

## Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Fabiane Ferreira Martins

Modulação da obesidade via deficiência de leptina no tecido adiposo marrom e na morfofisiologia reprodutiva de camundongos

> Rio de Janeiro 2017

Fabiane Ferreira Martins

## Modulação da obesidade via deficiência de leptina no tecido adiposo marrom e na morfofisiologia reprodutiva de camundongos

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

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

M386 Martins, Fabiane Ferreira.

Modulação da obesidade via deficiência de leptina no tecido adiposo marrom e na morfofisiologia reprodutiva de camundongos / Fabiane Ferreira Martins – 2017. 101 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade - Teses. 2. Leptina – Teses. 3. Tecido adiposo – Teses. 4. Testículos – Histologia – Teses. 5. Reprodução animal -Teses. 6. Camundongos – Teses. 7. Metabolismo energético – Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.24

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira – CRB7/5302

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

Assinatura

Data

Fabiane Ferreira Martins

### Modulação da obesidade via deficiência de leptina no tecido adiposo marrom e na morfofisiologia reprodutiva de camundongos

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr.Diogo Benchimol de Souza Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

> Rio de Janeiro 2017

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

meus maiores exemplos e incentivadores.

#### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Romão (*In memorian*) e Elderides, pela vida e pelo amor incondicional. Obrigada por acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado guiando meus passos, vocês são motivo de inspiração na busca dos meus sonhos. Meu amor e gratidão por vocês serão eternos...

Ao meu irmão, Ronan, o presente mais lindo que meus pais me deu. Obrigada pela sua doce presença em minha vida, meu porto seguro, você está em tudo e é parte de mim...

À minha família carioca (Leninha, Lu, Ana, Alê e Pedro) pelo carinho, cuidado e acolhida que sempre tiveram comigo. Vocês representam minha segunda família. Lu, obrigada pela ternura e companheirismo no dia-a-dia, você tem grande importância na minha vida e nas minhas conquistas...

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, obrigada pela confiança e por ter me acolhido com sua orientação. Suas sábias palavras foram fundamentais como estímulo e apoio ao longo dessa caminhada. Agradeço ainda pela transmissão e partilha de conhecimentos, são aprendizados que levarei para a vida toda. Meu reconhecimento e admiração pelo senhor.

Aos Professores, Dr<sup>a</sup> Márcia Barbosa Águila e Dr. Luiz Eduardo pelas contribuições com esse trabalho.

Amigos são presentes que escolhemos para nossa vida, aos amigos que mesmo longe fisicamente, estiveram sempre perto, Paulo Bispo, Thais Gastardelo, Beth Ferreira e Patricia Souza, vocês são carinhosamente lembrados e ocupam um lugar muito especial em minha vida.

Às amigas e Professoras do LMMC, Sandra Barbosa, Isabele Bringhenti e Vanessa Souza-Mello por terem me ouvido e aconselhado em vários momentos; e também por terem compartilhado momentos de alegria e descontração. Sandrinha #resisteFabi# e Belle #migasualoka#, vocês fizeram a diferença nos meus dias!

Em especial aos amigos Aline Penna (Vaicy), André Vianna (Ivair), Iara Karise, Thereza Bargut, Fernanda Ornellas (doce Fê), Jorge Medeiros (meu *ob/ob* favorito), Michele Soares e Thatiany Marinho (delicadamente, célula estrelada). As ocasiões do destino acadêmico (quimiotaxia) nos tornaram mais próximos. A convivência diária com vocês me encorajou e suavizou os dias de luta. Aprendi e aprendo muito com vocês! Obrigada pela paciência, pelas ajudas, pelas palavras de otimismo e principalmente por terem me proporcionado tanta liberação de endorfinas, vocês me fizeram sorrir muito! São pessoas e histórias que levarei sempre comigo.

Aos demais amigos e professores do LMMC/BHex, Celina Borges, Luana Camelo, Priscila Carapeto (Pri), Janayna Dias, Francielle Graus, Guilherme Sá, Filipe Gabriel, Wilian Lannes, Tamiris Rachid, Carolina Chamma, Flávia Veiga, Helder Gonçalves, Verônica Aiceles, Flávia Gombar, Raquel, Cristiane (Florzinha), Victor Motta, Thais Ceciliano, Gezileia Lau, Claudio, Ana Lucia, Fernanda Schanuel e Prof<sup>a</sup> Ana Carolina Stumbo. Obrigada pelo cuidado e atenção que sempre tiveram comigo.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia e Microanálises-UNESP, Sebastião Roberto Taboga, Patricia Vilamaior, Luis Falleiros, Maê, Manoel, Ricardinho, Carol Negrin, Marina, Mari Marcielo e Eloisa, pelo carinho, atenção e por me tratarem como membro dessa grande família.

Aos amigos emprestados pela Lu, do Instituto Rio Patrimônio da Humanidade (IRPH), especialmente ao "Conselho dos Jus" (Juliana Oakim e Juliano Tomich) e à Marcinha Niskier que me acompanharam e sempre estiveram na torcida, sintam-se carinhosamente abraçados!

Ao Rilke, companheiro das noitadas de trabalho, pelas brincadeiras e pela presença contínua durante a escrita dessa tese.

Aos secretários do BHEx, Zé Carlos, Carol e Isabel. Obrigada pela atenção e disposição em me ajudar todas as vezes que precisei.

Ao Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina-CEDEME da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, em especial à Dr<sup>a</sup>. Heloisa Allegro Baptista e à sua equipe, pelo fornecimento dos camundongos *ob/ob* e pela atenção a nós dispensada.

Todo conhecimento começa com o sonho. O sonho nada mais é que a aventura pelo mar desconhecido, em busca da terra sonhada. Mas sonhar é coisa que não se ensina, brota das profundezas do corpo, como a alegria brota das profundezas da terra. Como mestre, só posso então lhe dizer uma coisa: Contem-me os seus sonhos para que sonhemos juntos.

Rubem Alves

#### RESUMO

MARTINS, Fabiane Ferreira. *Modulação da obesidade via deficiência de leptina no tecido adiposo marrom e na morfofisiologia reprodutiva de camundongos.* 101 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

A leptina é uma proteína de importante função sinalizadora envolvida nos processos de consumo e gasto energético. A expressão de leptina ocorre no tecido adiposo branco, entretanto, seus receptores estão distribuídos sistemicamente, sendo encontrados na maioria dos órgãos e tecidos. Camundongos nocautes (ob/ob) para leptina desenvolvem obesidade e uma série de disfunções metabólicas, hormonais e reprodutivas. Nosso objetivo foi avaliar a modulação da leptina no tecido adiposo marrom (importante sitio de termogênese e metabolismo) e na morfofisiologia reprodutiva (próstata e testículos) de camundongos controles e ob/ob. Para isso, camundongos machos, com 3 meses de idade, das duas linhagens, C57BL/6J e C57BL/6J-ob/ob foram usados. Os animais foram sacrificados e os tecidos retirados para técnicas moleculares (Western blot-WB e RT-qPCR), e de microscopia de luz e confocal. Em relação ao tecido adiposo marrom (TAM), quando comparado com os camundongos controles, os camundongos ob/ob apresentaram diminuição na expressão gênica de marcadores da via termogênica (β3-AR, PGC1α e UCP1). A redução na expressão de UCP1 foi confirmada também por WB (expressão proteica) e por microscopia confocal (expressão tecidual). Houve alterações na expressão de marcadores na via lipídica (aumento na expressão gênica de PLIN 2 e diminuição na expressão de CPT1, CD36, FABP4, FAS e SREBP1c) e na via da insulina (diminuição na expressão proteica de p-AKT, TC10 e GLUT-4). Os marcadores para inflamação também se mostraram alterados no TAM desses animais, houve aumento na expressão gênica de IL-1β, IL-6, TNF-α e MCP-1. Em relação a próstata, os animais ob/ob apresentaram atrofia macroscópica no lobo ventral, exibindo ácinos com diâmetros reduzidos. No epitélio foi notado hipertrofia e pontos sugestivos de neoplasia intraepitelial. O estroma apresentou maior atividade de remodelamento tecidual com elevada deposição de fibras colágenas e de músculo liso. Ao redor do lobo ventral foi observado deposição de tecido adiposo, o qual expressou IL6 e TNF- $\alpha$ , revelando atividade inflamatória. Nos testículos desses animais, foi observado atrofia com alterações no epitélio germinativo (diminuição de espermatogônias, espermatócitos e espermátides) e ausência de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos. Houve comprometimento das vias esteroidogênica e hormonal (redução na expressão gênica e proteica de 3\BHSD, Star, Aromatase, LHr, FSHr, ER e AR). Dessa forma, nossos resultados mostram que a obesidade via deficiência de leptina gera modulação negativa e impactos nas vias termogênica, lipídica, insulínica e inflamatória do TAM; na morfologia da próstata e nas vias esteroidogênica/hormonal nos testículos dos animais ob/ob. Esses achados contribuem substancialmente para complementar as disfunções metabólicas e reprodutivas relatadas nesses animais.

Palavras-chave: Camundongos ob/ob.Tecido adiposo marrom. Próstata. Testículos.

#### ABSTRACT

MARTINS, Fabiane Ferreira. *Modulation of obesity via leptin deficiency in brown adipose tissue and reproductive morphophysiology of mice.*101 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

Leptin is a protein of important signaling function involved in the processes of consumption and energy expenditure. Leptin is a protein of important signaling function involved in the processes of consumption and energy expenditure. The expression of leptin occurs in white adipose tissue; however, its receptors are distributed systemically, being found in most organs and tissues. Knockout (ob/ob) mice for leptin develop obesity and a series of metabolic, hormonal, and reproductive dysfunctions. The objective of this study was to evaluate the modulation of leptin in brown adipose tissue (important site of thermogenesis and metabolism) and reproductive morphophysiology (prostate and testis) of normal and (ob/ob) mice. For this, 3-monthold male mice of both lines, C57BL/6J and C57BL/6J-ob/ob were used. The animals were sacrificed and the tissues removed for molecular techniques (Western blot-WB and RT-qPCR), and light/confocal microscopy. Regarding brown adipose tissue (BAT), when compared to the control mice, the *ob/ob* mice presented a decrease in the gene expression of thermogenic pathway markers ( $\beta$ 3-AR, PGC1 $\alpha$  and UCP1). The reduction in UCP1 expression was also confirmed by WB (protein expression) and by confocal microscopy (tissue expression). There were alterations in the expression of markers in the lipid pathway (increase in PLIN2 gene expression and decrease in expression of CPT1, CD36, FABP4, FAS and SREBP1c) and in the insulin pathway (decrease in the protein expression of p-AKT, TC10 and GLUT -4). The markers for inflammation were also altered in the TAM of these animals, there was an increase in the gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP-1. Regarding to the prostate, *ob/ob* mice presented macroscopic atrophy in the ventral lobe, exhibiting acini with reduced diameters. In the epithelium hypertrophy and points suggestive of intraepithelial neoplasia were noted. The stromal presented tissue remodeling activity with high deposition of collagen and smooth muscle fibers. Around the ventral lobe was deposition of adipose tissue, which expressed IL6 and TNF- $\alpha$ , revealing inflammatory activity. In the testes of these animals, atrophy with changes in the germinal epithelium (reduction of spermatogonia, spermatocytes and spermatids) and absence of spermatozoa in the lumen of the seminiferous tubules were observed. There was impairment of the steroidogenic and hormonal pathways (reduction in gene and protein expression of 3βHSD, Star, Aromatase, LHR, FSHr, ER and AR). Thus, our results show that leptin deficiency generates negative modulation and impacts on the thermogenic, lipid, insulin and inflammatory pathways of BAT; in the morphology of the prostate and in the steroidogenic/hormonal pathways in the testis of ob/ob animals. These findings contribute substantially to the metabolic and reproductive dysfunctions reported in these animals.

Keywords: *Ob/Ob* mice. Brown adipose tissue. Prostate. Testis.

#### LISTA DE FIGURAS

Termogênese, síntese e oxidação de ácidos graxos e inflamação no tecido adiposo marrom de camundongos *ob/ob* (Artigo publicado)

Figura 1	Modulação da leptina no tecido adiposo marrom (TAM)	27
Figura 2	Dissecção do TAM	29
Figura 3	Imagens termográficas	34
Figura 4	Marcadores termogênicos no TAM	35
Figura 5	Marcadores do metabolismo lipídico no TAM	36
Figura 6	Marcadores para captação de glicose no TAM	37
Figura 7	Marcadores para inflamação no TAM	38
Figura 8	Histologia e imunofluorescência do TAM	40

# Camundongos magros versus camundongos obesos: a próstata ventral revisitada (Artigo publicado)

Figura 1	Próstata humana e de camundongos	
Figura 2	Imagens macroscópicas da próstata	
Figura 3	Histologia da próstata (visão geral)	55
Figura 4	Histologia da próstata ventral (hematoxilina-eosina)5	
Figura 5	Imunofluorescência da próstata ventral	57
Figura 6	Histologia da próstata ventral (ácido periódico de Schiff)	58
Figura 7	Histologia da próstata ventral (estroma)	60
Figura 8	Imunofluorescência da próstata ventral (estroma)	61
Figura 9	Histologia e imunofluorescência da próstata (tecido adiposo	62
	periprostático)	
Figura 10	Diferenças entre a próstata de camundongos magros e obesos	63

# A esteroidogênese prejudicada nos testículos de camundongos deficientes em leptina (*ob/ob*) (Artigo publicado)

Figura 1	Anatomia e histologia dos testículos	73
Figura 2	Diferenças da massa corporal e testicular entre os camundongos	80
	controles e <i>ob/ob</i>	
Figura 3	Histologia dos testículos dos camundongos controles e ob/ob	82
Figura 4	Imunofluorescência e RT-qPCR para PCNA e Caspase3 nos	83
	testículos	
Figura 5	Expressão gênica dos receptores hormonais nos testículos	84
Figura 6	Expressão proteica dos receptores hormonais nos testículos	85
Figura 7	Expressão gênica e proteica das enzimas da via esteroidogênica	
	nos testículos	86
Figura 8	Expressão gênica de Nox5 nos testículos	87

#### LISTA DE TABELAS

# Termogênese, síntese e oxidação de ácidos graxos e inflamação no tecido adiposo marrom de camundongos *ob/ob* (Artigo publicado)

Tabela 1	Primers utilizados no RT-qPCR do TAM	31
Tabela 2	Massa corporal, gasto energético dos camundongos e massa do	33
	ТАМ	

# A esteroidogênese prejudicada nos testículos de camundongos deficientes em leptina (*ob/ob*) (Artigo publicado)

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína kinase
AMPc	Adenosina 3',5'- monofosfato cíclico
AR	Receptor de andrógeno
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina do soro bovino
cDNA	DNA complementar
CD36	Cluster de diferenciação 36
Col 1	Colágeno 1
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase-1
DHT	Diidrotestosterona
DHEA	Desidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ER	Receptor de estrógeno
FABP	Proteína ligante de ácidos graxos
FAS	Ácido graxo sintase
FNDC	Fibronectina tipo III de domínio protéico
FSH	Hormônio folículo estimulante
GE	Gasto energético
GLUT-4	Transportador de glicose-4
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
НРВ	Hiperplasia prostática benigna
HPG	Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal
IL-1β	Interleucina 1beta
IL-6	Interleucina-6
JAK	Proteína janus kinase
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno

MC	Massa corporal		
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1		
MEC	Matriz extracelular		
NPY	Neuropeptídeo Y		
NADPH - Nox 5	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-5		
OBr	Receptor para leptina		
ob/ob	Camundongos deficientes para leptina (C57BL/6J-ob/ob)		
PAS	Ácido periódico de Schiff		
PBS	Tampão fosfato salino		
PGC1α	Coativador 1 alfa do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama		
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática		
РКА	Proteína kinase A		
PLIN-2	Perilipina-2		
POMC	Pró-opiomelanocortina		
PPAR	Receptor ativador de proliferação peroxissomal		
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinases		
QR	Quociente respiratório		
RA-β3	Receptor adrenérgico beta 3		
RNA	Ácido ribonucléico		
SREBP	Proteína obrigatória do elemento regulatório de esterol		
STATs	Proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição		
ТАВ	Tecido adiposo branco		
ТАМ	Tecido adiposo marrom		
ΤΝFα	Fator de necrose tumoral alfa		
u.a.	Unidades arbitrárias		
UCP1	Proteína desacopladora de elétrons 1		
VO <sub>2</sub>	Consumo de oxigênio		

# SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	OBJETIVOS	21
1.1	Geral	21
1.2	Específicos	21
2	TERMOGÊNESE, SÍNTESE E OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS E	
	INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSO MARROM DE	
	CAMUNDONGOS OB/OB (Artigo publicado)	22
3	CAMUNDONGOS MAGROS VERSUS CAMUNDONGOS OBESOS: A	
	PRÓSTATA VENTRAL REVISITADA (Artigo publicado)	46
4	A ESTEROIDOGÊNESE PREJUDICADA NOS TESTÍCULOS DE	
	CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM LEPTINA (OB/OB) (Artigo	
	publicado)	67
	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93

#### INTRODUÇÃO

A leptina é uma importante proteína de função hormonal cuja estrutura varia. Na sua forma inativa é composta por 167 aminoácidos e na forma ativa por 146 aminoácidos (1). O principal sítio de síntese da leptina é no tecido adiposo branco; no entanto, é relatada a presença de leptina e de seus receptores (ObR) em tecidos do sistema nervoso central e também em órgãos periféricos (2). Até o momento, são reconhecidas seis isoformas de Obr (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf) que variam de acordo com a função e localização (3).

Quando a leptina se liga aos seus receptores, a via JAK-STAT - principal via de sinalização da leptina - é ativada. Essa sinalização ocorre nos compartimentos intracelulares da mesma forma que ocorre para as citocinas: através de mecanismos de fosforilação, ativação da proteína janus-kinase (JAK) e de fatores de transcrição chamados de STATs (transdutores de sinal e ativadores de transcrição), em especial o STAT-3. No geral, a leptina se liga ao seu receptor (ObR), um receptor de citocina de tipo 1, que carece de capacidades de autofosforilação e que não apresenta atividade de quinase intrínseca; requerendo, assim, uma quinase auxiliar (JAK) para iniciar uma cascata de sinalização. Após a ligação com a leptina, os JAKs associados aos receptores são ativados e fosforilam-se mutuamente, o mesmo ocorre com a cauda intracelular de seus receptores criando, assim, locais de acoplamento para STAT, o que leva à sua ligação ao DNA e à ativação de genes alvo. Em geral, a ligação de leptina ao ObR desencadeia a fosforilação mediada por JAK, gerando ativação direta de STATs, que por sua vez se ligam diretamente ao DNA e regulam a expressão gênica (4, 5).

A ampla distribuição da leptina e de seus receptores revelam a sua importância para a manutenção de vários processos fisiológicos. A leptina está envolvida principalmente no metabolismo, onde sinaliza as vias de gasto e consumo energético (6). Além disso, sua função está intimamente associada à regulação de mecanismos neuroendócrinos, através de interações diretas com o hipotálamo (7).

No hipotálamo, a leptina controla o apetite e o gasto energético via ativação de neurônios específicos no núcleo arqueado (8). Os principais neurônios envolvidos nesse balanço são chamados de NPY (neuropeptídeo Y) e POMC (pró-

opiomelanocortina). Essas subpopulações de neurônios exercem funções orexigênicas e anorexigênicas, respectivamente. Basicamente, o controle da leptina na homeostase energética ocorre da seguinte maneira: baixas concentrações de leptina resultam em aumento do apetite e supressão do gasto energético via NPY; o contrário, altas concentrações de leptina resultam em inibição do apetite e no aumento do gasto energético via POMC (9, 10).

Esse equilíbrio é essencial para a manutenção da homeostase energética. A obesidade gera resistência hipotalâmica à leptina, desregulando e exercendo efeitos negativos nesse balanço. Os adipócitos do tecido adiposo branco respondem à obesidade com aumento de tamanho, tornando-se hipertróficos e, conseqüentemente, secretando maior quantidade de leptina. Esse aumento na demanda de leptina é caracterizado como hiperleptinemia acompanhada por hiperfagia e diminuição no gasto energético (11).

Atualmente a obesidade tem recebido grande atenção, principalmente em decorrência das alterações metabólicas que ela causa via modulação negativa da leptina. A obesidade é considerada como uma pandemia e o conjunto de doenças que ela desencadeia é classificado como síndrome metabólica (12). Nesse contexto de obesidade *versus* leptina são evidenciadas alterações sistêmicas que afetam órgãos e tecidos de vários sistemas do organismo, incluindo o tecido adiposo marrom (TAM) e os órgãos do aparelho reprodutor (13, 14).

Existe uma relação direta entre obesidade, deficiência de leptina, TAM e modulações na reprodução masculina. Sabe-se que a leptina regula o eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal através da ativação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) (15). O GnRH tem papel fundamental no estímulo da hipófise para a liberação dos hormônios gonadotróficos: FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) (16). Os hormônios gonadotróficos coordenam e mantém os principais mecanismos ligados à reprodução. Em machos, o principal sítio de atuação desses hormônios é o microambiente testicular. O FSH é responsável pela manutenção e suporte da espermatogênese - processo de sucessivas divisões celulares para geração de testosterona, processo chamado de esteroidogênese (17).

A testosterona é o principal hormônio sexual masculino, cuja função primordial é a manutenção das características e fertilidade masculina. A testosterona atua também na modulação de outros tecidos, como por exemplo, a próstata e o TAM (18, 19). Sabe-se que camundongos *ob/ob* possuem uma redução drástica nos níveis plasmáticos de testosterona, cerca de 57 %menor em comparação com camundongos normais (20).

A próstata é uma glândula andrógeno dependente que contribui para formação do sêmen através da produção de uma secreção rica em carboidratos. A atividade secretória da próstata é coordenada e modulada pela testosterona, via ligação a receptores para andrógenos (AR) (21). Receptores para andrógenos foram encontrados recentemente no TAM, onde a testosterona atua na biogênese mitocondrial, favorecendo e aumentando a atividade termogênica do TAM (22). Esses dados revelam que a atividade termogênica do TAM em machos é em grande parte modulada pela leptina, via sistema nervoso simpático e também pela testosterona.

Assim, fica evidente que a obesidade, somada à deficiência de leptina, compromete a homeostase do TAM, da próstata e dos testículos pela modulação negativa do sistema nervoso simpático e do eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal.

Um modelo para estudos sobre a obesidade e a regulação da leptina nos tecidos é o uso de animais nocautes para a expressão de leptina. Camundongos nocautes para leptina (*ob/ob*) vêm sendo amplamente estudados. Esse modelo experimental sofre mutação autossômica recessiva no gene da leptina, localizado no cromossomo 6 (23). Em função disso os animais *ob/ob* desenvolvem obesidade e hiperfagia, seguidas por várias comorbidades metabólicas e hormonais (24).

A proposta do presente estudo é avaliar os efeitos que a obesidade e a ausência de leptina geram no TAM, próstata e testículos de camundongos deficientes para leptina (*ob/ob*). Essa tese foi organizada em três capítulos, um para cada órgão estudado.

#### **1. OBJETIVOS**

#### 1.1 Geral

Em face do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a modulação da obesidade via deficiência de leptina no tecido adiposo marrom e na morfofisiologia reprodutiva, comparando camundongos normais (C57BL/6J) e nocautes para leptina (C57BL/6J-*ob/ob*).

#### 1.2 Específicos

Avaliar a modulação da obesidade via deficiência de leptina sobre:

Massa corporal, gasto energético e temperatura corporal nos

camundongos ob/ob;

- Morfolologia do tecido adiposo marrom;
- Perfis termogênico, lipídico, insulínico e inflamatório do tecido adiposo

marrom;

- Morfologia e remodelamento tecidual da próstata;
- Massa testicular;
- Morfologia testicular e epitélio germinativo;
- Vias hormonais e esteroidogênica.

2. Termogênese, síntese e oxidação de ácidos graxos e inflamação no tecido adiposo marrom de camundongos *ob/ob* (Artigo publicado)

# Termogênese, síntese e oxidação de ácidos graxos e inflamação no tecido adiposo marrom de camundongos *ob/ob*

#### Resumo

O tecido adiposo marrom (TAM) é especializado na produção de calor, entretanto seu metabolismo em camundongos ob/ob ainda gera dúvidas. Com o objetivo de avaliar o TAM de camundongos ob/ob, utilizamos camundongos machos C57BL/6J como controle e C57BL6/J-ob/ob (camundongos deficientes para leptina) com três meses de idade (n = 10). Após o sacrifício, os animais tiveram seu TAM interescapular dissecado, pesado e preparado para análises morfológicas e moleculares. Em comparação com os camundongos controles, os camundongos ob/ob mostraram marcadores de sinalização termogênica reduzidos (expressão gênica do receptor beta 3-adrenérgico, beta3-AR; co-ativador PPARgamma 1 alfa, PGC1alfa e proteína desacopladora de elétrons 1, UCP1). Os camundongos ob/ob também apresentaram comprometimento na expressão gênica para a utilização de lipídeos (a perilipina aumentou, enquanto a expressão de outros marcadores foi reduzida: carnitina palmitoiltransferase-1b, CPT-1b; cluster de diferenciação 36, CD36; proteína ligante de ácidos graxos 4, FABP4; ácido graxo sintase, FAS e proteína obrigatória do elemento regulatório de esterol, SREBP1c). Foi constatada a redução na expressão proteica de marcadores envolvidos na sinalização da insulina (pAKT, TC10 e GLUT4). Além disso, os camundongos ob/ob mostraram aumento da expressão gênica de marcadores de inflamação (interleucina 1 beta, IL-1beta; interleucina 6, IL-6; fator de necrose tumoral alfa, TNFalfa e proteína quimiotática de monócitos 1, MCP-1). Assim, os camundongos ob/ob mostraram redução nos marcadores termogênicos associados à redução na expressão gênica de marcadores relacionados com a síntese, mobilização e oxidação de ácidos graxos, bem como alterações na sinalização da insulina e na expressão gênica de marcadores para inflamação. Os resultados indicam que a falta de substrato para a termogênese e a inflamação local modulam negativamente a sinalização termogênica no TAM dos camundongos ob/ob.

**Palavras-chave:** Obesidade. Tecido adiposo marrom. Termogênese. Inflamação. Biologia molecular.

# Thermogenesis, fatty acid synthesis and oxidation, and inflammation in the brown adipose tissue of *ob/ob* mice

#### Abstract

Brown adipose tissue (BAT) is specialized in heat production, but its metabolism in ob/ob mice is still a matter of debate. We aimed to verify ob/ob mice BAT using C57BI/6J male mice (as the wild-type, WT) and leptin-deficient the C57BI/6J-ob/ob mice, at three months of age (n=10). At sacrifice, animals had their interscapular BAT dissected, weighed, and prepared for morphologycal and molecular analyses. In comparison with the control mice, the ob/ob mice showed reduced thermogenic signaling markers (gene expression of beta 3-adrenergic receptor, beta3-AR; PPARgamma coactivator 1 alpha, PGC1alpha, and uncoupling protein 1, UCP1). The ob/ob mice also showed impaired gene expression for lipid utilization (perilipin was increased, while other markers were diminished: carnitine palmitoyltransferase-1b, CPT-1b; cluster of differentiation 36, CD36; fatty acid binding protein 4, FABP4; fatty acid synthase, FAS, and sterol regulatory element-binding protein 1c, SREBP1c), and altered protein expression of insulin signaling (diminished pAKT, TC10, and GLUT4). Lastly, the *ob/ob* mice showed increased gene expression of markers of inflammation (interleukin 1 beta, IL-1beta; IL-6, tumor necrosis factor alpha, TNFalpha; and monocyte chemotactic protein-1, MCP-1). In conclusion, the ob/ob mice have decreased thermogenic markers associated with reduced gene expression related to fatty acid synthesis, mobilization, and oxidation. There were also alterations in insulin signaling and protein and gene expressions of inflammation. The findings suggest that the lack of substrate for thermogenesis and the local inflammation negatively regulated thermogenic signaling in the *ob/ob* mice.

**Keywords:** Obesity. Brown adipose tissue. Thermogenesis. Inflammation. Molecular biology.

#### Introdução

O tecido adiposo marrom (TAM) tem sido amplamente estudado e sua atividade envolve o metabolismo do organismo como um todo. O TAM está intimamente relacionado com o ganho ou perda de peso. Algumas importantes descobertas sobre a função desse tecido contribuíram para a sua investigação, como por exemplo, a descoberta da sua elevada atividade termogênica e também a identificação da UCP1 (proteína desacopladora de elétrons 1) (25).

Em relação à origem das células diposas do TAM, sabe-se que elas têm origem muito semelhante às células musculares; pois se originam a partir de células progenitoras de miócitos - os mioblastos - que expressam o fator miogênico 5 (Myf5+) (26).

A distribuição e a localização do TAM variam entre roedores e humanos. Em roedores a distribuição é abundante e ocorre como pequenos depósitos encontrados nas regiões interescapular, subescapular e axilar. Em humanos o TAM é encontrado nas regiões cervical, supraclavicular, paravertebral e mediastinal (27, 28). As células funcionais do TAM (adipócitos marrons) são histologicamente preenchidas por inúmeros vacúolos de gordura (multilocular), os quais apresentam cor marrom devido à grande quantidade de mitocôndrias presente nesse tecido (29). Essa presença maciça de mitocôndrias no TAM configura sua principal função: a termogênese. O processo de termogênese é realizado através da UCP1, que está localizada na membrana interna da mitocôndria. A liberação de energia na forma de calor é feita quando a UCP1 promove o desacoplamento da oxidação mitocondrial de substratos de ATP (30).

A termogênese ocorre de duas formas: a primeira - termogênese obrigatória é fruto da energia liberada das reações exotérmicas que ocorrem em todos os órgãos. A segunda - termogênese adaptativa - é desenvolvida como uma resposta de adaptação ao frio ou a alterações na dieta (31).

Sabe-se que a termogênese adaptativa no TAM possui dois propósitos fisiológicos: manter a temperatura corporal e permitir a queima do excesso de energia ingerida. No primeiro caso, a termogênese induzida pelo frio (também chamada de termogênese termorregulatória) visa manter a regulação da temperatura corporal. A

exposição aguda ao frio promove termogênese através da contração involuntária da musculatura esquelética (termogênese "por tremor"). Quando a exposição ao frio se torna crônica, o mecanismo de dissipação de energia sem tremor se instala no TAM (termogênese "por não tremor") (32). No segundo caso, a termogênese induzida pela dieta (ou termogênese metabolorregulatória) é pouco estudada e tem objetivos ainda poucos esclarecidos (32). A primeira grande descoberta desse tipo de termogênese foi ao final da década de 70, quando mostrou-se que a dieta do tipo "cafeteria" (rica em gordura saturada e açúcares simples) favorecia o desenvolvimento da obesidade em modelos animais e estava associada ao recrutamento do TAM (33). Desde então a sua função é discutida. Embora não faça sentido evolucionário que esse tipo de termogênese tenha se desenvolvido para queimar excesso de calorias, mantendo assim a homeostase energética, estudos recentes demonstram um possível dispêndio de energia com o objetivo de manter a ingestão de proteínas e aporte constante de aminoácidos (34, 35).

O controle do TAM é feito pelo sistema nervoso simpático e ocorre principalmente pela liberação e ação da noradrenalina nos receptores adrenérgicos, mais especificamente no receptor adrenérgico beta3 (RA-β3), o mais expresso no TAM. A ligação da noradrenalina desencadeia uma série de eventos bioquímicos: primeiro há a formação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), que ativa a proteína Kinase A (PKA), a qual fosforila a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38α, ativando-a. Isso gera a ativação de várias proteínas nucleares e citoplasmáticas, destacando-se a ativação da via lipolítica e da atividade termogênica (36, 37).

Entre as vias reguladas por AMPc/PKA, encontra-se a de regulação positiva da expressão gênica do coativador 1 alfa do PPARγ (PGC1α), cuja função é induzir a expressão de UCP1 e aumentar a capacidade mitocondrial oxidativa. A regra para que a termogênese ocorra no TAM é que haja presença de substrato para esse processo. É relatado que o TAM pode utilizar como substrato tanto ácidos graxos de triglicérides captados da corrente sanguínea através do receptor CD36 ou previamente estocados no tecido, quanto glicose, captada da corrente sanguínea através do transportador de glicose-4 (GLUT4) (38, 39).

A leptina tem importante papel nesse contexto, pois atua em seus receptores no hipotálamo, aumentando a atividade simpática para o TAM, estimulando e

mantendo o controle da atividade termogênica no TAM (40). A obesidade compromete a função termogênica e as demais atividades metabólicas do TAM através do balanço negativo de leptina e da resistência hipotalâmica à mesma (Figura 1).

A deficiência de leptina em camundongos *ob/ob* resulta em uma diminuição do gasto energético devido à redução na atividade termogênica do TAM (41). No entanto, dados recentes mostram uma atividade normal do TAM em camundongos *ob/ob* sem comprometimento do gasto energético (42, 43).

Esses dados são contraditórios e geram dúvida importante de ser esclarecida, que é o funcionamento do metabolismo em camundongos *ob/ob*: se as alterações no gasto energético estão relacionadas apenas à deficiência de leptina ou também a outras alterações metabólicas neste modelo.

Há certa escassez de dados acerca da biologia celular e molecular do TAM em camundongos *ob/ob*, permanecendo uma questão controversa e não bem estabelecida sobre o metabolismo do TAM nesses animais. Dessa forma, esse estudo concentrou-se na termogênese, na análise da expressão de marcadores envolvidos no metabolismo de lipídeos, carboidratos e nas vias inflamatórias do TAM de camundongos *ob/ob*.





Legenda: A-modulação normal. B-modulação afetada pela obesidade.

Nota: Na obesidade os adipócitos do TAB ficam hipertróficos e secretam maior quantidade de leptina. A hiperleptinemia gera resistência hipotalâmica a leptina e conseqüentemente diminui o estimulo via SNS, o que gera menor atividade da UCP1 e menos termogênese. TAB (tecido adiposo branco), TAM (tecido adiposo marrom), SNS (sistema nervoso simpático), UCP1 (proteína desacopladora de elétrons 1), Lep (leptina)

Fonte: A autora, 2016.

#### Material e Métodos

#### **Protocolo experimental**

Para esse estudo, camundongos machos controles (C57BL/6J) e nocautes para a leptina (C57BL/6J-*ob/ob*) com três meses de idade foram usados (n=10). Os camundongos nocautes foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Animais Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) a partir de uma colônia derivada do Laboratório Jackson (B6.V-Lepob/J, stock no. 000632, Bar Harbor, ME, EUA). Durante o período que permaneceram no biotério, os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e ciclo de luz (sistema Nexgen Allentown Inc., PA, EUA) ( $21 \pm 2^{\circ}$  C, umidade 60  $\pm$  10 %, ciclo claroescuro 12:12 h), com livre acesso à ração e à água.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes) sob o protocolo CEUA/010/2016.

#### Calorimetria indireta, temperatura corporal e massa corporal

O quociente respiratório (QR) e o gasto energético (GE) foram mensurados através do sistema Oxylet (Panlab/Harvard, Barcelona, Espanha). O sistema avalia o metabolismo respiratório por meio da calorimetria indireta, medindo o consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) e o dispêndio de gás carbônico (VCO<sub>2</sub>). Os dados foram coletados dentro de um período de 48 h e as médias foram calculadas. A temperatura corporal foi aferida com os animais conscientes, em temperatura ambiente e com o uso de uma câmera infravermelha modelo FLIR C2 (FLIRSystems, Wilsonville, Oregon, EUA). A massa corporal foi aferida antes do sacrifício em balança de precisão 0,1 g.

#### Sacrifício e obtenção do TAM

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 150 mg/kg de pentobarbital sódico. Foram acomodados em decúbito ventral e o TAM foi acessado através de incisão na região subescapular. O TAM foi removido e cuidadosamente dissecado para liberação do tecido adiposo branco ao redor (Figura 2). Em seguida, o TAM foi pesado e armazenado em congelador a -80° C para posteriores análises moleculares. Alternativamente, amostras de TAM foram armazenadas em solução fixadora de paraformaldeído 4 % tamponada por 24 h para análises de microscopia de luz e confocal.

Figura 2. Dissecção do tecido adiposo marrom subescapular (TAM).

Legenda: A- TAM intacto. As setas mostram o tecido adiposo branco (TAB) que foi removido. B- TAM após remoção do TAB. Asteriscos-TAM.

#### Microscopia de luz e confocal

Após fixação, o TAM foi desidratado, diafanizado, impregnado e incluído em Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Dos blocos obteve-se cortes de 3 µm de espessura que foram corados pela hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas e imagens digitais foram obtidas em microscópio de luz (Nikon modelo 80i, câmera digital DS-Ri1, Nikon Instruments, Inc., Nova Iorque, EUA).

Alternativamente, para imunofluorescência de UCP1, cortes de 5 µm foram colocados em lâminas silanizadas. As lâminas foram tratadas com tampão citrato (pH 6,0 a 60° C por 20 min) para recuperação antigênica e bloqueadas com glicina 2 %em tampão PBS/BSA. Em seguida, foram incubadas overnight a 4° C com anticorpo primário anti-UCP1 (SC-6529; Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:50 em tampão

PBS/BSA 1 %. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário específico conjugado com fluorocromo IgG-Alexa 488 (Invitrogen, CA, EUA). As lâminas foram lavadas com PBS, montadas com Slow Fad Antifad (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), analisadas e fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser (Nikon, modelo C2; Nikon Instruments, Inc., Nova Iorque, EUA).

#### **RT-PCR em tempo real**

Parte do TAM dissecado (50 mg) teve seu RNA total extraído utilizando 70 µl de Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Em seguida, para a fase de separação, foram adicionados 100 µl de clorofórmio seguidos de centrifugação (12.000 rpm, por 10 min a 4° C), o que resultou no aparecimento de quatro fases. O sobrenadante da fase aquosa foi retirado, a parte correspondente ao RNA. A esse, foram adicionados 250 µl de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (12.000 rpm, por 10 min a 4° C) obtendo-se a formação de um precipitado de RNA. O isopropanol foi retirado e ressuspendido com 500 µl de etanol 75 %, seguido por centrifugação (12.000 rpm, por 5 min a 4° C). O etanol foi totalmente removido e o pellet ressuspendido em 10 µl de água deionizada (MiliQ).

A concentração de RNA foi determinada por espectroscopia utilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences). Apenas 1 µg de RNA foi separado e acrescentado de DNAse I (Invitrogen, CA, EUA). O cDNA foi sintetizado utilizando primers Oligo (dT) para RNAm e kit Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado no termociclador BioRad CFX96 (BioRad, Hercules, CA, EUA) e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA).

Os primers foram gerados utilizando o software online Primer3 e estão listados na Tabela 1. A β-actina foi utilizada como controle endógeno para corrigir a expressão dos genes-alvo.

As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95° C), seguidos de 44 ciclos, cada um consistindo em 95° C durante 10 seg e 60° C durante 15 seg, e depois por uma curva de melting

(60 a 95° C, com taxa de aquecimento de 0,1° C/seg). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa de RNAm foi calculada pela equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que  $\Delta CT$  expressa a diferença entre o número de ciclos dos genes-alvo e dos controles endógenos (Bustin).

Tabela 1. Primers de RT-qPCR e respectivas sequências.

Primers	Sentido 5'-3'	Anti-sentido
RA-β3	ACAGGAATGCCACTCCAATC	AAGGAGACGGAGGAGGAGAG
β-actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
CPT1b	GGCTGCCGTGGGACATT	TGCCTTGGCTACTTGGTACGA
FNDC5	GGTGCTGATCATTGTTGTGG	CGCTCTTGGTTTTCTCCTTG
IL-1β	ACGGATTCCATGGTGAAGTC	CTCACAAGCAGAGCACAAGC
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGAGTGA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT
MCP1	GCTGGAGAGCTACAAGAGGATCA	CTCTCTCTTGAGCTTGGTGACAAA
PLIN2	AATATGCACAGTGCCAACCA	CGATGCTTCTCTTCCACTCC
PGC1a	AACCACACCCACAGGATCAGA	TCTTCGCTTTATTGCTCCATGA
TNFα	TCAGCCGATTTGCTATCTCA	TGGAAGACTCCTCCCAGGTA
UCP1	TCTCAGCCGGCTTAATGACT	TGCATTCTGACCTTCACGAC

<u>Abreviaturas</u>: receptor adrenérgico beta3, β3-AR; carnitina palmitoil transferase-1, CPT-1b; fibronectina tipo 1II de domínio proteico 5, FNDC5; interleucina 1beta, IL-1β; interleucina 6, IL-6; proteína quimiotática de monócitos 1, MCP-1; perilipina 2, PLIN2; coativador 1 alfa do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama, PGC1α; fator de necrose tumoral alfa, TNFα; proteína desacopladora de elétrons 1, UCP1.

#### Western blot

Parte do TAM (50 mg) foi adicionado ao tampão de lise RIPA com inibidor de protease, homogeneizado e centrifugado (10.000 rpm por 30 min a 4° C) para posterior quantificação das concentrações proteicas. Após desnaturação (5 min a 100° C), quantidades iguais de proteínas (50 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por eletrotransferência. A membrana foi então bloqueada por incubação em 5 % (p/v) de leite em pó desnatado, diluído em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCL (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCI]) em temperatura ambiente por uma hora, evitando assim ligações inespecíficas. Após, a membrana foi incubada com anticorpo primário overnight, a 4° C.

As seguintes proteínas foram avaliadas: UCP1 (33 kDa; SC-6529; Santa Cruz Biotechnology), proteína Kinase (AKT, 60 kDa; 44-609G; Invitrogen), TC10 (24 kDa; T 8950, Sigma) e GLUT-4 (55 kDa; 07-1404; Millipore).

No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico para a sua origem. A membrana foi revelada por quimioluminescência e as imagens foram obtidas através do sistema ChemiDoc (BioRad, Hercules, CA, EUA). As bandas foram quantificadas de acordo com suas intensidades usando o software ImageJ (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA). A β-actina (SC-81178, Santa Cruz Biotechnology) foi utilizada como fator de correção.

#### Análise estatística

Os dados foram testados para distribuição normal e os valores foram mostrados como as médias  $\pm$  desvio padrão da média. As diferenças entre os grupos foram testadas ultilizando o teste t não pareado, considerando estatisticamente significativo P < 0,05. As análises foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 7.0, LaJolla, CA, EUA).

#### Resultados

#### Massa corporal, gasto energético e massa do TAM

Conforme mostrado pela Tabela 2, em comparação com os camundongos controles, os camundongos *ob/ob* apresentaram um aumento de 81 % na massa corporal (P < 0,0001). O gasto energético também se mostrou alterado nos animais *ob/ob*, sendo 22 % menor em relação aos animais controles (P = 0,0014). Por outro lado, a massa do TAM foi 209 % maior nos animais *ob/ob* (P < 0,0001); essa diferença foi mantida mesmo após correção do TAM pela massa corporal (+70 %, P < 0,0001).

Dadaa	Grupos		
Dados	Controle	ob/ob	
Massa corporal (g)	27.66 ± 1.25	50.18 ± 0.82 <sup>[a]</sup>	
GE (kcal/dia/kg^0.75)	136.30 ± 4.04	106.00 ± 3.58 <sup>[a]</sup>	
Massa do TAM	0.12 ± 0.01	$0.38 \pm 0.01^{[a]}$	
Relação TAM/MC (x10² g)	0.45 ± 0.02	$0.76 \pm 0.02^{[a]}$	

Tabela 2 – Massa corporal, gasto energértico dos camundongos e massa do TAM.

Os valores estão apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Abreviaturas: tecido adiposo marrom, TAM; massa corporal, MC; gasto energético, GE.

#### **Temperatura corporal**

Em comparação com os camundongos controles, os camundongos *ob/ob* apresentaram redução na temperatura corporal. Nos animais controles, a temperatura aferida foi de  $37.5 \pm 0.10^{\circ}$  C, enquanto nos *ob/ob* foi de  $35.28 \pm 0.12^{\circ}$  C (-6 %, *P* < 0,0001) (Figura 3).

Figura 3. Imagens termográficas da temperatura corporal dos camundongos controles e *ob/ob* obtida através de câmera infravermelha.



#### Termogênese

Em relação à expressão gênica dos marcadores para termogênese, os animais *ob/ob* apresentaram redução na expressão de RA- $\beta$ 3 (-73 %, *P* = 0,0332), PGC1 alfa (-51 %, *P* = 0,0027) e UCP1 (-76 %, *P* = 0,0141) quando comparados com os animais controles. A expressão proteica de UCP1 também foi reduzida nesses animais (-74 %, *P* = 0,0296) (Figura 4).



Figura 4. Marcadores termogênicos no TAM.

Legenda: Expressão gênica e proteica da proteína desacopladora de elétrons 1 (UCP1 – C, D). Expressão gênica do receptor adrenérgico beta3 (RA- $\beta$ 3 – A) e do coativador 1 alfa do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PGC1 $\alpha$  –B). Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo).

#### Metabolismo de lipídeos

A expressão gênica de perilipina foi maior nos animais *ob/ob* quando comparados com os animais controles (+339 %, P = 0,0009). Entretanto, a expressão gênica de CPT-1b (-46 %, P = 0.0193), CD36 (-59 %, P = 0,0334), FABP4 (-73 %, P = 0,0012), SREBP1c (-71 %, P = 0,0123) e FAS (-65 %, P = 0,0099) foi menor nos camundongos *ob/ob* (Figura 5).



Figura 5. Marcadores do metabolismo lipídico no TAM.

Legenda: Expressão gênica de perilipina (PLIN2 - A), carnitina palmitoil transferase-1 (CPT1b - B), cluster de diferenciação 36 (CD36 - C), proteína ligante de ácidos graxos-4 (FABP4 - D), proteína obrigatória do elemento regulatório de esterol (SREBP1c – E) e ácido graxo sintase (FAS – F). Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo).

#### Metabolismo de glicose

Em relação à expressão proteica de marcadores envolvidos na captção de glicose, os animais *ob/ob* mostraram redução na expressão de pAKT (-57 %, P = 0,0432), TC10 (-81 %, P < 0,0001) e GLUT4 (-73 %, P = 0,0020) quando comparados aos animais controles (Figura 6).



Figura 6. Marcadores para captação de glicose no TAM.

Legenda: Expressão proteica de proteína kinase (AKT - A), TC10 (B) e transportador de glicose4 (GLUT4 – C). Bandas representativas das respectivas expressões (D). Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo).

#### Perfil inflamatório

De modo geral, todos os genes analisados para inflamação mostraram expressão elevada nos animais *ob/ob* quando comparados com os animais controles: IL-1beta (+134 %, P = 0,0217), IL6 (+311 %, P = 0,0009), TNFalfa (+493 %, P < 0,0001) e MCP-1 (+184 %, P = 0,0217) (Figura 7).


Figura 7. Marcadores para inflamação no TAM.

Legenda: Expressão gênica de interleucina -1beta (IL-1 $\beta$  - A), interleucina 6 (IL-6 – B), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$  - C) e proteína quimiotática de monócitos1 (MCP1 – D). Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo).

#### Estrutura e imunofluorescência do TAM

Conforme mostrado na Figura 8, o TAM dos camundongos controles apresentou um aspecto multilocular com adipócitos preenchidos por numerosas gotas lipídicas. Ao contrário, nos animais *ob/ob*, o fenótipo do TAM se mostrou restrito a pequenas áreas e, na maioria dos campos, o TAM exibiu um fenótipo de tecido adiposo branco - TAB, com adipócitos contendo uma única gota lipídica grande no citoplasma. Em relação à expressão de UCP1, o TAM dos animais *ob/ob* mostrou expressão reduzida, quando comparado com os animais controles. Além disso, a presença do fenótipo de TAB no TAM dos animais *ob/ob* também foi confirmada na imunofluorescência, caracterizado por apresentar gotículas lipídicas maiores. Assim, a expressão de UCP-1 no TAM dos animais *ob/ob* foi evidente somente em áreas que mantinham o fenótipo do tecido adiposo marrom. O TAB subcutâneo também foi analisado e não foi verificada a presença de TAM nesse tecido, indicando então que não houve o "escurecimento" (transformação de tecido adiposo branco em marrom) no TAB desses dois modelos estudados.

Figura 8. Tecido adiposo marrom (TAM) corado com hematoxilina-eosina (A-B) e imunomarcação para expressão de UCP1 (proteína desacopladora de elétrons 1) em microscopia confocal (C-D). Tecido adiposo branco subcutâneo (TAB, E-F) corado com hematoxilina-eosina. Barra de aumento: 10 µm.



#### Discussão

No presente estudo, mostramos que a massa do TAM dos camundongos *ob/ob* foi maior em relação aos camundongos controles e que esse resultado foi acompanhado por alterações moleculares como a diminuição na sinalização da termogênese, desequilíbrio no metabolismo de nutrientes com redução na utilização de lipídeos, alterações na via insulínica e aumento na expressão de marcadores para inflamação.

A importância do TAM para o metabolismo energético é muito clara: camundongos *ob/ob* que receberam transplante de TAM de camundongos normais tiveram redução na sua adiposidade associada ao aumento da expressão de UCP1 e da atividade termogênica do TAM, com consequente melhora na utilização de lipídeos e na sinalização de insulina (44).

Em concordância com a literatura, observamos maior massa corporal associada à maior massa de TAM nos camundongos *ob/ob* quando comparados com os controles (45). Nossos dados confirmaram que o aumento da massa do TAM nos camundongos *ob/ob* está relacionado com o maior acúmulo de lipídeos nesse tecido, gerando um fenótipo de tecido adiposo branco; dados esses que corroboram com estudos recentes (42).

Verificamos que o gasto energético estava menor nos camundongos *ob/ob*; de forma semelhante, alguns estudos apontaram redução substancial no consumo de oxigênio nesse modelo animal (46). Conforme mencionado na literatura, encontramos também, menor temperatura corporal nos camundongos *ob/ob* (46, 47). Contrariamente, outros dados apontam que camundongos *ob/ob* possuem maior consumo energético quando comparados com camundongos controles; e que esses animais podem ter gasto energético semelhante aos controles, independente da temperatura ambiente (42, 43).

E provável, que essas diferenças sobre o gasto energético em camundongos *ob/ob* sejam devido a metodologia de aferição diferentes. No nosso estudo, os dados de gasto energético foram corrigidos pela massa corporal, enquanto que nos demais estudos os dados gerados para gasto energético foram baseados no animal como um todo. Esses dados reforçam que são necessárias maiores investigações para abordar e explorar completamente esse ponto.

O estado metabólico do TAM em camundongos *ob/ob* é uma questão ainda não muito bem elucidada. Estudos anteriores evidenciaram que a termogênese e a expressão de UCP1 são reduzidas no TAM de animais *ob/ob*. No entanto, outros estudos apontam o contrário, ou seja, que o TAM é funcional e não apresenta deficiências em camundongos *ob/ob* (42, 43). Quantidades iguais de gene e de proteína para UCP1 foram encontradas em camundongos *ob/ob* e em camundongos normais (48). Entretanto, em acordância com a literatura recente, nosso estudo apontou menor expressão gênica e proteica de UCP1 no TAM dos camundongos *ob/ob*, dado também confirmado pela imunofluorescência. Notamos ainda, redução na expressão gênica de RA- $\beta$ 3 e PGC1  $\alpha$ , sinalizadores essenciais para a via termogênica. Em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta em camundongos, a expressão de RA- $\beta$ 3 no TAM é prejudicada, o que provavelmente reduz a termogênese (49).

É importante mencionar que em humanos, embora a quantidade de TAM seja inversamente correlacionada com o índice de massa corporal (28), a atividade do TAM é reduzida em homens com excesso de peso e obesos (50).

A expressão gênica de UCP1 e PGC1α, não foi alterada no TAB de animais *ob/ob* quando comparados com controles (48), o que corrobora nosso resultado sobre a ausência de escurecimento compensatório no TAB tanto de camundongos *ob/ob*, quanto em controles.

Os ácidos graxos constituem o principal substrato utilizado na termogênese do TAM (32) e a lipólise intracelular, juntamente com a oxidação de ácidos graxos, são eventos importantes para que ocorra esse processo (51). Observamos grande expressão gênica de perilipina e pequena expressão gênica de CPT1 no TAM dos camundongos *ob/ob*, o que indica lipólise e oxidação reduzidas. Perilipina é um regulador fundamental do armazenamento e liberação de lipídeos. A diminuição da perilipina é o comando para que a lipólise seja iniciada. A ausência de perilipina pode reverter a obesidade (52). Adicionalmente, é relatado que camundongos controles submetidos ao frio possuem elevada expressão de CPT1 no TAM, o que leva ao aumento na oxidação de ácidos graxos (53). Dessa maneira, temos a hipótese que a

taxa de lipólise e de oxidação são baixas no TAM dos camundongos *ob/ob* havendo, portanto, um aumento no acúmulo de gordura e na massa do TAM. Isso indica que a termogênese nesses animais pode ser inibida pela falta de substrato.

Além da lipólise, os ácidos graxos podem se originar da lipogênese. Nossos dados indicam que esse processo é reduzido no TAM dos camundongos *ob/ob*, uma vez que a expressão gênica de SREBP1 e FAS foi menor nesses animais. Camundongos controles submetidos ao frio apresentaram elevada expressão de genes relacionados à lipogênese no TAM, indicando que esse processo é importante para termogênese (54). Somado a isso, nossos resultados concordam com relatos de que camundongos *ob/ob* apresentam diminuição na síntese de ácidos graxos no TAM (55). Entretanto, a corrente sanguínea pode ser também uma fonte de ácidos graxos que nutre o adipócito marrom, sendo nesse caso, imediatamente utilizados para a oxidação ou armazenamento de energia para uso futuro (56).

A exposição ao frio aumenta rapidamente a captação de ácidos graxos no TAM de camundongos, em grade parte, realizada através do CD36 e do FABP4 (54). Observamos redução na expressão gênica dos marcadores CD36 e FABP4 no TAM dos camundongos *ob/ob*. Reiteramos que a redução da termogênese nos camundongos *ob/ob* é provavelmente bloqueada devido a uma menor disponibilidade de substrato.

O acúmulo de lipídeos no TAM pode indicar que a resistência à insulina desenvolve-se primeiro no TAM de camundongos *ob/ob* (55). Apesar de mostrarmos falhas na sinalização da insulina no TAM de camundongos *ob/ob*, os mecanismos da resistência à insulina no TAM de camundongos obesos ainda não são completamente elucidados. Camundongos obesos, via indução por dieta hiperlipídica, apresentam efeitos adversos na sinalização da insulina via PI3K (49). De forma complementar, constatamos alterações na sinalização da insulina no TAM através da expressão reduzida de pAKT, TC10 e GLUT4.

O baixo gasto energético relatado nos camundongos *ob/ob* também pode levar ao desenvolvimento de hiperglicemia e hiperinsulinemia (46). A capacidade e a eficiência da termogênese no TAM podem estar relacionadas à resistência à insulina e à falta de glicose como substrato. Os camundongos *ob/ob* são resistentes à insulina, o que pode inibir a resposta aguda ao frio, devido a uma disponibilidade de glicose menor

(55). Assim, a baixa disponibilidade de glicose como substrato pode contribuir para falhas e redução na termogênese do TAM.

A inflamação local é um mediador da resistência à insulina no TAM, embora esse tecido seja mais resistente à inflamação que o TAB. Na obesidade o TAM também é acometido por processos inflamatórios (49). De forma similar, encontramos elevada expressão gênica de IL 1beta, IL-6, TNF $\alpha$  e MCP1 indicando que o TAM dos camundongos *ob/ob* apresentou inflamação com infiltração de macrófagos. Em camundongos obesos via dieta hiperlipídica também foi verificado aumento na expressão de IL-6 e de TNF $\alpha$  no TAM (57). Além disso, foi observada a redução na expressão de UCP1 devido à infiltração de macrófagos e à inflamação local, possivelmente via TNF $\alpha$  (58). Foi demonstrado também que a IL-1beta suprime o estímulo de AR- $\beta$ 3 e a transcrição de UCP1 (59). Somados, esses dados apontam que a inflamação local pode regular negativamente a termogênese no TAM.

Os camundongos *ob/ob* são deficientes para leptina. A leptina é uma adipocina que atua no sistema nervoso central, inclusive no hipotálamo, onde através da via simpática estimula o gasto energético e a termogênese no TAM (60, 61). No TAM a leptina estimula o AR- $\beta$ 3 que por sua vez induz a expressão gênica de PGC1 $\alpha$  e UCP1, estimulando a termogênese (45). Os camundongos *ob/ob* possuem falhas no metabolismo do TAM devido à ausência de leptina, o que causa o aumento da massa corporal (44). Em função dessas alterações na massa corporal e no metabolismo do TAM, os camundongos *ob/ob* possuem dificuldade em manter a normotermia em ambientes com temperatura inferior à termoneutralidade (43).

É importante relatar que conduzimos esse estudo em uma temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}$  C, considerada leve quanto à exposição de camundongos ao frio, porém suficiente para provocar mudanças na atividade do TAM. Essas atividades incluem o aumento no gasto energetico e na expressão de UCP1 (mudanças que não ocorrem em condições de termoneutralidade em torno de 28-30° C) (62). Vários estudos sobre o metabolismo e função do TAM em roedores foram realizados em uma faixa de temperatura que variou entre 20-22° C (49, 63).

A testosterona apresenta importante papel na modulação da biogênese mitocondrial no TAM, onde está relacionada com o controle transcricional de PGC1α e UCP1. É relatado ainda que a testosterona exerce sua função sobre a perda de peso

através de uma combinação entre a diminuição do gasto energético com o aumento da taxa metabólica, estimulando ou não a atividade do TAM (64). Dessa maneira, acreditamos que parte das alterações na expressão e atividade da UCP1 relatadas nesse estudo possa ter ocorrido também pela redução dos níveis de testosterona, acompanhada de falhas na biogênese mitocondrial do TAM nos camundongos *ob/ob*.

## Conclusão

Nossos achados no TAM de camundongos *ob/ob* mostraram falhas na sinalização da termogênese (RA-β3, PGC1α e UCP1) associadas à redução na expressão de genes relacionados à síntese e à mobilização de ácidos graxos (SREBP1c, FAS, CD36 e FABP4), bem como adiminuição na oxidação de ácidos graxos (menor expressão de CPT1). Demonstramos ainda que o TAM de camundongos *ob/ob* possui alterações na sinalização da insulina (menor expressão proteica de pAKT, TC10 e GLUT4) acompanhadas de aumento na expressão gênica de marcadores para inflamação (IL-1beta, IL-6, TNFα e MCP1). Concluímos, então, que a falta de substrato para a termogênese e a inflamação local modulam negativamente a sinalização no metabolismo do TAM de camundongos *ob/ob*.

# 3. Camundongos magros versus camundongos obesos: a próstata ventral

revisitada (Artigo publicado)

# Resumo

Camundongos obesos (ob/ob) não expressam leptina e como consequência desenvolvem obesidade, hiperfagia, diminuição do gasto energético, aumento da massa corporal, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipotermia e infertilidade. A obesidade causa disfunção reprodutiva com impactos negativos sobre a estrutura da próstata e da fertilidade. Neste estudo comparamos os aspectos estruturais da próstata ventral de camundongos magros e obesos. Camundongos machos de três meses de idade tiveram as suas próstatas dissecadas e preparadas para microscopia de luz e imunofluorescência. Em comparação com os camundongos magros, houve alterações estruturais importantes na próstata ventral dos camundongos obesos. A análise macroscópica mostrou atrofia no lobo ventral da próstata nos camundongos obesos. Os ácinos apresentaram redução no tamanho e no lúmen. No lúmen foi encontrada uma secreção mista, positiva e negativa ao PAS. Também foram observadas modificações epiteliais: o epitélio acinar exibiu hipertrofia e pontos de neoplasia intraepitelial. Nesse epitélio houve ainda expressão de PCNA e Caspase3 sugerindo eventos de proliferação e de morte celular. O estroma da próstata ventral mostrou alta atividade de remodelamento da matriz extracelular com elevada deposição de fibras colágenas e musculares lisas. Ao redor da região ventral foi observada a presença de tecido adiposo branco. A expressão de IL6 e TNFa foi encontrada, indicando inflamação. Em conclusão, a obesidade e deficiência em leptina modulam negativamente a próstata ventral de camundongos ob/ob, afetando diretamente os mecanismos celulares e estruturais necessários para manutenção da morfofisiologia prostática e reprodutiva.

**Palavras-chave:** Colágeno tipo 1. Morfologia. Interleucina 6. α-actina de músculo liso. Reprodução.

# Lean vs. obese mice: the ventral prostate revisited

## Abstract

Obese mice do not express leptin and as consequence develop obesity, hiperphagia, decrease energy expenditure, increased body, fat deposition, hyperglycemia, hyperinsulinemia, hypothermia and infertility. Obesity causes reproductive dysfunction with negative impacts on prostatic structure and fertility. In this study, we compared the morphological and structural aspects of the ventral prostate of lean (C57BL/6J) and obese (C57BL/6J-ob/ob) mice. Three months old male lean and obese mice had their prostates dissected and prepared for light microscopy and immunofluorescence. In comparison to the lean mouse, the obese mouse presented important structural changes in the ventral prostate. Macroscopic analysis showed atrophy in the ventral lobe of the prostate in obesemice. Histologically the atrophy was confirmed, the acini presented reduction in size and lumen. In the lumen was found mixed secretion, positive and negative PAS. Epithelial changes were also observed, the acinar epithelium exhibited hypertrophy and intraepithelial neoplasia points. In this epithelium, there was expression of PCNA and Caspase3 suggesting events of proliferation and cell death. The stroma showed high activity of extracellular matrix remodeling with high deposition of collagen fibers and smooth muscle cells. Around the ventral region, the presence of adipose tissue was observed. The expression of IL6 and TNFa was verified indicating inflammation. Thus, obesity negatively modulates prostate ob/ob mice, directly affecting cellular and structural mechanisms necessary for the maintenance of prostatic and reproductive morphophysiology.

**Key words:** Collagen 1ype 1. Morphology. Interleukin 6. α-actin. Reproduction

## Introdução

Considerada como uma glândula exócrina, a próstata é andrógeno dependente, ou seja, a manutenção das suas funções e morfologia é completamente modulada pela testosterona (65). Andrógenos estão envolvidos com a regulação central do desenvolvimento da próstata, com dupla habilidade: estimular a proliferação celular einibir a morte celular no epitélio glandular (66).

Em humanos, o desenvolvimento inicial da próstata durante a organogênese e o brotamento dos ácinos no período fetal foi considerado a origem do que, classicamente, se denominou de lobos da próstata (67, 68). É marcado pela fusão de lobos distintos que se unem para formar uma estrutura compacta, onde, histologicamente, se distingue três regiões ou zonas: zona central (25 % da glândula), zona de transição e zona periférica (70 % da glândula) (69). Ao contrário, em roedores, a próstata sofre um padrão de lobulação durante a organogênese, tendo a sua estrutura geral organizada em quatro lobos anatomicamente e histologicamente distintos: ventral, lateral, dorsal e anterior (glândula coaguladora) (70) (Figura 1).

Devido a sua semelhança morfofuncional com a próstata humana e também por ser altamente responsiva à testosterona, o lobo ventral da próstata de roedores, também chamado de próstata ventral, é o mais abordado em estudos dessa glândula com finalidade translacional. A próstata ventral parece ser a mais sensível a andrógenos, que pode ser explicado pela rica composição celular da próstata ventral, que consiste marjoritariamente (80-85 % da população celular) de epitélio com células colunares altas secretórias, o tipo de célula prostática mais dependente de esteróides androgênicos (71).

Na próstata ventral, o compartimento estromal é um microambiente composto por células como fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas. Essas células secretam fatores de crescimento, produzem matriz extracelular (MEC) e expressam receptores para andrógenos, estrógenos, receptores adrenérgicos e também receptores para 5α-redutase, importante enzima envolvida na conversão de testosterona em dihidrotestosterona, forma metabolicamente mais potente de andrógenos na próstata (72).

Figura 1. Ilustração da próstata humana com as suas respectivas zonas e da próstata de camundongos com o seu padrão de lobulação.



Fonte: Adaptado deValkenburg and Williams (73)

A MEC se organiza como uma malha de fibras dispostas tridimensionalmente, formando um arranjo no interstício, subjancente à membrana basal (74, 75). Seus componentes estruturais - as fibras do sistema colágeno e do sistema elástico - proporcionam resistência mecânica e flexibilidade, servindo também como substrato para ligações e migrações celulares, eventos que são mediados por glicoproteínas adesivas como a laminina e a fibronectina. Além disso, a estrutura e permeabilidade da MEC são reguladas por proteoglicanas, que sinalizam e modulam a atividade de fatores de crescimento, proteases e inibidores de proteases, participando ativamente no remodelamento da MEC (76).

A obesidade e suas comorbidades afetam diretamente o comportamento epitelial e estromal da próstata ventral. Estudos sobre a próstata ventral de camundongos *ob/ob* mostraram que esses animais têm pré-disposição para o desenvolvimento de tumores nessa glândula, através de elevada atividade de proliferação celular e angiogênese (77). Esssas evidências sobre a obesidade e sua modulação negativa na próstata são pontos importantes de interesse para caracterizar e compreender melhor as alterações morfofuncionais.

Pelo fato de ser um modelo de obesidade, camundongos *ob/ob* têm sido amplamente utilizados em estudos metabólicos, no entanto, as características morfológicas da próstata ventral desses animais não são ainda completamente elucidadas. Dessa forma, nosso objetivo foi traçar um panorama comparativo da próstata ventral entre camundongos magros e obesos, considerando principalmente aspectos estruturais.

Material e Métodos

## Protocolo experimental

Para esse estudo, camundongos machos normais (C57BL/6J) e nocautes para a leptina (C57BL/6J-*ob/ob*) com três meses de idade foram usados (n=10). Os camundongos nocautes foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Animais Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) a partir de uma colônia derivada do Laboratório Jackson (B6.V-Lepob/J, stock no. 000632, Bar Harbor, ME, EUA). Durante o período que permaneceram no biotério, os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e ciclo de luz (sistema Nexgen Allentown Inc., PA, EUA) (21  $\pm$  2° C, umidade 60  $\pm$  10 %, ciclo claroescuro 12:12 h), com livre acesso à ração e à água.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes) sob o protocolo CEUA/010/2016.

#### Sacrifício e obtenção da próstata

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 150 mg/kg de pentobarbital de sódio. Após, foram acomodados em decúbito dorsal na placa de dissecção e uma incisão na região abdominal foi feita na direção caudal, de forma que a pele e os tecidos subcutâneos foram expostos para acessar a próstata. A próstata foi removida e separada para análises macroscópica e de microscopia de luz e confocal. A análise macroscópica usou o estereomicroscópio (Hund, Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Alemanha).

## Microscopia de luz

As próstatas foram fixadas em paraformaldeído 4 %tamponado em tampão fosfato (PBS) por 24 h. Após, foram desidratadas em graduações diferentes de etanol, diafanizadas em xilol, impregnadas em parafina e incluídas em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Dos blocos foram obtidos cortes de 3 µm que foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson e picrossírius. As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Olympus BX51 com câmera digital DP71, Olympus Optical, Toquio, Japão).

#### Microscopia confocal

Para imunofluorescência, cortes de 5 µm foram colocados em lâminas silanizadas. As lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH 6,0 a 60° C por 20 min) para recuperação antigênica e então bloqueadas com glicina 2 % em tampão PBS/BSA. Foram analisadas as seguintes duplas marcações:

a) Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e caspase3;

b) Fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL6);

c) Colágeno tipo 1 (Col1) e alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -actina).

Assim, as lâminas foram incubadas durante a noite a 4° C com os seguintes anticorpos primários:

- a) Rabbit anti-PCNA diluído 1:50 (SC-7907; Santa Cruz Biotechnology) e mouse anti-Caspase3 (NB-500-210; Novus Biologicals) diluído 1:100, em PBS/BSA 1 %;
- b) Goat anti-TNFα diluído 1:100 (SC-1350; Santa Cruz Biotechnology) e rabbit anti-IL6 (AB-1423; Millipore) diluído 1:50, em PBS/BSA 1 %;
- c) Rabbit anti-Col1 diluído 1:100 (AB-292; Abcam) e mouse anti-α-actin (AB-7817; Abcam) diluído 1:100, em PBS/BSA 1 %.

No dia seguinte, as lâminas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário específico conjugado com fluorocromo IgG-Alexa 488 e IgG-Alexa 546 (Invitrogen, CA, EUA). As lâminas foram lavadas com PBS, montadas com Slow Fad Antifad (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA); analisadas e fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser (Nikon, modelo C2; Nikon Instruments, Inc., NY, EUA).

# Resultados

## Análise macroscópica e anatomia total

Em camundongos a próstata é composta por quatro lobos distintos que são posicionados ao redor da uretra. Esses lobos (ventral, lateral, dorsal e anterior) são assim classificados em função da orientação espacial e da localização anatômica que ocupam (o camundongo é quadrúpede) (Figuras 2A, C e E). A próstata ventral ocupa posição anterior à uretra e a envolve bilateralmente, assumindo posição caudal em relação à bexiga urinária (Figura 2A). Em comparação com os camundongos magros, nos camundongos obesos não foi possível identificar macroscopicamente os lobos

ventral, lateral, dorsal e anterior da próstata devido a marcada atrofia nesses lobos, especialmente no lobo ventral (Figura 2A-F).

# Análises histológicas e de imunofluorescência

Histologicamente, a presença de atrofia no lobo ventral da próstata dos camundongos obesos foi confirmada quando comparados com os camundongos magros (Figura 3A-B). Nos camundongos magros, os ácinos da próstata ventral apresentaram forma consistente, revestidos por epitélio do tipo simples, cujas células variam de cubóides a colunares. Esse padrão histológico se mostrou alterado na próstata ventral dos camundongos obesos. Os ácinos acompanharam a atrofia macroscópica, apresentaram-se pequenos e com os diâmetros dos lúmens reduzidos (Figura 4A-C). As células epiteliais desses ácinos mostraram característica hipertrófica, com núcleos irregulares e citoplasma com maior volume (Figura 4D-E). Foram observadas em algumas porções desse epitélio invaginações em direção ao lúmen exibindo aspecto papilar (Figura 4E). Em alguns ácinos foi notada a presença de massa celular intraepitelial com característica proliferativa, indicativa de neoplasia intraepitelial prostática - PIN (Figura 4F-G).

Figura 2. Imagens macroscópicas da próstata dos camundongos magros e obesos (*ob/ob*).



Legenda: VP- próstata ventral; LP- próstata lateral; AP- próstata anterior; DP- próstata dorsal; VS - vesícula seminal; U - uretra; DF- ducto deferente; BL- bexiga urinária. Barra de aumento: 1mm.



Figura 3. Histologia da próstata dos camundongos magros (A) e obesos (B).

Legenda: Visão geral. Setas - atrofia na próstata ventral dos camundongos obesos. **PV**- próstata ventral. Hematoxilina-eosina. Barra de aumento: 200 µm.

Adicionalmente, a dupla marcação para PCNA e Caspase3 foi positiva na próstata ventral dos camundongos obesos quando comparados com os magros, indicando atividade de proliferação e morte celular nos ácinos da próstata desses animais (Figura 5A-F).

Diferenças quanto ao tipo de secreção produzida na próstata ventral também foram verificadas entre esses dois modelos estudados. Nos camundongos magros a secreção observada nos lúmens dos ácinos foi predominantemente PAS positiva de natureza granular. De maneira contrária, nos camundongos obesos os lúmens dos ácinos estavam preenchidos por secreção mista, PAS positiva e negativa, de natureza fluida. As vesículas de secreção se desprenderam da porção apical do citoplasma caracterizando secreção do tipo apócrina (Figura 6A-C).



Figura 4. Cortes histológicos da próstata ventral de camundongos magros (A-B) e obesos (C-G).

Legenda: Notar ácinos e epitélio exibindo histologia normal nos camundongos magros (**A-B**). Observar nos camundongos obesos: ácinos exibindo atrofia com epitélio hipertrófico (asteriscos) (**C-E**); invaginações papilares no epitélio (cabeça de setas) (**E**); presença de massa proliferativa intraepitelial sugestivo de neoplasia intraepitelial prostática (setas) (**F-G**). Hematoxilina-eosina. Barra de aumento: A e C: 20 µm; B e D-F: 10 µm; G: 5 µm.



Figura 5. Immunofluorescência da próstata ventral de camundongos magros (A-C) e obesos (D-F) para proliferação (PCNA) e morte celular (Caspase3).

Legenda: Notar expressão de PCNA e Caspase3 nos ácinos dos camundongos obesos. Barra de aumento: 10 µm.

Figura 6. Cortes histológicos dapróstata ventral de camundongos magros (A) e obesos (C-D) corados com ácido periódico de Schiff (PAS).



Legenda: Notar secreção do tipo PAS positiva e granular nos ácinos dos camundongos magros (asteriscos) (**A**). Observar nos camundongos obesos: ácinos preenchidos por secreção do tipo mista, PAS positiva (s) e PAS negativa de natureza fluida (n) (**B**). Secreção do tipo apócrina (setas) (**C**). Barra de aumento: A: 20 µm; B:10 µm; C: 5 µm.

Em relação ao estroma, verificamos que nos camundongos magros, o estroma da próstata ventral segue o padrão estrutural esperado: constituído por camadas de fibras colágenas que são dispostas ao redor dos ácinos e dos vasos sanguíneos e também por células musculares lisas que circundam esses ácinos. Com o tricrômico de Masson observamos que a próstata ventral dos camundongos obesos apresentou alterações no estroma. Houve aumento na deposição de fibras colágenas entre os ácinos, que foi confirmado também pelo picrossírius (com e sem polarização) (Figura 7A-F). As análises de imunofluorescência com marcação para colágeno tipo 1 e  $\alpha$ -actina de músculo liso corroboraram com os achados histoquímicos, mostrando uma maior deposição de colágeno tipo 1 e  $\alpha$ -actina de músculo liso no estroma da próstata ventral dos animais obesos (Figura 8A-F).

Ao redor da próstata ventral dos camundongos obesos foi observada grande deposição de tecido adiposo branco (Figura 9A-C). Pela imunofluorescência foi verificada atividade inflamatória nesse tecido, constatada através da expressão de IL6 e TNFα (Figura 9D-F).

Figura 7. Cortes histológicos da próstata ventral de camundongos magros (A, C e E) e obesos (B, D e F) corados com: picrossirius – polarização (A-B), picrossirius (C-D) e tricrômico de Masson (E-F).



Legenda: Observar maior deposição de fibras colágenas no estroma, entre os ácinos da próstata dos camundongos obesos (setas). Barra de aumento: A-D: 20  $\mu$ m; E-F: 10  $\mu$ m.



Figura 8. Immunofluorescência da próstata ventral de camundongos magros (A-C) e obesos (D-F) para α-actina de músculo liso e colágeno tipo 1.

Legenda: Notar maior expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso envolvendo os ácinos; e de colágeno tipo 1 no estroma dos camundongos obesos. Barra de aumento: 10  $\mu$ m.

Figura 9. Cortes histológicos da próstata ventral de camundongos magros (A) e obesos (B-C).



Legenda: Notar a presença de tecido adiposo envolvendo a próstata ventral dos camundongos obesos (setas) (**B-C**). Imunofluorescência no tecido adiposo da próstata dos camundongos obesos, notar expressão de Interleucina 6 (IL6) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (**D-F**). Barra de aumento: A, D, E e F: 20 µm, B e C: 10 µm.

## Discussão

Evidenciamos que a próstata ventral dos camundongos obesos apresenta várias alterações macroscópicas e estruturais quando comparada com a próstata dos camundongos magros e resumimos isso na Figura 10.

Figura 10. Esquema comparativo entre a próstata de camundongos magros (A-C) e obesos (D-F) ilustrando as principais alterações macroscópicas, epiteliais e estromais.



Legenda: Observar na próstata do camundongo obeso: atrofia na região ventral (**D**), atrofia nos ácinos e elevada deposição de fibras (**E**), elevada atividade celular na matriz, hipertrofia e proliferação de células epiteliais (**F**).

Fonte: A autora, 2016.

O crescimento e fisiologia da próstata são regulados por hormônios esteróides e modulados por múltiplos fatores endócrinos. A obesidade exerce uma influência negativa sobre esta modulação sendo a causa de várias patologias que afetam a próstata, incluindo alterações no status endócrino, aumento de processos inflamatórios e estresse oxidativo; sendo todos favoráveis no desenvolvimento de doenças nessa glândula, inclusive hiperplasia benigna prostática (HPB) e câncer (78).

Nossos resultados mostraram que a próstata ventral dos camundongos obesos exibiu atrofia macroscópica e acinar, hipertrofia nas células epiteliais e presença de massa celular no epitélio, sugestiva de neoplasia intraepitelial prostática (PIN). A homeostase da próstata é diretamente afetada pela obesidade e suas comorbidades. Os camundongos *ob/ob* não expressam leptina, portanto, são hiperfágicos, hiperinsulinêmicos, hiperglicêmicos e exibem baixos níveis de gonadotrofinas; o que leva ao comprometimento da maturação sexual e fertilidade nesses animais (79, 80).

A diferenciação, crescimento e funções da próstata são eventos essenciais que dependem da ação dos andrógenos. A testosterona e a dihidrotestosterona exercem estímulos na próstata através da ligação a receptores de andrógeno (AR), regulando assim a expressão de vários genes relacionados à fisiologia ao comportamento reprodutivo masculino (81). É bem estabelecido pela literatura que camundongos obesos *ob/ob* têm deficiência hipotalâmica em relação à secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e, consequentemente, uma menor liberação de hormônios gonadotróficos (FSH e LH) gerando assim um déficit nos níveis de testosterona nesses animais (82, 83).

A obesidade ea resistência à insulina afetam o sistema endócrino, alteram o eixo hormonal hipotalâmico-hipofisário-gonadal e diminuem a secreção de testosterona (65). Em acordância com os nossos resultados, demonstrou-se, em um modelo de obesidade induzida por dieta, que a próstata ventral de ratos apresentou atrofia acinar com hipertrofia epitelial. Outro estudo do mesmo grupo evidenciou invaginação epitelial e neoplasia intraepitelial prostática (PIN) na próstata ventral de ratos tratados com dieta hiperlipídica, resultados que também corroboram nossos achados (77, 84).

A modulação negativa na estrutura da próstata ventral de camundongos obesos parece afetar também a atividade secretória das células epiteliais. Verificamos que nos camundongos *ob/ob* a maior parte da secreção liberada foi do tipo PAS negativo,

revelando então secreção com pouca ou nenhuma quantidade de glicoproteínas. Além dessas alterações epiteliais e secretórias, observamos que o estroma da próstata ventral dos camundongos *ob/ob* apresentou um aumento da deposição de fibras colágenas e fibras musculares lisas ao redor dos ácinos, indicando maior atividade de remodelamento tecidual.

O compartimento estromal da próstata é altamente responsivo aos hormônios esteróides, especialmente aos andrógenos. A diminuição nos níveis de andrógenos e o remodelamento tecidual no estroma parecem ser outra resposta da próstata em relação à obesidade, o que envolve alterações morfológicas nas células musculares lisas e aumento na deposição das fibras colágenas (85, 86). As células que compõem o microambiente estromal (fibroblastos e miofibroblastos) são moduladas pela testosterona e os distúrbios na síntese desse hormônio implicam em deficiências diretas na atividade metabólica dessas células. As atividades de síntese, proliferação e adesão de fibroblastos e miofibroblastos ficam totalmente comprometidas na deficiência de testosterona, o que gera uma alta deposição de fibras colágenas e musculares lisas, alterando a composição da MEC (87).

As falhas nas interações epitélio-estroma causadas pela obesidade na próstata dos camundongos *ob/ob* parecem estar associadas à regulação do tecido adiposo. O tecido adiposo é um mediador importante de respostas inflamatórias locais e sistêmicas, que ocorrem principalmente através da secreção e liberação de vários tipos de interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento (88, 89). Ao redor, envolvendo a próstata ventral dos ratos obesos, encontramos grande quantidade de tecido adiposo branco. As imunomarcações para IL6 e TNFα revelaram atividade inflamatória nesse tecido, o que concorda com demonstração prévia, em humanos, de elevada expressão de IL6 e TNFα no tecido adiposo periprostático de indivíduos obesos. O aumento na expressão dessas citocinas está relacionado ao desenvolvimento e progressão de lesões prostáticas e neoplasias epiteliais nessa glândula (90).

Dessa forma, é notório que a obesidade e as disfunções hormonais por ela geradas, causam impactos adversos na próstata ventral de camundongos *ob/ob*.

# Conclusão

Os resultados apresentados pelo nosso estudo fornecem novas informações sobre a caracterização estrutural da próstata de camundongos *ob/ob*. Concluímos que a obesidade e a deficiência em leptina desses animais causa impactos adversos sobre a modulação da próstata ventral, afetando os mecanismos celulares e estruturais necessários para a manutenção da morfofisiologia dessa glândula. Assim, o estudo contribuiu para a compreensão da biologia da próstata em camundongos *ob/ob*, modelo experimental de obesidade amplamente estudado.

# 4. A esteroidogênese prejudicada nos testículos de camundongos deficientes

em leptina (ob/ob) (Artigo publicado)

# Resumo

Comorbidades da obesidade, incluindo a resistência à leptina, causam impactos na função reprodutiva. Os testículos expressam receptores de leptina nas células germinativas e nas células de Leydig. Camundongos deficientes para leptina são obesos e inférteis. Tivemos o objetivo de avaliar como a obesidade pode afetar a estrutura e a via esteroidogênica dos testículos de camundongos deficientes para leptina. Camundongos C57BL/6J (controle) e deficientes para leptina (C57BL/6Job/ob), machos com três meses de idade tiveram os seus testículos dissecados e preparados para microscopia de luz, imunofluorescência e análises moleculares. Comparados aos camundongos controles, os camundongos ob/ob apresentaram maior massa corporal, com testículos menores e alterações no epitélio germinativo caracterizadas por menor número de espermatogônias, espermatócitos espermátides. As células de Sertoli e as células germinativas mostraram núcleos condensados e fragmentação nuclear indicando morte celular, o que corrobora com a fraca expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e forte expressão de Caspase3. Além disso, houve ausência de espermatozoides nos túbulos seminíferos dos camundongos ob/ob. Nos animais ob/ob, a via esteroidogênica foi comprometida (baixa expressão de 3beta-hidroxiesteróide desidrogenase e de proteína reguladora da via esteroidogênica), bem como os receptores hormonais envolvidos na função testicular (redução na expressão de receptores para andrógeno, estrógeno, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante, aromatase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Em conclusão, os resultados indicam alterações morfológicas, hormonais e esteroidogênicas significativas no testículo dos camundongos ob/ob, que podem contribuir para modular negativamente a função testicular, levando à infertilidade.

**Palavras-chave:** Epitélio germinativo. Infertilidade. Biologia molecular. Células de Sertoli. Células de Leydig.

# Impaired steroidogenesis in the testis of leptin-deficient mice (ob/ob)

# Abstract

Obesity comorbidities, including resistance to leptin, impacts the reproductive function. Testes express leptin receptors in the germ cells and Leydig cells. Then, leptindeficient animals are obese and infertile. We aimed to evaluate the impact of obesity on the structure and steroidogenic pathway of testes of deficient leptin mice. Three months old male C57BL/6J mice (wild-type, WT) and deficient leptin (ob/ob) mice had their testes dissected and prepared for light microscopy, immunofluorescence, and molecular analyses. Compared to the WT group, the *ob/ob* group showed a greater body mass with smaller testes, and alterations in the germinative epithelium characterized by fewer spermatogonia, spermatocytes, and spermatids. The Sertoli cells and the germ cells showed condensed nuclei and nuclear fragmentation indicating cell death, in agreement with a weak expression of the proliferating cell nuclear antigen and a strong expression of Caspase3. Also, there was an absence of sperm in the seminiferous tubules of the ob/ob mice. In the ob/ob group, the steroidogenic pathway was compromised (low 3Beta hydroxysteroid dehydrogenase and steroidogenic acute regulatory protein), as well as all hormone receptors involved in the testicular function were down expressed (androgen, estrogen, folliclestimulating, luteinizing, aromatase, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). In conclusion, the findings indicate significant morphological, hormonal and enzymatic changes in the testis of the ob/ob mice that may contribute to modulate the testicular function negatively leading to infertility.

**Keywords:** Germinative epithelium. Infertility. Molecular biology. Sertoli cells. Leydig cells.

## Introdução

A secreção da leptina ocorre principalmente no tecido adiposo branco e seu principal centro de ação é no hipotálamo, onde controla o comportamento alimentar, desempenhado um papel fundamental na manutenção do metabolismo energético (91). Desequilíbrios na síntese e nos níveis de leptina geralmente causam aumento da ingestão alimentar e perda da saciedade, eventos que resultam em obesidade (92).

Como já dissemos nos primeiros capítulos deste trabalho, a obesidade está relacionada a uma série de patologias e desordens funcionais, incluindo diabetes, hipertensão, hipertrofia do tecido adiposo, resistência à insulina, processos inflamatórios e distúrbios na reprodução masculina (83, 93). Tem sido amplamente relatado a prevalência de hipogonadismo e disfunções reprodutivas em homens com obesidade moderada e severa (94).

Os testículos representam o principal órgão ligado à reprodução masculina e desempenham funções exócrina e endócrina. Os testículos são revestidos por uma espessa cápsula conjuntiva, a túnica albugínea. Este órgão é constituído por dois compartimentos: tubular e intertubular. O compartimento tubular é responsável pela produção de espermatozoides e nele encontram-se os túbulos seminíferos que se conectam através de duas extremidades à rede testicular ou rede testis que está localizada na região do mediastino testicular. Os túbulos seminíferos são constituídos pela túnica própria, epitélio seminífero e o lúmen. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e fibras colágenas. Dois tipos celulares de origem embrionária diferentes estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli, de origem somática e as células germinativas ou espermatogênicas. No lúmen tubular encontram-se fluido secretado pelas células de Sertoli e espermatozoides. Já o compartimento intertubular é constituído de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo e células de Leydig (95) (Figura 1). As células de Leydig produzem os andrógenos, responsáveis pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção da espermatogênese nos machos sexualmente maduros. Com exceção das células germinativas, que se originam do epiblasto, a grande maioria das células somáticas constituintes dos testículos é procedente dos ductos mesonéfricos e do epitélio celomático (96).

A importância da leptina para os mecanismos ligados à reprodução e à função testicular em roedores tem recebido atenção. Em animais *ob/ob* a leptina promove o início da puberdade através da regulação do eixo reprodutivo durante as fases prépúbere e púbere (97). Estudos mostram que a leptina mantem a ciclicidade e as funções reprodutivas em humanos e roedores e que restaura a função reprodutiva suprimida em camundongos *ob/ob* (98).

Os receptores para leptina (ObR) são expressos em vários tecidos. Nos testículos existe expressão de ObR nas células de Leydig, nas células de Sertoli, nas células germinativas e nos espermatozoides (99). No entanto, concentrações adequadas de leptina são necessárias para ativação desses receptors. Elevadas quantidades de leptina geram resistência hormonal contribuindo para o desenvolvimento da deficiência de andrógenos em machos obesos (100).

Dessa maneira, fica evidente que a deficiência de leptina e a obesidade geram importantes anomalias reprodutivas, tais como o hipogonadismo e a subfertilidade associada à menor produção de testosterona. Isso pode ser atribuído a alterações na síntese, na secreção de diferentes hormônios derivados do tecido adiposo branco e nas suas modulações das células testiculares, principalmente as células de Leydig (101).

Os mecanismos pelos quais a leptina regula a função reprodutiva envolvem ações em vários níveis do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG) (102). Os camundongos *ob/ob* são um importante modelo para entender a importância da leptina na regulação do HPG. Esses animais, assim como os homens obesos, mostram níveis reduzidos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) com consequente redução na liberação dos hormônios gonadotróficos (FSH e LH). A ausência dos hormônios gonadotróficos geram supressão na síntese de testosterona, principal andrógeno masculino, afetando diretamente a espermatogênese e a esteroidogênese nos testículos (101, 103).

Os andrógenos constituem uma classe de hormônios sexuais derivados do colesterol, encontrados em diversas formas nos mamíferos (104). Pertencem ao grupo

de esteróides androstanos que são compostos de 19 átomos de carbono (105). O principal andrógeno produzido pelo testículo é a testosterona correspondendo a 95 % dos andrógenos totais encontrados na circulação sanguínea. Entretanto, outros compostos de menor atividade androgênica também podem ser secretados pelo testículo, como a diidrotestosterona (DHT), a desidroepiandrosterona (DHEA), a androstenediona e a androstenodiol. A DHT é formada a partir da testosterona sob a ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase, sendo a forma de andrógeno mais potente metabolicamente. A DHEA, a androstenodiona e a androstenodiola são precursoras da testosterona e metabolicamente mais fracas (104, 105).

A biossíntese dos andrógenos envolve alteração progressiva do colesterol pela ação de várias enzimas específicas (106). Na fase biossintética inicial, o colesterol é transportado para a membrana interna da mitocôndria pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese (Star), sendo irreversivelmente convertido em pregnenolona pela citocromo P450scc, que cliva sua cadeia lateral (107). Então, a pregnenolona é direcionada para o retículo endoplasmático liso e convertida em diferentes formas moleculares devido à ação de enzimas específicas. A 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) promove a conversão da pregnenolona em progesterona; a 17 $\alpha$ -hidroxilase/C17,20-liase (17OHase/C17,20-liase–citocromo P450c17) ativa a conversão da progesterona em 17-hidroxiprogesterona e em androstenediona. Finalmente, a 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (106).

A testosterona é um hormônio essencialmente responsável pelas características masculinas e pela manutenção da fertilidade em homens. A secreção da testosterona ocorre principalmente nas células de Leydig sob o estímulo de LH, processo conhecido como esteroidogênese. Além disso, a testosterona atua nas células de Sertoli, onde é responsável pelo suporte da espermatogênese. Os desequilíbrios que a obesidade e a deficiência de leptina causam nos níveis de testosterona resultam em infertilidade principalmente por falhas nesses dois eventos: esteroidogênese e espermatogênese (108, 109).

Além da síntese de testosterona, as células de Leydig também produzem estrógenos, pois elas expressam a enzima P450 aromatase (P450arom) que catalisa a aromatização da testosterona em estrógeno (110). Outras enzimas como a 11β-hidroxiesteróide esteróide desidrogenase (11β-HSD), 3α-HSD e a 5α-redutase

também estão envolvidas na síntese e no metabolismo dos esteróides. A 11β-HSD catalisa a oxidação da corticosterona para o metabólico inativo 11dehidrocorticosterona em células de Leydig de ratos (111, 112).

A espermatogênese é um processo cíclico e organizado que ocorre nos túbulos seminíferos, onde as espermatogônias diplóides se diferenciam em uma célula haploide madura, o espermatozoide. Este processo, composto por diferentes associações celulares, é um dos mais produtivos sistemas de autorrenovação do corpo animal, durando cerca de 30 a 78 dias nos mamíferos. A espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (2) fase meiótica ou espermatocitogênica, onde o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase importante para adiversidade genética entre membros da mesma espécie; (3) fase de espermiogênese ou de diferenciação, na qual células haplóides, as espermátides, transformam-se em células altamente especializadas e estruturalmente maduras para alcançar e fertilizar os oócitos (113, 114) (Figura 1).

Camundongos *ob/ob* têm sido amplamente estudados, principalmente em estudos voltados para obesidade e metabolismo. Entretanto, alguns mecanismos envolvidos nas falhas da biologia reprodutiva desses animais não são ainda completamente compreendidos. Assim, nosso objetivo foi avaliar a morfologia testicular e os mecanismos moleculares envolvidos na esteroidogênese de camundongos *ob/ob*.



Figura 1. Esquema ilustrando a estrutura anatômica do testículo (A).

Legenda: Detalhe de um corte histológico do túbulo seminífero **(B)** mostrando o epitélio germinativo com diferentes células da espermatogênese e as interações com o interstício e com as células de Leydig

Fonte: Adaptado de Junqueira (29).
## Material e Métodos

## **Protocolo experimental**

Para esse estudo foram usados camundongos machos controles (*C57BL/6J*) e nocautes para a leptina (*C57BL/6J-ob/ob*) com três meses de idade (n=10). Os camundongos nocautes foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Animais Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) a partir de uma colônia derivada do Laboratório Jackson (B6.V-Lepob/J, stock no. 000632, Bar Harbor, ME, USA). Durante o período que permaneceram no biotério, os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e ciclo de luz (sistema Nexgen Allentown Inc., PA, EUA) (21  $\pm$  2° C, umidade 60  $\pm$  10 %, ciclo claroescuro 12:12 h), com livre acesso à ração e à água.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (Publicação número 85-23 do NIH, revisada em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal local (Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes) sob o protocolo CEUA/010/2016.

## Sacrifício e obtenção dos testículos

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 150 mg/kg de pentobarbital de sódio. Após, foram acomodados em decúbito dorsal na placa de dissecção e uma incisão na região pélvica foi feita, na direção caudal, de forma que a pele e os tecidos subcutâneos foram expostos para acessar os testículos. Os testículos foram removidos, pesados e separados para análises moleculares, macroscópicas e de microscopia de luz e confocal. As análises macroscópicas foram realizadas utilizando estereomicroscópio (Hund, Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Alemanha).

## Microscopia de luz

Os testículos foram fixados em líquido de Bouin e em paraformaldeído 4 % tamponado em tampão fosfato (PBS) por 24 h. Após, foram desidratados em graduações diferentes de etanol, diafanizados em xilol, impregnados em parafina e incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Dos blocos foram obtidos cortes de 3 µm de espessura que foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina e ácido periódico de Schiff (PAS). Alternativamente, alguns fragmentos dos testículos foram fixados em resina EPON-818 (Electron Microscopy Sciences, EMS Hatfield, PA, EUA). Cortes semifinos de 1 µm de espessura foram obtidos em ultramicrótomo (Leica EMUC6 ultramicrótomo, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH. Wetzlar, Alemanha) e postos em lâminas, que foram coradas com azul de toluidina. As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Olympus BX51 com câmera digital DP71, Olympus Optical, Toquio, Japão).

## Microscopia confocal

Para imunofluorescência, cortes de 5 µm foram postos em lâminas silanizadas. As lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH 6,0 a 60° C por 20 min) para recuperação antigênica e, então, bloqueadas com glicina 2 % em tampão PBS/BSA. Após, as lâminas foram incubadas overnight a 4° C com os seguintes anticorpos primários: rabbit anti-PCNA diluído 1:50 (SC-7907; Santa Cruz Biotechnology) e mouse anti-Caspase3 (NB-500-210; Novus Biologicals) diluído 1:100, em PBS/BSA 1 %. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário específico conjugado com os fluorocromos IgG-Alexa 488 e IgG-Alexa 546 (Invitrogen, CA, EUA). As lâminas foram lavadas com PBS, montadas com Slow Fad Antifad (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA); analisadas e fotografadas em microscópio confocal de varredura a laser (Nikon, modelo C2; Nikon Instruments, Inc., NY, EUA).

#### **RT-PCR em tempo real**

Parte do testículo dissecado (cerca de 50 mg) teve seu RNA total extraído utilizando 70 µl de Trizol (Invitrogen, CA, EUA). Em seguida, para a fase de separação, foram adicionados 100 µl de clorofórmio seguidos de centrifugação (12.000 rpm, por 10 min a 4° C), o que resultou no aparecimento de quatro fases. O sobrenadante da fase aquosa foi retirado, parte correspondente ao RNA. A esse, foram adicionados 250 µl de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (12.000 rpm, por 10 min a 4° C) obtendo-se a formação de um precipitado de RNA. O isopropanol foi retirado, ressuspendido com 500 µl de etanol 75 %, seguido por centrifugação (12.000 rpm, por 5 min a 4° C). O etanol foi totalmente removido e o pellet ressuspendido em 10 µl de água deionizada (MiliQ).

A concentração de RNA foi determinada por espectroscopia ultilizando o equipamento Nanovue (GE Life Sciences). Apenas 1µg de RNA foi separado e acrescentado de DNAse I (Invitrogen, CA, EUA). O cDNA foi sintetizado utilizando primers Oligo (dT) para RNAm e kit Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado no termociclador BioRad CFX96 (BioRad, Hercules, CA, EUA) e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA).

Os primers foram gerados utilizando o software online Primer3, e estão listados na Tabela 1. A β-actina foi utilizada como controle endógeno para corrigir a expressão dos genes-alvo.

As reações de amplificação seguiram as seguintes condições: pré-desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95° C), seguidos de 44 ciclos, cada um consistindo em 95° C durante 10 seg e 60° C durante 15 seg, e depois por uma curva de melting (60 a 95° C, com taxa de aquecimento de 0,1° C/seg). Os controles negativos consistiram de poços em que CDNA foi substituído por água deionizada. A razão de

Tabela 1. Primers de RT-qPCR e respectivas sequências.

Primers	Sentido 5'-3'	Anti-sentido
AR	CCGCCGACATTAAAGACATT	CTGCTGCCTTCGGAGATTAC
Aromatase	ATCCACACTGTTGTGGGTGA	GCCGTCAATTACGTCATCCT
Beta actina	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
Caspase3	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC	CAGAGCGAGATGACATTCCA
Er	TGCAATGACTATGCCTCTGG	CTCCGGTTCTTGTCAATGGT
Fshr	CTCTGGGCCAGTCGTTTTAG	CTGGCCCTCAACTTCTTCAG
Lhr	CTGAAAACTCTGCCCTCCAG	CTTTCTTCGGCAAATTCCTG
Nox5	GATCTTCTTCATCGGCCTTG	GATCTTCTTCATCGGCCTTG
PCNA	TAGCCACATTGGAGATGCTG	GGTTACCGCCTCCTCTTCTT
Star	TTGGGCATACTCAACAACCA	TGACATCAATGACAGCAGCA
3Bhsd	TGCAGACAAAGACCAAGGTG	TGACATCAATGACAGCAGCA

<u>Abreviaturas</u>: receptor de andrógeno, *Ar*, *receptor de estrógeno*, *Er*, receptor de hormônio folículo estimulante, *Fshr*, receptor de hormônio luteinizante, *Lhr*, nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato 5, *Nadph-Nox5*; antígeno nuclear de proliferação cellular Proliferating, *PCNA*; proteína reguladora da via esteroidogênica, *Star*, 3Beta hidroxiesteroide desidrogenase, *3bhsd*.

## Western blot

Parte do testículo (cerca de 50 mg) foi adicionado ao tampão de lise RIPA com inibidor de protease, homogeneizado e centrifugado (10.000 rpm por 30 min a 4° C) para posterior quantificação das concentrações proteicas. Após a desnaturação (5 min a 100° C), quantidades iguais de proteínas (50 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por eletrotransferência. A membrana foi então bloqueada por incubação em 5 % (p/v) de leite em pó desnatado, diluído em tampão salina com Tris (TBS-T [20 mmol/L de Tris/HCL (pH 7,4) e 500 mmol/L de NaCI]) em temperatura ambiente por 1 h, evitando assim ligações inespecíficas. A membrana foi ana foi incubada com anticorpo primário overnight, a 4° C. As seguintes proteínas foram avaliadas:

- a) Receptor de estrógeno, ER (68 kDa; SC-542; Santa Cruz Biotechnology);
- b) Receptor de hormônio folículo estimulante, FSHR (76 kDa; SC-7798; Santa Cruz Biotechnology);
- c) Receptor de hormônio luteinizante, LHR (85 kDa; SC 25828; Santa Cruz Biotechnology);
- d) OBR (receptor de leptina) (80 kDa; SC-8391; Santa Cruz Biotechnology);
- e) Proteína reguladora da via esteroidogênica, STAR (27 kDa; Ab-58013; Abcam).

No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico para a sua origem. A membrana foi revelada por quimioluminescência e as imagens foram obtidas através do sistema ChemiDoc (BioRad, Hercules, CA, EUA). As bandas foram quantificadas de acordo com suas intensidades usando o software ImageJ (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA). A  $\beta$ -actina (SC-81178, Santa Cruz Biotechnology) foi utilizada como fator de correção.

## Análise estatística

Os dados foram testados para distribuição normal e os valores foram mostrados como as médias  $\pm$  desvio padrão da média. As diferenças entre os grupos foram testadas ultilizando o teste *t* não pareado, considerando estatisticamente significativo P < 0,05. As análises foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, versão 7, LaJolla, CA, EUA).

## Resultados

#### Análises corporais e macroscópicas dos testículos

Conforme esperado, a diferença da massa corporal entre os camundongos controles e *ob/ob* foi muito acentuada. Os camundongos *ob/ob* mostraram massa corporal 83 % maior do que os camundongos controles (P < 0,0001) (Figura 2A-C). Por outro lado, o peso dos testículos do grupo *ob/ob* foi 13 %menor em comparação ao peso testicular dos camundongos controles (P < 0,0001). As imagens macroscópicas dos testículos confirmaram esses dados; os testículos dos animais *ob/ob* apresentaram-se menores em comparação aos testículos dos animais controles, indicando atrofia testicular nos camundongos *ob/ob* (Figura 2D-F).

Figura 2. Diferenças da massa corporal (A-C), e da massa testicular (D-F) entre os camundongos controles e *ob/ob*. Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo).



0.000

C57BL/6J

Ob/Ob

#### Análises histológicas e de imunofluorescência

Houve atrofia testicular no grupo *ob/ob*. Os túbulos seminíferos mostraram-se significativamente menores e os tipos celulares que compõem o epitélio germinativo (espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas) mostraram-se menos frequentes nesses animais (Figura 3A-B). As análises pelo PAS, além de comprovarem essas alterações no epitélio germinativo, mostraram ausência de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos dos animais *ob/ob* (Figura 3C-D).

Alterações nucleares também foram observadas nas células do epitélio germinativo no grupo *ob/ob*. A coloração pelo azul de toluidina mostrou que o volume nuclear das células de Sertoli, das espermatogônias e dos espermatócitos foi menor nesses animais. Além disso, fica evidente a presença de fragmentação nuclear nas espermatogônias e o epitélio germinativo menos proliferativo, eventos que caracterizam processos de morte celular (Figura 3E-F).

A dupla marcação revelou a expressão de PCNA no epitélio germinativo tanto de camundongos controles quanto de camundongos *ob/ob*, porém com expressão mais intensa nos camundongos controles. A Caspase3 foi expressa somente no epitélio germinativo dos animais *ob/ob* (Figura 4A-F). Esses resultados corroboram com dados da expressão gênica de PCNA e Caspase3. No grupo *ob/ob* a expressão gênica de PCNA foi 186 % menor, ao passo que a expressão de Caspase3 nesse grupo foi 166 % maior, em comparação com os camundongos controles (Figura 4G-H).



Legenda: O epitélio germinativo dos túbulos seminíferos nos camundongos *ob/ob* exibe menor quantidade de células em comparação com os camundongos controles. **A-B** (hematoxilina-eosina): EA – espermátides alongadas; ER – espermátides arredondadas; SC – células de Sertoli; SG – espermatogônias; SPs – espermatócitos. **C-D** (ácido periódico de Schiff): cabeça de setas - espermatozoides. Notar ausência de espermatozoides no lúmen (L) dos túbulos seminíferos nos camundongos *ob/ob*. **E-F** (azul de toluidina): cabeças de setas- espermatogônias, setas brancas – células de Seroli, asteriscos - espermatócitos. Nos camundongos *ob/ob*, as células de Sertoli, os espermatócitos e as espermatogônias (cabeças de setas) mostraram condensação e fragmentação nuclear sugestivo de apoptose. Barra de aumento A-D = 10 µm; E-F = 5 µm.



Figura 4. Imunofluorescência e RT-qPCR.

Legenda: A expressão do antigeno nuclear de proliferação cellular (PCNA) e da Caspase3 foi detectada por imunofluorescência (A-F) e RT-qPCR (G-H) nos testículos dos camundongos controles e *ob/ob*. Nos camundongos *ob/ob* foi observado baixa expressão de PCNA associada a elevada expressão de Caspase3 em comparação com os camundongos controles. Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Barra de aumento = 10 µm.

## Expressão gênica e proteica dos receptores hormonais

Observamos expressão gênica reduzida para *Fshr* (-70 %, *P* = 0,001), *Lhr* (-68 %, *P* = 0,006), *Er* (-52 %, *P* = 0,015) e *Ar* (-108 %, *P* = 0,029) nos testículos dos camundongos *ob/ob*, quando comparados com os camundongos controles (Figura 5). Semelhantemente, a expressão proteica dos receptores hormonais também foi reduzida nos testículos dos animais *ob/ob*: FSHR (-107 %, *P* = 0,013), LHR (-139 %, *P* = 0,018), ER (-75 %, *P* = 0,010) e OBr (-77 %, *P* = 0,016) (Figura 6).

Figura 5. Expressão gênica dos receptores hormonais nos testículos dos camundongos controles e *ob/ob*.



Legenda: Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Abreviaturas: receptor de hormônio folículo estimulante, *Fshr*, receptor de hormônio luteinizante, *Lhr*, receptor de estrógeno, *Er*, receptor de andrógeno, *Ar*.



Figura 6. Expressão proteica de receptores hormonais nos testículos de camundongos

Legenda: Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Abreviaturas: receptor de hormônio folículo estimulante, FSHR; receptor de hormônio luteinizante, LHR; receptor de estrógeno, ER; receptor de leptina, OBr.

## Expressão gênica e proteica de enzimas da via esteroidogênica

A expressão gênica das enzimas*Star*, *3Bhsd* e *Aromatase* também ficaram comprometidas nos testículos dos camundongos *ob/ob*, quando comparados com os camundongos controles: *Star* (-97 %, P = 0,020), *3Bhsd* (-88 %, P = 0,009) e *Aromatase* (-131 %, P = 0,006). Adicionalmente, a expressão proteica da STAR também foi reduzida nesses animais (-43 %, P = 0,021) (Figura 7).



Figura 7. Expressão gênica e proteica de enzimas da via esteroidogênica nos testículos de camundongos controles e *ob/ob*.

Legenda: Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Abreviaturas: proteína reguladora da via esteroidogênica, Star/STAR; 3Beta hidroxiesteroíde desidrogenase, 3Bhsd.

## Expressão gênica de Nox5

Em comparação com os camundongos controle a expressão gênica de Nox5 foi 220 % menor (P = 0,001) nos testículos dos camundongos *ob/ob* (Figura 8).

Figura 8. Expressão gênica de *Nox5* nos testículos de camundongos controles e *ob/ob*.



Legenda: Dados apresentados como media ± desvio padrão da média (n=5 por grupo). Abreviatura: nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato 5, *Nox5.* 

#### Discussão

Esse estudo mostrou como a obesidade e a deficiência em leptina modulam negativamente a morfologia e as principais vias moleculares envolvidas na esteroidogênese testicular, fatores estes que podem comprometer e prejudicar a fertilidade masculina.

Nossos achados sugerem que a leptina tem um papel importante na modulação da função testicular através da regulação e manutenção da massa corporal, que nesse caso foi significativamente maior nos animais *ob/ob* (quase duas vezes) em comparação aos animais controle. Em condições normais a leptina regula a massa corporal estabelecendo um equilíbrio, inibe a ingestão de alimentos e aumenta a termogênese no tecido adiposo marrom via sistema nervoso simpático (115).

Observamos diversas alterações nos testículos dos camundongos *ob/ob*. Macroscopicamente notamos atrofia que foi confirmada pelas análises histológicas; além disso, notamos que os túbulos seminíferos estavam menores, com celularidade anormal no epitélio germinativo e sem espermatozoides no lúmen, contrariamente ao observado nos camundongos controle. As células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) apresentaram-se notavelmente menos numerosas, com proliferação reduzida, sugerindo morte celular.

A apoptose nos testículos é gerada por mecanismos celulares que diminuem o nível de proliferação das células germinativas e é caracterizada por fragmentação internucleosomal de DNA e condensação de cromatina (116). Nossos resultados mostraram fragmentação e condensação nuclear nas espermatogônias e nos espermatócitos do epitélio germinativo nos camundongos *ob/ob*, resultados que corroboram e reforçam os eventos de morte celular observados nos testículos desses animais.

Adicionalmente a esses achados morfológicos, a ausência de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos reforça a ideia de que os camundongos *ob/ob* apresentam falhas e comprometimento da espermatogênese. De fato, já mencionamos que a deficiência de leptina e a obesidade provocam distúrbios no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, tornando os camundongos *ob/ob* inférteis pela deficiência na produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A ausência ou deficiência na produção e liberação de GnRH afeta diretamente a liberação dos hormônios gonadotróficos pela hipófise (hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)), causando defeitos nos processos de espermatogênese e de esteroidogênese testicular (117, 118).

As análises moleculares mostraram redução significativa nas expressões gênica e proteica dos receptores hormonais gonadotrópicos (Fshr / FHSR, Lhr / LHR) e dos receptores hormonais sexuais (AR, Er / ER) nos camundongos *ob/ob*, indicando que os hormônios (LH, FSH, testosterona e estradiol) estão igualmente reduzidos nos camundongos *ob/ob*. Embora os camundongos *ob/ob* sejam deficientes para leptina, eles ainda mantiveram a expressão de receptores OBR, embora notavelmente inferior aos camundongos normais.

Além do hormônio luteinizante, a atividade esteroidogênica das células de Leydig é mediada por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas envolvidas no processo de conversão do colesterol em testosterona (119, 120). Avaliamos as expressões gênicas e proteicas das principais enzimas envolvidas nesse processo. Como esperado, as expressões Star / STAR, Aromatase e 3Bhsd diminuíram nos camundongos *ob/ob* em comparação com os camundongos controle, reforçando que há prejuízo na esteroidogênese desses animais. O défict de testosterona nos animais *ob/ob* relatado por alguns estudos foi também comprovado no presente estudo através da redução na expressão dos receptores para andrógenos (AR). Semelhantemente, alguns estudos sobre obesidade e impactos na reprodução evidenciaram níveis de testosterona reduzidos em ratos machos tratados com dieta hiperlipídica (121, 122).

O estradiol é a forma predominante de estrogênio e, em níveis adequados, desempenha um importante papel na reprodução masculina. Em machos, o estradiol é essencial para a modulação da libido, para a função erétil e também para a espermatogênese. Receptores para estradiol (ER) e aromatase (enzima responsável pela conversão de testosterona em estradiol) são abundantes no pênis e nos testículos (123, 124). Nos testículos dos animais *ob/ob*, as expressões Er/ER foram menores do que nos animais controle. Esse conjunto de alterações nos receptores hormonais, somado às alterações nas enzimas da via esteroidogênica encontradas

nos animais *ob/ob,* são pontos relevantes para explicar as disfunções acerca da infertilidade relatada nestes animais.

Também avaliamos a expressão gênica da NADPH oxidase 5 nos testículos. As NADPH oxidases pertencem à família de enzimas NOX que existem em vários grupos de eucariotos e desempenham função crucial em uma variedade de processos biológicos, tais como sinalização e síntese hormonal. Em conjunto com a oxidação de NADPH, as enzimas NOX reduzem o oxigênio molecular para superóxido como um produto primário, que é ainda convertido em várias espécies reativas de oxigênio (125). No ambiente testicular o RNAm de Nox5 é geralmente abundante, sendo encontrado especialmente em espermatócitos na fase de paquíteno e, em menor grau, nas espermátides redondas. Níveis elevados de RNAm de Nox5 foram observados no lúmen dos túbulos seminíferos. De fato, NOX5 está relacionada com espermátides em maturação; nos espermatozoides a NOX5 está presente na região dos flagelos e no acrossomo, estando intimamente relacionada à motilidade espermática (126). A expressão gênica de Nox5 foi claramente reduzida nos testículos dos camundongos ob/ob em comparação com os camundongos controle, corroborando com os demais achados desse estudo (diminuição nas células da linhagem espermatogênica e ausência de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos).

## Conclusão

Os resultados presentes indicam alterações morfológicas, hormonais e enzimáticas significativas nos testículos dos camundongos *ob/ob*. As transformações observadas nas enzimas da via esteroidogênica, nos receptores hormonais e nas enzimas relacionadas à atividade espermática suportam a hipótese de haver falhas na fertilidade desses animais. Dessa forma, nosso estudo fornece novas evidências e contribui para o entendimento de como a obesidade, via deficiência de leptina, pode modular negativamente a função testicular e a fertilidade nesse modelo experimental.

## CONCLUSÃO

Em face dos resultados mostrados nos três capítulos, concluímos que a modulação da obesidade via deficiência de leptina causa:

- alterações no perfis termogênico, lipídico, insulínico e inflamatório do tecido adiposo marrom (TAM);
- alterações epiteliais e estromais na próstata ventral;
- alterações na morfologia e na esteroidogênese testicular.

Esses resultados trazem novas e importantes informações sobre a regulação do TAM e da morfofisiologia reprodutiva em camundongos nocautes para a leptina (*ob/ob -/-*).

# REFERÊNCIAS

- Funcke JB, von Schnurbein J, Lennerz B, Lahr G, Debatin KM, Fischer-Posovszky P, et al. Monogenic forms of childhood obesity due to mutations in the leptin gene. Mol Cell Pediatr. 2014;1(1):3.
- 2. Anubhuti, Arora S. Leptin and its metabolic interactions: an update. Diabetes Obes Metab. 2008;10(11):973-93.
- 3. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature. 1996;379(6566):632-5.
- 4. Mullen M, Gonzalez-Perez RR. Leptin-Induced JAK/STAT Signaling and Cancer Growth. Vaccines (Basel). 2016;4(3).
- 5. Hegyi K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. Cell Biol Int. 2004;28(3):159-69.
- Dalamaga M, Chou SH, Shields K, Papageorgiou P, Polyzos SA, Mantzoros CS. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. Cell Metab. 2013;18(1):29-42.
- 7. Di Yorio MP, Bilbao MG, Faletti AG. Neuropeptide Y regulates the leptin receptors in rat hypothalamic and pituitary explant cultures. Regul Pept. 2014;188:13-20.
- Rahmouni K. Differential Control of the Sympathetic Nervous System by Leptin: Implications for Obesity. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl. 2007;34 Suppl(s1):S8-S10.
- 9. Caron A, Richard D. Neuronal systems and circuits involved in the control of food intake and adaptive thermogenesis. Ann N Y Acad Sci. 2016.
- 10. Johnson MD, Bouret SG, Dunn-Meynell AA, Boyle CN, Lutz TA, Levin BE. Early postnatal amylin treatment enhances hypothalamic leptin signaling and neural development in the selectively bred diet-induced obese rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2016;311(6):R1032-R44.
- 11. Chhabra KH, Adams JM, Jones GL, Yamashita M, Schlapschy M, Skerra A, et al. Reprogramming the body weight set point by a reciprocal interaction of hypothalamic leptin sensitivity and Pomc gene expression reverts extreme obesity. Mol Metab. 2016;5(10):869-81.
- 12. Kanter R, Caballero B. Global gender disparities in obesity: a review. Advances in nutrition. 2012;3(4):491-8.
- 13. Martins FF, Bargut TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Thermogenesis, fatty acid synthesis with oxidation, and inflammation in the brown adipose tissue of ob/ob (-/-) mice. Ann Anat. 2017;210(3):44-51.
- 14. Reis LO, Dias FG. Male fertility, obesity, and bariatric surgery. Reprod Sci. 2012;19(8):778-85.

- 15. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;294(5):E827-32.
- 16. Leon S, Tena-Sempere M. Dissecting the Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone in Mammals: Studies Using Pharmacological Tools and Genetically Modified Mouse Models. Front Endocrinol (Lausanne). 2015;6:189.
- 17. Ulloa-Aguirre A, Lira-Albarran S. Clinical Applications of Gonadotropins in the Male. Prog Mol Biol Transl Sci. 2016;143:121-74.
- 18. Biancardi MF, Perez AP, Caires CR, Falleiros LR, Goes RM, Vilamaior PS, et al. Prenatal and pubertal testosterone exposure imprint permanent modifications in the prostate that predispose to the development of lesions in old Mongolian gerbils. Asian J Androl. 2016.
- 19. Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Frontera M, Gianotti M, Proenza AM, Roca P. Sex steroid receptor expression profile in brown adipose tissue. Effects of hormonal status. Cell Physiol Biochem. 2007;20(6):877-86.
- 20. Kuhn-Velten N, Codjambopoulo P, Haider SG, Passia D, Kley HK, Herberg L, et al. Biochemical and histochemical studies on the pituitary-testicular axis in obese (C57Bl/6J-ob/ob) mice. Int J Androl. 1986;9(2):123-31.
- Sanches BD, Maldarine JS, Zani BC, Biancardi MF, Santos FC, Goes RM, et al. The Expression of the Androgen Receptor and Estrogen Receptor 1 is Related to Sex Dimorphism in the Gerbil Prostate Development. Anat Rec (Hoboken). 2016;299(8):1130-9.
- 22. Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Gianotti M, Proenza AM, Roca P. Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced specifically by 17beta-estradiol, testosterone, and progesterone. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;292(1):E340-6.
- 23. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. Curr Diabetes Rev. 2014;10(2):131-45.
- 24. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. Nutr Metab (Lond). 2016;13:65.
- 25. Oelkrug R, Polymeropoulos ET, Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. J Comp Physiol B. 2015;185(6):587-606.
- Richard D, Carpentier AC, Dore G, Ouellet V, Picard F. Determinants of brown adipocyte development and thermogenesis. Int J Obes (Lond). 2010;34 Suppl 2:S59-66.
- 27. Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics. J Cell Physiol. 2017;232(1):61-8.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. N Engl J Med. 2009;360(15):1509-17.
- 29. Junqueira LCC, J. Histologia Básica. 12 ed. São Paulo2013. 556 p.

- 30. Symonds ME. Brown adipose tissue growth and development. Scientifica (Cairo). 2013;2013:305763.
- 31. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. Cell Metab. 2014;19(5):741-56.
- 32. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev. 2004;84(1):277-359.
- 33. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. Nature. 1979;281(5726):31-5.
- 34. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature. 2000;404(6778):652-60.
- 35. Kozak LP. Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. Cell Metab. 2010;11(4):263-7.
- Labbe SM, Caron A, Lanfray D, Monge-Rofarello B, Bartness TJ, Richard D. Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. Frontiers in systems neuroscience. 2015;9:150.
- 37. Contreras C, Gonzalez F, Ferno J, Dieguez C, Rahmouni K, Nogueiras R, et al. The brain and brown fat. Ann Med. 2015;47(2):150-68.
- Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. Cell Metab. 2012;15(3):395-404.
- Garcia-Casarrubios E, de Moura C, Arroba AI, Pescador N, Calderon-Dominguez M, Garcia L, et al. Rapamycin negatively impacts insulin signaling, glucose uptake and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. Biochim Biophys Acta. 2016;1861(12 Pt A):1929-41.
- 40. Rezai-Zadeh K, Yu S, Jiang Y, Laque A, Schwartzenburg C, Morrison CD, et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. Mol Metab. 2014;3(7):681-93.
- 41. Dubuc PU, Wilden NJ, Carlisle HJ. Fed and fasting thermoregulation in ob/ob mice. Annals of nutrition & metabolism. 1985;29(6):358-65.
- 42. Fischer AW, Hoefig CS, Abreu-Vieira G, de Jong JM, Petrovic N, Mittag J, et al. Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. Cell Rep. 2016;14(7):1621-31.
- 43. Kaiyala KJ, Ogimoto K, Nelson JT, Schwartz MW, Morton GJ. Leptin signaling is required for adaptive changes in food intake, but not energy expenditure, in response to different thermal conditions. PLoS One. 2015;10(3):e0119391.
- Liu X, Wang S, You Y, Meng M, Zheng Z, Dong M, et al. Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. Endocrinology. 2015;156(7):2461-9.

- 45. Becerril S, Rodriguez A, Catalan V, Sainz N, Ramirez B, Collantes M, et al. Deletion of inducible nitric-oxide synthase in leptin-deficient mice improves brown adipose tissue function. PLoS One. 2010;5(6):e10962.
- 46. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science. 1995;269(5223):540-3.
- 47. Gratuze M, El Khoury NB, Turgeon A, Julien C, Marcouiller F, Morin F, et al. Tau hyperphosphorylation in the brain of ob/ob mice is due to hypothermia: Importance of thermoregulation in linking diabetes and Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. 2016;98:1-8.
- 48. Stone KP, Wanders D, Calderon LF, Spurgin SB, Scherer PE, Gettys TW. Compromised responses to dietary methionine restriction in adipose tissue but not liver of ob/ob mice. Obesity (Silver Spring). 2015;23(9):1836-44.
- 49. Roberts-Toler C, O'Neill BT, Cypess AM. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue. Obesity (Silver Spring). 2015;23(9):1765-70.
- 50. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. N Engl J Med. 2009;360(15):1500-8.
- 51. Bargut TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Brown adipose tissue: Updates in cellular and molecular biology. Tissue Cell. 2016;48(5):452-60.
- 52. Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillonne A, Chang BH, Quast MJ, et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lepr(db/db) mice. Nat Genet. 2000;26(4):474-9.
- 53. Komatsu M, Tong Y, Li Y, Nakajima T, Li G, Hu R, et al. Multiple roles of PPARalpha in brown adipose tissue under constitutive and cold conditions. Genes Cells. 2010;15(2):91-100.
- 54. Labbe SM, Caron A, Bakan I, Laplante M, Carpentier AC, Lecomte R, et al. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. FASEB J. 2015;29(5):2046-58.
- 55. Mercer SW, Trayhurn P. Developmental changes in fatty acid synthesis in interscapular brown adipose tissue of lean and genetically obese (ob/ob) mice. Biochem J. 1983;212(2):393-8.
- 56. Schilperoort M, Hoeke G, Kooijman S, Rensen PC. Relevance of lipid metabolism for brown fat visualization and quantification. Curr Opin Lipidol. 2016;27(3):242-8.
- 57. Bargut TC, Silva-e-Silva AC, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Mice fed fish oil diet and upregulation of brown adipose tissue thermogenic markers. Eur J Nutr. 2016;55(1):159-69.
- 58. Sakamoto T, Nitta T, Maruno K, Yeh YS, Kuwata H, Tomita K, et al. Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016;310(8):E676-E87.

- 59. Goto T, Naknukool S, Yoshitake R, Hanafusa Y, Tokiwa S, Li Y, et al. Proinflammatory cytokine interleukin-1beta suppresses cold-induced thermogenesis in adipocytes. Cytokine. 2016;77:107-14.
- 60. da Silva AA, do Carmo JM, Hall JE. Role of leptin and central nervous system melanocortins in obesity hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2013;22(2):135-40.
- 61. Zeng W, Pirzgalska RM, Pereira MM, Kubasova N, Barateiro A, Seixas E, et al. Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. Cell. 2015;163(1):84-94.
- 62. Lau J, Shi YC, Herzog H. Temperature dependence of the control of energy homeostasis requires CART signaling. Neuropeptides. 2016;59:97-109.
- 63. Wu MV, Bikopoulos G, Hung S, Ceddia RB. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats: impact on whole-body energy expenditure. The Journal of biological chemistry. 2014;289(49):34129-40.
- 64. Law J, Bloor I, Budge H, Symonds ME. The influence of sex steroids on adipose tissue growth and function. Horm Mol Biol Clin Investig. 2014;19(1):13-24.
- 65. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. Endocrine reviews. 1987;8(3):338-62.
- Justulin LA, Jr., Delella FK, Felisbino SL. Doxazosin reduces cell proliferation and increases collagen fibers in rat prostatic lobes. Cell Tissue Res. 2008;332(1):171-83.
- 67. Lowsley OS. The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. Amer J Surg. 1912;13:299-350.
- 68. Dauge MC, Delmas V, Mandarim de Lacerda CA. [Development of the human prostate during the first stages of fetal life. Morphometric study]. Bull Assoc Anat (Nancy). 1986;70(211):5-11.
- 69. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. Prostate. 1981;2(1):35-49.
- 70. Goes RM, Zanetoni C, Tomiosso TC, Ribeiro DL, Taboga SR. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. Micron. 2007;38(3):231-6.
- 71. Colombel MC, Buttyan R. Hormonal control of apoptosis: the rat prostate gland as a model system. Methods in cell biology. 1995;46:369-85.
- 72. Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. Molecular and cellular endocrinology. 2008;288(1-2):30-7.
- 73. Valkenburg KC, Williams BO. Mouse models of prostate cancer. Prostate Cancer. 2011;2011:895238.

- 74. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. Experimental biology and medicine. 2007;232(9):1121-9.
- 75. Rowe RG, Weiss SJ. Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cellstroma interface. Annual review of cell and developmental biology. 2009;25:567-95.
- 76. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. The Journal of urology. 2001;166(6):2472-83.
- 77. Ribeiro AM, Andrade S, Pinho F, Monteiro JD, Costa M, Lopes C, et al. Prostate cancer cell proliferation and angiogenesis in different obese mice models. International journal of experimental pathology. 2010;91(4):374-86.
- 78. Parikesit D, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. The impact of obesity towards prostate diseases. Prostate international. 2016;4(1):1-6.
- 79. Donato J, Jr., Cravo RM, Frazao R, Elias CF. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. Neuroendocrinology. 2011;93(1):9-18.
- 80. Lindstrom P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. ScientificWorldJournal. 2007;7:666-85.
- Damas-Souza DM, Oliveira CA, Carvalho HF. Insulin affects tissue organization and the kinetics of epithelial cell death in the rat ventral prostate after castration. Journal of andrology. 2010;31(6):631-40.
- 82. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. Endocrinology. 1997;138(3):1190-3.
- Hoffmann A, Manjowk GM, Wagner IV, Kloting N, Ebert T, Jessnitzer B, et al. Leptin Within the Subphysiological to Physiological Range Dose Dependently Improves Male Reproductive Function in an Obesity Mouse Model. Endocrinology. 2016;157(6):2461-8.
- 84. Ribeiro DL, Pinto ME, Maeda SY, Taboga SR, Goes RM. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. Cell and tissue research. 2012;349(2):577-88.
- Wong YC, Tam NN. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. Differentiation; research in biological diversity. 2002;70(9-10):633-45.
- 86. de Carvalho HF, Vilamaior PS, Taboga SR. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. The Prostate. 1997;32(1):27-34.
- 87. Leach DA, Need EF, Toivanen R, Trotta AP, Palethorpe HM, Tamblyn DJ, et al. Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome. Oncotarget. 2015;6(18):16135-50.
- 88. Schaffler A, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Buchler C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. Endocrine reviews. 2006;27(5):449-67.
- 89. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. The New England journal of medicine. 2003;348(17):1625-38.

- 90. Finley DS, Calvert VS, Inokuchi J, Lau A, Narula N, Petricoin EF, et al. Periprostatic adipose tissue as a modulator of prostate cancer aggressiveness. The Journal of urology. 2009;182(4):1621-7.
- 91. Wasim M, Awan FR, Najam SS, Khan AR, Khan HN. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. Biochem Genet. 2016.
- 92. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2016;45(3):633-45.
- 93. Hosoi T, Ozawa K. Possible Pharmacological Approach Targeting Endoplasmic Reticulum Stress to Ameliorate Leptin Resistance in Obesity. Front Endocrinol (Lausanne). 2016;7:59.
- 94. Calderon B, Gomez-Martin JM, Vega-Pinero B, Martin-Hidalgo A, Galindo J, Luque-Ramirez M, et al. Prevalence of male secondary hypogonadism in moderate to severe obesity and its relationship with insulin resistance and excess body weight. Andrology. 2016;4(1):62-7.
- 95. Russell LD, Hikim AP, Overbeek PA, MacGregor GR. Testis structure in the sys (symplastic spermatids) mouse. Am J Anat. 1991;192(2):169-82.
- 96. Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. Dev Biol. 1998;203(2):323-33.
- 97. Elias CF, Purohit D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. Cell Mol Life Sci. 2013;70(5):841-62.
- 98. Boggio V, Cutrera R, Carbone S, Scacchi P, Ponzo OJ. Leptin inhibits the reproductive axis in adult male Syrian hamsters exposed to long and short photoperiod. Reprod Biol. 2013;13(3):203-8.
- 99. Hatami-Baroogh L, Razavi S, Zarkesh-Esfahani H, Tavalaee M, Tanhaei S, Ghaedi K, et al. Evaluation of the leptin receptor in human spermatozoa. Reprod Biol Endocrinol. 2010;8:17.
- 100. Landry D, Cloutier F, Martin LJ. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. Reprod Biol. 2013;13(1):1-14.
- 101. Roumaud P, Martin LJ. Roles of leptin, adiponectin and resistin in the transcriptional regulation of steroidogenic genes contributing to decreased Leydig cells function in obesity. Horm Mol Biol Clin Investig. 2015;24(1):25-45.
- 102. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. Mol Cell Endocrinol. 2002;188(1-2):9-13.
- 103. Teerds KJ, de Rooij DG, Keijer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. Hum Reprod Update. 2011;17(5):667-83.
- 104. Davison SL, Bell R. Androgen physiology. Semin Reprod Med. 2006;24(2):71-7.
- 105. Roy P, Alevizaki M, Huhtaniemi I. In vitro bioassays for androgens and their diagnostic applications. Hum Reprod Update. 2008;14(1):73-82.

- 106. Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. Biol Reprod. 1995;52(2):217-25.
- 107. Miller WL, Strauss JF, 3rd. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. J Steroid Biochem Mol Biol. 1999;69(1-6):131-41.
- 108. O'Hara L, Smith LB. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2015;29(4):595-605.
- 109. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. Spermatogenesis. 2014;4(2):e996025.
- 110. Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. Int J Androl. 1999;22(4):211-23.
- 111. Phillips DM, Lakshmi V, Monder C. Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat testis. Endocrinology. 1989;125(1):209-16.
- 112. Ge RS, Gao HB, Nacharaju VL, Gunsalus GL, Hardy MP. Identification of a kinetically distinct activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. Endocrinology. 1997;138(6):2435-42.
- 113. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 1972;52(1):198-236.
- 114. Roosen-Runge EC. Comparative aspects of spermatogenesis. Biol Reprod. 1969;1:Suppl 1:24-31.
- 115. Sainz N, Gonzalez-Navarro CJ, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Leptin signaling as a therapeutic target of obesity. Expert Opin Ther Targets. 2015;19(7):893-909.
- 116. Bhat GK, Sea TL, Olatinwo MO, Simorangkir D, Ford GD, Ford BD, et al. Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse. J Androl. 2006;27(2):302-10.
- 117. Tsatsanis C, Dermitzaki E, Avgoustinaki P, Malliaraki N, Mytaras V, Margioris AN. The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Hormones (Athens). 2015;14(4):549-62.
- 118. Rudolph LM, Bentley GE, Calandra RS, Paredes AH, Tesone M, Wu TJ, et al. Peripheral and Central Mechanisms Involved in the Hormonal Control of Male and Female Reproduction. Journal of neuroendocrinology. 2016;28(7).
- 119. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. Seminars in cell & developmental biology. 2016;59:10-26.
- 120. Stocco DM, Zhao AH, Tu LN, Morohaku K, Selvaraj V. A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol. 2016.
- 121. Pinto-Fochi ME, Pytlowanciv EZ, Reame V, Rafacho A, Ribeiro DL, Taboga SR, et al. A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. Reproduction. 2016;152(6):795-808.

- 122. Vigueras-Villasenor RM, Rojas-Castaneda JC, Chavez-Saldana M, Gutierrez-Perez O, Garcia-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O, et al. Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. Acta Histochem. 2011;113(2):214-20.
- 123. Taylor AP, Lee H, Webb ML, Joffe H, Finkelstein JS. Effects of Testosterone and Estradiol Deficiency on Vasomotor Symptoms in Hypogonadal Men. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(9):3479-86.
- 124. Wu F, Chen T, Mao S, Jiang H, Ding Q, Xu G. Levels of estradiol and testosterone are altered in Chinese men with sexual dysfunction. Andrology. 2016;4(5):932-8.
- 125. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. FEBS J. 2008;275(13):3249-77.
- 126. Chen F, Wang Y, Barman S, Fulton DJ. Enzymatic regulation and functional relevance of NOX5. Curr Pharm Des. 2015;21(41):5999-6008.