats. *Neuropeptides*. 2005 Jun;39(3):333-6.
113. Storlien LH, Baur LA, Kriketos AD, Pan DA, Cooney GJ, Jenkins AB, et al. Dietary fats and insulin action. *Diabetologia*. 1996 Jun;39(6):621-31.
114. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia*. [Clinical Trial Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Mar;44(3):312-9.
115. Deutch B, Dyerberg J, Pedersen HS, Aschlund E, Hansen JC. Traditional and modern Greenlandic food - dietary composition, nutrients and contaminants. . *Sci Total Environ* 2007;384.
116. Coelho DF, Pereira-Lancha LO, Chaves DS, Diwan D, Ferraz R, Campos-Ferraz PL, et al. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameter. . *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011;44.
117. Storlien LH, Huang XF, Lin S, Xin X, Wang HQ, Else PL. Dietary fat subtypes and obesity. *World Rev Nutr Diet*. 2001;88:148-54.
118. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2000 Oct;72(4):905-11.
119. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006 Jun;36(3):485-501.
120. Stanworth RD, Jones TH. Testosterone in obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Front Horm Res*. 2009;37:74-90.

121. Tamler R. Diabetes, obesity, and erectile dysfunction. *Gend Med*. 2009;6 Suppl 1:4-16.
122. Fernandes-Santos C, Evangelista Carneiro R, de Souza Mendonca L, Barbosa Aguila M, Mandarim-de-Lacerda CA. Rosiglitazone aggravates nonalcoholic Fatty pancreatic disease in C57BL/6 mice fed high-fat and high-sucrose diet. *Pancreas*. 2009 Apr;38(3):e80-6.
123. Nascimento FA, Barbosa-da-Silva S, Fernandes-Santos C, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). *Exp Toxicol Pathol*. 2010 Jan;62(1):17-25.
124. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr*. 2010 May;46(3):212-23.
125. Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod*. 2010 Jan;82(1):96-104.
126. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996 Feb 1;334(5):292-5.
127. Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, et al. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest*. 2000 May;105(9):1243-52.
128. Magni P, Motta M, Martini L. Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regul Pept*. 2000 Aug 25;92(1-3):51-6.
129. Smith GD, Jackson LM, Foster DL. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology*. 2002 Jan 1;57(1):73-86.
130. Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2001 Mar;12(2):65-72.
131. Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl*. 2010 Oct;34(5 Pt 1):402-10.
132. Attal J, Courot M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 1963;3:219-41.

133. Muñoz EM, Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Guzman J, Cavicchia JC, et al. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). *Anatomical Records*. 1998;252.
134. Moffit JS, Bryant BH, Hall SJ, Boekelheide K. Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis. *Toxicol Pathol*. 2007 Aug;35(5):719-27.
135. Yang AJ, Cui H, Cui Y, Ye HC, Li Y. Effects on development of the testicle in diet- induced obesity rats. *Wei Sheng Yan Jiu* 2005;34:477–9.
136. Sebokova E, Garg ML, Wierzbicki A, Thomson AB, Clandinin MT. Alteration of the lipid composition of rat testicular plasma membranes by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of Leydig cells and testosterone synthesis. *J Nutr*. 1990 Jun;120(6):610-8.
137. De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, Sanchez de la Cuesta F. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta*. 2000 May 6;1485(1):36-44.
138. Purohit A, Daradka HM. Effect of mild hyperlipidaemia on testicular cell population dynamics in albino rats. *Indian J Exp Biol*. 1999 Apr;37(4):396-8.
139. Purohit A, Sharma A, Vyas KB. Effect of hyperlipidaemia on reproductive organs in male albino rabbits : a histological approach. *Anc Sci Life*. 2004 Apr;23(4):16-9.
140. Biancalana A, Veloso LA, Gomes L. Obesity affects collagen fibril diameter and mechanical properties of tendons in Zucker rats. *Connect Tissue Res*. 2010 Jun;51(3):171-8.

## ANEXO - Comitê de ética em pesquisa



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

**ibrag** Instituto  
de Biologia  
Roberto  
Alcantara  
Gomes

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/027/2012** sobre “**Estudo estrutural da próstata, dos rins e dos testículos de ratos submetidos a diferentes tipos de dietas hiperlipídicas**”, sob a responsabilidade de **Bianca Martins Gregório**, 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 do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **24/04/2012**. Este certificado expira em **24/04/2016**.

Rio de Janeiro, 24 de Abril de 2012.

*Matu*

*Patricia Cristina Lisboa*

Profa. Patricia Cristina Lisboa

CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Sub-Chefe do Deptº de Ciências Fisiológicas  
IBRAG/UERJ - Mat. 34765-8

/ass

Prof. Israel Felzenszwalb

CEA/IBRAG/UERJ

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
biologia@uerj.br