

VANESSA REAME

**"REPERCUSSÕES DA OBESIDADE MATERNA E/OU
PÓS-NATAL SOBRE AS CÉLULAS DE SERTOLI E A
EXPRESSÃO DE FATORES PARÁCRINOS
INTRATESTICULARES"**

Campinas, 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

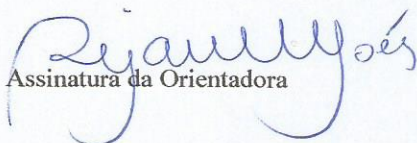
VANESSA REAME

**"REPERCUSSÕES DA OBESIDADE MATERNA E/OU
PÓS-NATAL SOBRE AS CÉLULAS DE SERTOLI E A
EXPRESSÃO DE FATORES PARÁCRINOS
INTRATESTICULARES"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maira Góes
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Etelvina Pinto Fochi

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna *Vanessa Reame* e orientada pela Profa. Dra. Rejane Maira Góes.


Assinatura da Orientadora

Campinas, 2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R23r Reame, Vanessa, 1988-
Repercussões da obesidade materna e/ou pós-natal sobre as células de Sertoli e a expressão de fatores parácrinos intratesticulares / Vanessa Reame. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Rejane Maira Góes.
Coorientador: Maria Etelvina Pinto Fochi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Obesidade. 2. Testículos. 3. Células de Sertoli. 4. Comunicação parácrina. 5. Barreira hematotesticular. I. Góes, Rejane Maira. II. Pinto, Maria Etelvina. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Repercussions of maternal obesity and/or post natal on the Sertoli cells and the expression of paracrine factors intratesticular

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Testis

Sertoli cells

Paracrine communication

Blood-testis barrier

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Rejane Maira Góes [Orientador]

Mary Anne Heidi Dolder

Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

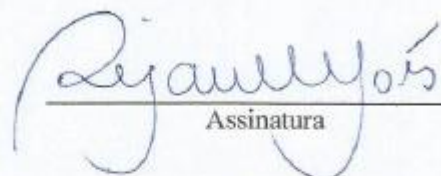
Data de defesa: 31-03-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural


Campinas, 31 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rejane Maira Góes (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder


Assinatura

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes


Assinatura

Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Assinatura

A obesidade está associada a vários prejuízos para a saúde, mas os efeitos sobre o sistema genital e reprodução masculina ainda são pouco compreendidos. Um estudo concluído recentemente em nosso laboratório comparou os efeitos do ambiente obesogênico (AO) em diferentes fases do desenvolvimento de ratos sobre a produção espermática na idade adulta. Todos os grupos expostos ao AO apresentaram prejuízos espermáticos. Para esclarecer esses achados, no presente trabalho, nós investigamos se os diferentes períodos de exposição ao AO resultaram em alterações funcionais nas células de Sertoli e modificaram permanentemente o ambiente parácrino intratesticular. Foram utilizados ratos Wistar adultos expostos à obesidade materna na gestação (O1), na gestação/ lactação (O2), ou sujeitos ao AO após desmame (O3), da lactação até a idade adulta (O4) ou da gestação até a idade adulta (O5) e grupo controle (C). A obesidade materna ou o AO foram induzidos por dieta com 20% de lipídeos (ração controle: 4% de lipídeos), por 15 semanas. As análises em microscopia de luz não mostraram alterações morfológicas nas células de Sertoli e no número dessas células expressando o receptor de andrógeno nos estágios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero. Entretanto, a percentagem de túbulos com descolamento prematuro de células germinativas foi acentuada em O5, moderada nos grupos O1, O2 e O3 e menor em O4. A testosterona sérica diminuiu 60% em O3 e O5, 27 % em O2, ~45% em O4 e não variou no O1. A dosagem de citocinas e de fator de crescimento, com o uso de ensaios multiplex, indicou aumento do TNF- α e a diminuição do FGF-2 no testículo dos grupos O1, O3 e O4, diminuição da IL-1 α e IL-1 β no grupo O2, e diminuição da IL-1 α no grupo O5. Nenhum grupo apresentou alteração para a IL-6. Adicionalmente, as análises por imunocitoquímica e por Western blotting mostraram que a expressão de conexina 43 diminuiu para o grupo exposto ao AO por toda a vida. As alterações no TNF- α e na IL-1 α pode ter aumentado a permeabilidade da barreira hematotesticular e juntamente com a queda na testosterona, podem explicar o descolamento de células germinativas e o prejuízo na eficiência e produção espermática. Esses dados indicam que o AO modula os fatores parácrinos testiculares de maneira diferencial, dependendo do período de exposição.

Palavras-chave: Obesidade, Testículo, Células de Sertoli, Comunicação Parácrina, Barreira Hematotesticular.

Obesity is associated with several health damage, but the effects on the reproductive system and male reproduction are still poorly understood. A study recently in our laboratory compared the effects of the obesogenic environment (OE) at different stages of development of rats on sperm production in adulthood. All the groups exposed to OE showed sperm damage. To clarify these findings in the present study, we investigated whether the different periods of exposure to OE resulted in functional changes in Sertoli cells and permanently changed the intratesticular paracrine environment. Wistar adult rats exposed to maternal obesity during pregnancy (O1), during pregnancy / lactation (O2), or subject to OE after weaning (O3), lactation to adulthood (O4) or from pregnancy to adulthood (O5) and control group (C) were used. The maternal obesity or OE were induced by diet with 20% lipids (control diet: 4% lipid) for 15 weeks. The analysis by light microscopy showed no morphological changes in Sertoli cells and in the number of these cells expressing the androgen receptor in the seventh and eighth stages of the cycle of seminiferous epithelium. However, the percentage of tubules with premature separation of germ cells was accentuated in O5, moderate in groups O1, O2 and O3 and lower in O4. Serum testosterone decreased by 60% in O3 and O5, 27% in O2, ~ 45% in O4 and did not change in O1. The dosage of cytokines and growth factor with the use multiplex assays, showed an increase of TNF- α and the reduction of FGF-2 in the testis of groups O1, O3 and O4, reduced IL-1 α and IL-1 β in O2 group, and decreased IL-1 α in the O5 group. Neither group showed a change for IL-6. Additionally, analysis by immunocytochemistry and Western blotting showed that the expression of connexin 43 decreased to the group exposed to OE for all life. Changes in TNF- α and IL-1 α may have increased the permeability of Blood-Testis barrier and along with the drop in testosterone may explain the detachment of germ cells and the loss in efficiency and sperm production. These data indicate that the OE modulates testicular paracrine factors differentially, depending on the exposure period.

Key words: Obesity, Testis, Sertoli cell, paracrine communication, blood-testis barrier.

	<i>Sumário</i>
<i>Agradecimentos</i>	<i>xv</i>
<i>Introdução</i>	<i>1</i>
<i>Enunciado do Problema</i>	<i>8</i>
<i>Objetivos</i>	<i>10</i>
<i>Resultados</i>	<i>11</i>
Artigo	12
1. Introdução	14
2. Materiais e Métodos	17
3. Resultados	22
4. Discussão	23
5. Agradecimentos	31
6. Referências Bibliográficas	32
7. Legenda das Figuras	43
<i>Conclusões Gerais</i>	<i>54</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>55</i>
<i>Anexos</i>	<i>68</i>

*"Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz
com aquilo que você sabe."*

Aldous Huxley

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus, por me dar forças para superar as dificuldades, por me amparar nos momentos difíceis e me mostrar o caminho nas horas incertas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rejane Maira Góes, por acreditar na minha capacidade profissional, pelos ensinamentos, paciência e apoio concedidos a mim nesses anos de mestrado. Obrigada por ser esse exemplo de profissional séria e dedicada ao trabalho, que tem contribuído tanto no meu crescimento profissional.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Maria Etelvina Pinto, por ter acreditado no meu trabalho desde o início, por estar presente em todos os momentos bons ou ruins e por me incentivar nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo carinho, paciência, conselhos, dedicação e ensinamentos que com certeza levarei comigo para sempre e acima de tudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela colaboração e assistência em seu laboratório.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Fernandes, Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato e Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, pela disponibilidade e contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel, Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, pelo compartilhamento de suas experiências profissionais e sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, por me receberem e contribuírem com minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Demanda Social (CAPES/DS), pela concessão da Bolsa de Estudos de 01 de julho a 30 de novembro de 2013.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro concedido (Processo nº 2013/18011-9).

À Lílíam Alvez Senne Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por sua imensa competência e disponibilidade, que me salvou várias vezes por conta da distância, e por todo apoio, profissionalismo e carinho durante esses 2 anos de mestrado.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE-UNESP, por ter disponibilizado o espaço físico para a realização da parte experimental deste trabalho.

A todos os meus amigos de laboratório: Profa. Dra. Patricia Vilamaior, Ana Paula, Bruno Sanches, Bruno Zani, Camila, Carol Christante, Carol Frandsen, Carol Negrin, Cássia, Cíntia, Diego, Douglas, Eloísa, Ellen, Guilherme, Júlia, Luiz Henrique, Mariana Marcielo, Marina, Mateus, Nayara, Ricardo, Silvana, Simone e Viviane. Muito obrigada a cada um de vocês por alegrarem os meus dias no laboratório, pela companhia e por toda a ajuda com os problemas da vida laboratorial.

Em especial, as minhas companheiras de mestrado, Júlia e Simone, pelos momentos de estudo para o processo seletivo do mestrado, pela companhia durante as viagens para Campinas e por estarem presentes em todos os momentos, sejam eles de alegria ou de desespero. Pela força, conselhos e por não me deixar desanimar nos momentos mais difíceis. Acima de tudo, muito obrigada pela amizade e carinho, com certeza não teria conseguido sem vocês.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise, Luiz Roberto Falleiros Junior, por toda a ajuda prestada, pelos conselhos e por tornar os dias de trabalhos mais proveitosos e divertidos, com sua dedicação e alegria.

Ao Prof Dr Fernando Ferrari pela ajuda com os testes estatísticos e à Profa Dra Paula Rahal e a Profa Dra Sônia Olini pela disponibilidade de seus laboratórios para algumas técnicas desenvolvidas no projeto.

À minha amiga e aluna de Mestrado da Pós-Graduação em Microbiologia do Ibilce, Jacqueline Farinha Shimizu, por me ajudar na revelação do Western Blotting até mesmo nos fins de semana e feriados, pela dedicação e pelo carinho.

Ao aluno de Doutorado da Pós-Graduação em Genética do Ibilce, Lucas Azevedo, pela colaboração e disponibilidade nas técnicas de uso do aparelho MAGPIX.

Aos meus pais Cleiner e Gislaine, pelo amor incondicional, pelo carinho, por serem exemplos de pessoas para mim e que fizeram de tudo para que eu fosse o que sou hoje. Muito obrigada por todo o apoio financeiro e emocional que me proporcionaram poder realizar mais esta etapa da minha vida. Vocês são a base fundamental da minha vida. Especialmente a minha mãe, agradeço por todas as orações, por ter me ensinando a ter fé, por nunca duvidar da minha capacidade e pelas palavras que me acalmaram.

Aos meus irmãos Priscila e Cleiner Neto, por toda a torcida, por toda a ajuda e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu namorado Túlio por todo o amor e carinho, por me aguentar e me acalmar nos momentos desesperadores, por me fazer rir mesmo quando eu queria chorar e por toda a compreensão que teve ao entender que nem todo fim de semana e feriado é realmente fim de semana e feriado! Obrigada por ser essa pessoa tão maravilhosa, por estar sempre do meu lado, pelo companheirismo, por me tornar uma pessoa melhor e alegrar tanto a minha vida.

Aos meus avós, Cleiner e Shirley pelos momentos que passamos juntos, pelas orações, pela torcida, por vibrarem com minhas vitórias e por saber que posso contar com vocês sempre que precisar.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A espermatogênese é um processo singular e complexo de diferenciação celular que culmina com a produção do gameta masculino. Sua manutenção em níveis qualitativos e quantitativos é essencial para a função reprodutora e depende de uma intrincada rede de interações celulares e de relações endócrinas e parácrinas (McLachlan, 2000; O'Donnell et al., 2001). Assim, além das gonadotrofinas (hormônios folículo estimulante –FSH e luteinizante – LH) e dos esteroides sexuais, a espermatogênese, bem como a esteroidogênese testicular é regulada por uma variedade de fatores autócrinos e parácrinos que constituem o sistema local de controle das funções testiculares. Entre esses fatores destacam-se as citocinas e os fatores de crescimento que desempenham um papel relevante no desenvolvimento e funcionamento normal do testículo (Hales et al., 1999; McLachlan, 2000; Hales, 2002; Diemer et al., 2003; Bornstein et al., 2004; Guazzone et al., 2009).

O alicerce para a espermatogênese é definido durante a vida embrionária e um dos seus pilares é o desenvolvimento das células de Sertoli, atualmente conhecidas como epiteliócitos de sustentação (International Committee on Veterinary Histological Nomenclature, 1994). As células de Sertoli se originam do epitélio celômico que constitui os cordões sexuais primitivos do primórdio gonadal (Karl e Capel, 1998). A expressão do gene *Sry* e de outros genes responsáveis pelo desenvolvimento do testículo nessas células indicam o seu papel fundamental na formação do testículo (Lovell-Badge, 1992). Elas também direcionam, via secreção do Hormônio anti-mülleriano (HAM), a degeneração dos ductos paramesonéfricos ou de Müller, que, nas fêmeas, se diferenciam nas tubas ovarianas e útero (Josso et al., 2001).

As células de Sertoli maduras são terminalmente diferenciadas e perdem a capacidade proliferativa (Solari e Fritz, 1978; Waites et al., 1985; Sharpe et al., 2003). Na maioria das espécies, essas células passam por duas etapas de proliferação, uma no período fetal ou neonatal e outra na puberdade, mas em roedores estes períodos se sobrepõem, sendo difícil discernir os dois períodos e assim toda a proliferação ocorre no período fetal e neonatal (Sharpe et al., 2003). Sabe-se que o número de células germinativas que cada célula de Sertoli suporta é fixo para a espécie, consequentemente, o número de espermatozoides produzidos na vida adulta é criticamente determinado pela quantidade

destas células no testículo (Orth et al., 1988; Russell et al., 1990; Sharpe et al., 2003). Estudos experimentais em roedores indicam que os andrógenos estimulam a proliferação dessas células. Camundongos “knockout” para o receptor de andrógeno (AR) apresentam uma redução de aproximadamente 50% no número de células de Sertoli ao nascimento (Johnston et al. 2004; Scott et al. 2007, 2008). Os ARs não são expressos em células de Sertoli fetais em nenhuma espécie (Sharpe, 2005), sendo assim, os efeitos da testosterona nestas células são provavelmente mediados pelas células peritubulares adjacentes, que expressam ARs fortemente durante o período fetal (Scott et al., 2007). É conhecido que a exposição aos estrógenos e desreguladores endócrinos (Hutchison et al., 2008; Carreau et al., 2010, 2011) interfere negativamente na proliferação/maturação das células de Sertoli resultando em menor peso testicular e produção espermática na idade adulta (Hutchison et al., 2008; Sharpe, 2010). Portanto, é cada vez mais reconhecido que perturbações no ambiente hormonal ou parácrino durante a gestação e vida perinatal podem ter impactos subsequentes na qualidade da espermatogênese no adulto (Sharpe, 2010).

Além de seu papel crucial para a diferenciação testicular durante o desenvolvimento uterino e perinatal, as células de Sertoli maduras fornecem o suporte estrutural e fisiológico para a espermatogênese (Sharpe, 1984; Spiteri-Grech e Nieschlag, 1993). O apoio fisiológico para a espermatogênese em grande parte é consequência de sua capacidade de secreção de proteínas específicas, como citocinas e fatores parácrinos. É conhecido que as células de Sertoli apresentam um amplo espectro funcional, o qual pode ser ilustrado pela diversidade de RNAs e proteínas por ela produzidos. Essas moléculas podem ser classificadas, segundo sua função, nas seguintes categorias: a) componentes juncionais; b) remodelação e movimentação intraepitelial; c) transporte de biomoléculas e bioproteção; d) fatores regulatórios; e) peptídeos bioativos, nutrientes ou metabólicos intermediários e f) moduladores da resposta imunológica (Griswold, 1998; Sofikitis et al., 2008).

Os componentes juncionais referem-se às proteínas da barreira hematotesticular (BHT) e das junções comunicantes (Figura 1). A BHT é composta pela coexistência de três estruturas juncionais entre as células de Sertoli adjacentes, como as junções de oclusão, um tipo especial de junções de adesão conhecidas como especializações ectoplasmáticas e

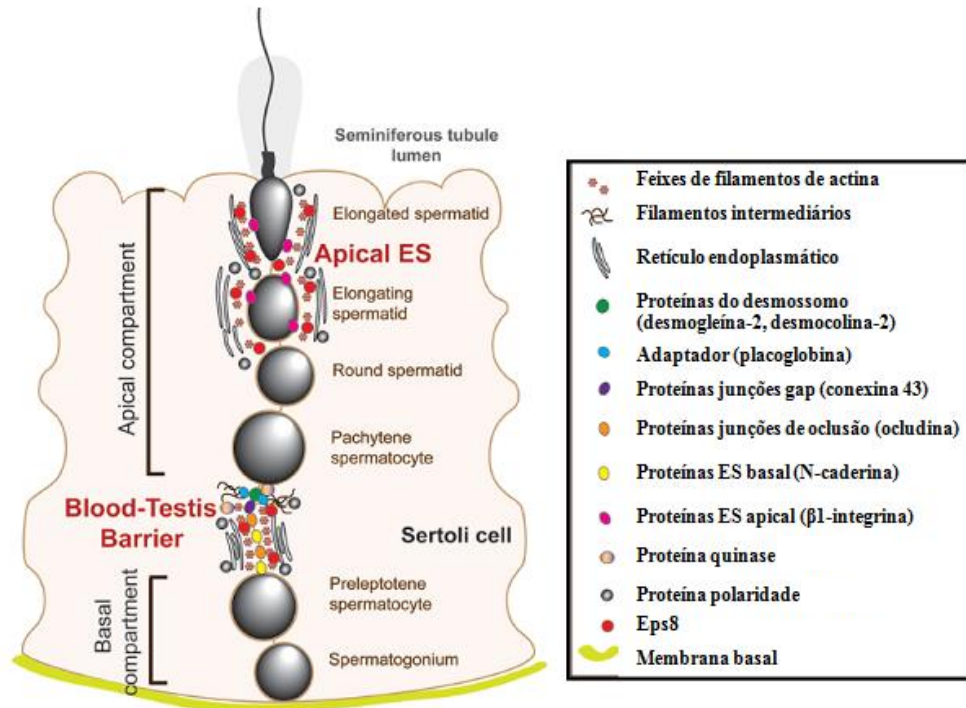


Figura 1. Esquema da barreira hematotesticular (BHT) do epitélio seminífero de ratos adultos (túbulos seminíferos no estágio VII). A BHT é constituída pela coexistência de junções de oclusão, especializações ectoplasmáticas (ES) basais, desmossomos e junções gap. A BHT divide o epitélio seminífero em compartimentos basal e apical (adluminal). A característica mais óbvia da BHT são os feixes de filamentos de actina densamente empacotados dispostos paralelos à membrana plasmática e entre as cisternas do retículo endoplasmático e membranas plasmáticas opostas das duas células de Sertoli adjacentes. Esta estrutura tripartida é conhecida como ES basal. Esta estrutura também é encontrada entre as células de Sertoli e espermatídes (fases 8-19 em ratos), e é conhecida como ES apical no compartimento apical. A ES apical é um dispositivo de ancoragem, uma vez que aparece durante a espermiogênese (Modificado de Cheng et al., 2011). Legenda: Eps8: Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 (enzima).

junções semelhantes à desmossomos que também podem ser chamadas de junções gap-desmossomos (Dym e Fawcett, 1970; Setchell e Waites, 1975; Cheng et al., 2011). Esta barreira confere polaridade à célula e cria um ambiente especializado para o desenvolvimento de células germinativas pós-meióticas, pois regula a passagem de moléculas para dentro e para fora do epitélio seminífero; além disso, atua como barreira imunológica (Dym e Fawcett, 1970; Setchell e Waites, 1975). Junções comunicantes ou “gap” também são encontradas entre as células de Sertoli adjacentes, entre células de Sertoli e espermatídes (apenas as espermatídes fase 1-7) e entre espermátócitos e

espermátogônias. As junções “gap” são compostas por 2 conexons ou hemicanais proteicos, cada um deles formado por um hexâmero de conexinas (Cx). Pelo menos 20 Cx são encontradas em humanos e roedores, tais como Cx 43, Cx 26 e Cx 33 (Cheng et al., 2011). Estudos recentes mostraram que as Cx regulam vários processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento e função testicular, como proliferação e diferenciação de células de Sertoli e germinativas, migração e apoptose das células germinativas. A Cx43, a Cx predominante nos testículos, é essencial para a espermatogênese (Pointis et al., 2011). Em um estudo com rato Sprague-Dawley foram encontradas duas isoformas da Cx 43 no testículo (39 kDa e 41 kDa), a de 39 kDa foi detectada predominantemente nos túbulos seminíferos e nas células germinativas, enquanto que as células de Sertoli expressaram tanto a de 39 kDa quanto de 41 kDa, embora esta última tenha sido aparentemente mais fraca (Li et al., 2009a).

Há uma crescente evidência de que vários fatores de crescimento e citocinas estão envolvidos no controle local de mecanismos que influenciam as células germinativas a realizarem mitose e os processos de divisão por meiose durante a espermatogênese (de Kretser et al., 1998). A tabela 1 indica os principais sítios de produção de algumas citocinas e do FGF-2 no testículo.

Dentre as citocinas, a interleucina-1 α (IL-1 α) é predominantemente secretada pelas células de Sertoli em testículos de ratos e humanos adultos e age como um mitógeno, regulando a replicação do DNA de espermátogônias e espermátócitos em pré-leptóteno. Ao contrário da IL-1 α , a interleucina-1 β (IL-1 β) não parece ser produzida em quantidades significativas nos testículos normais. No entanto, em situações de infecção e inflamação os macrófagos testiculares são estimulados a secretar IL-1 β , e a secreção de IL-1 α pelas células de Sertoli aumenta (Stéphan et al., 1997). Ambas influenciam em várias funções das células de Sertoli, incluindo a produção de lactato e de transferrina (Karzai e Wright, 1992; Nehar et al., 1998). A IL-6 é muito importante na regulação da inflamação e imunidade (Bravo e Heath, 2000) e no testículo pode gerar diferentes respostas, tais como crescimento e diferenciação celular ou interrupção do crescimento e apoptose (Oritani et al., 1999; Kamimura et al., 2003).

Tabela 1. Principais sítios de produção no testículo de algumas citocinas e do FGF-2.

Citocinas e		
Fator de Crescimento	Sítios de produção no testículo	Referências
IL-1α	Espermatócitos em paquíteno em ratos imaturos	Haugen et al., 1994
	Espermátides	
	Células de Sertoli	Syed et al., 1988;
	Células de Leydig	Lin et al., 1993; Cudicini et al., 1997
IL-1β	Células germinativas	Elheija et al., 2011
	Células de Sertoli	Lin et al., 1993; Cudicini et al., 1997
	Células de Leydig	
IL-6	Células de Sertoli (após estímulo de FSH, testosterona, neuropeptídeos e corpos residuais)	Okuda et al., 1994, 1995; Syed et al., 1995; Stéphan et al., 1997
	Células de Leydig (após estímulo de LH)	Boockfor et al., 1994; Cudicini et al., 1997
TNF-α	Espermatócitos em paquíteno	De et al., 1993
	Espermátides	
	Células de Sertoli	Siu et al., 2003
	Macrófagos no interstício	Xiong and Hales, 1993, 1994; Moore and Hutson, 1994
FGF-2	Espermatogônias tipo A	Mayerhofer et al., 1991;
	Espermatócitos em paquíteno	Grootegoed et al., 2000
	Espermátides	
	Células de Sertoli	Cancilla et al., 2000

Outra citocina importante para a regulação da espermatogênese e esteroidogênese testicular é o fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α). O TNF- α é expresso normalmente pelas células germinativas e em condições de inflamação a sua produção aumenta. Essa citocina multifuncional estimula a secreção de transferrina e inibe a atividade aromatásica, a produção de lactato e de inibina pelas células de Sertoli (Siu et al., 2003; Lysiak, 2004; Petersen e Söder, 2006). Também modula a sobrevivência e apoptose das células germinativas (Riccioli et al., 2000; Pentikäinen et al., 2001).

Entre as glicoproteínas de regulação encontram-se os fatores de crescimento ou fatores parácrinos como o FGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto tipo 2). O FGF-2 está envolvido tanto no desenvolvimento como na manutenção da função testicular (Mayerhofer et al., 1991; Lahr et al., 1992; Gonzalez-Herrera et al., 2006). Nos testículos imaturos, o FGF-2 é expresso principalmente pelas células de Sertoli, sendo essa expressão dependente da idade (Cancilla et al., 2000). A expressão de FGF-2 também foi observada em células germinativas, especialmente em espermatogônias do tipo A, espermatócitos em paquíteno e espermátides no testículo adulto de ratos e camundongos (Mayerhofer et al., 1991; Grootegoed et al., 2000). O FGF-2 age como um fator mitogênico nos gonócitos estimulando a atividade proliferativa destas células após 3 ou 5 dias, sendo dessa forma, um fator importante no início da espermatogênese, pelo menos *in vitro* (Van Dissel-Emiliani et al., 1996). Por estar envolvido na proliferação e diferenciação das células do testículo, o FGF-2 tem um papel fundamental na produção de gametas, bem como na síntese e liberação de esteroides (Koike e Noumura, 1994; Laslett et al., 1995; Van Dissel-Emiliani et al., 1996; McLachlan, 2000). Sabe-se que o FGF-2 induz a produção de testosterona pelas células de Leydig (Sordoillet et al., 1992) e é regulado geneticamente por testosterona no testículo adulto (Gonzalez-Herrera et al., 2006).

As citocinas em conjunto com a testosterona tem um papel importante na reestruturação da BHT (Yan et al., 2008). Dentre elas, o TNF- α e a IL-1 α estão relacionados com o aumento da permeabilidade das junções na BHT, entretanto mediados por mecanismos diferentes (Li et al., 2006; Xia et al., 2006; Sarkar et al., 2008), enquanto que a testosterona promove a reestruturação das junções na BHT (Meng et al., 2005; Wang et al., 2006), para que ocorra a passagem do espermatócito em pré-leptóteno do compartimento basal para o compartimento apical durante a espermatogênese (Figura 2).

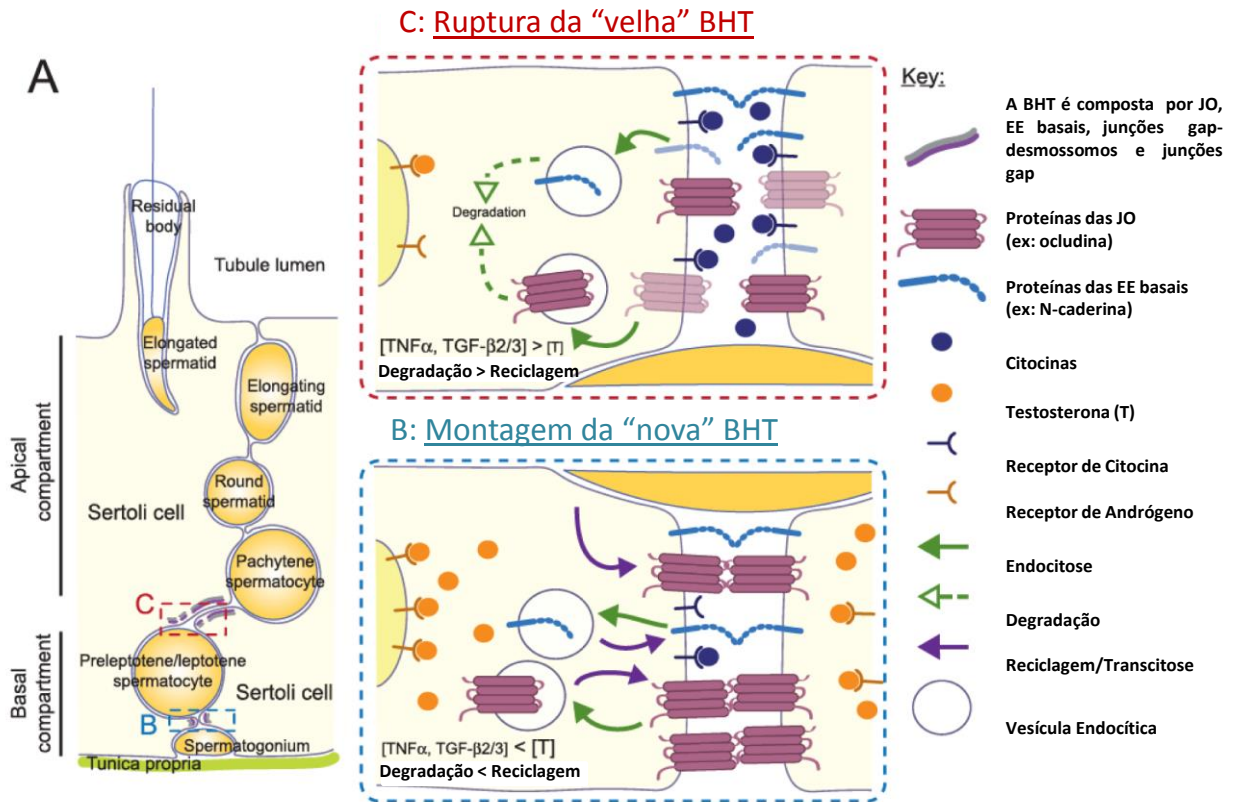


Figura 2. Esquema representando as interações de testosterona e citocinas incluindo TNF- α e TGF- β s na regulação da dinâmica de junção no epitélio seminífero durante a espermatogênese. O epitélio seminífero do testículo é subdividido pela BHT em compartimento apical e basal (A). Espermatócitos em pré-leptótenos estão em trânsito na BHT nos estágios VIII-IX do ciclo do epitélio seminífero para continuar o desenvolvimento de células germinativas no compartimento apical. Ambos, testosterona e citocinas, aceleraram a endocitose de proteínas integrais de junção na BHT, mas têm efeitos opostos sobre a integridade BHT. A testosterona promove a reciclagem das proteínas por endocitose enquanto citocinas induzem a degradação das proteínas por endocitose. Por isso, a testosterona pode promover a reestruturação da junção no lado basal de um espermatócito em trânsito (B). Os complexos de junção do lado apical do espermatócito seriam rompidos por citocinas, tais como TNF- α e TGF- β s para acomodar o movimento entre o espermatócito na BHT (C). O espermatócito em pré-leptóteno poderia então passar através da BHT sem afetar sua integridade simultaneamente. Legenda: JO: junções de oclusão, EE basais: especializações ectoplasmáticas basais (Extraído e modificado de Li et al., 2009b).

A obesidade é um grave problema de saúde pública devido à crescente incidência global e efeitos negativos sobre os sistemas orgânicos (Chen et al., 2009; WHO, 2015). Além disso, e talvez ainda mais preocupante, é a crescente prevalência de sobrepeso e obesidade entre lactantes e crianças em todo o mundo, visto que a obesidade infantil aumenta significativamente a suscetibilidade a doenças crônicas no adulto (Catalano e Ehrenberg, 2006; Catalano et al., 2009; Symonds et al., 2009).

Assim, são cada vez mais evidentes os efeitos negativos da obesidade materna na prole, os quais, em geral, se estendem até a idade adulta (Catalano e Ehrenberg, 2006; Chen et al., 2009). Diversas evidências sugerem que os efeitos epigenéticos induzidos durante o período perinatal produzem adaptações persistentes na estrutura, fisiologia e metabolismo de diversos órgãos (Armitage et al., 2005; Symonds, 2007; White et al., 2009). Com relação a alterações nutricionais materno-fetais, foram demonstradas em estudos animais que a dieta materna rica em gordura leva à obesidade na idade adulta (Catalano e Ehrenberg, 2006; Yura et al., 2005). Isso é devido, pelo menos em parte, à resistência à leptina, o hormônio regulador do apetite (Yura et al., 2005). Um aumento prematuro da leptina altera a programação e o desenvolvimento no hipotálamo da leptina, o que leva a obesidade nos adultos (Heindel e Saal, 2009).

A obesidade, na idade adulta, também acarreta outras alterações no sistema endócrino, afetando o eixo hipotálamo-hipófise-gônada e os níveis de gonadotrofinas e esteroides sexuais (Pasquali, 2006; Pasquali et al., 2007; Cano et al., 2008; Hammoud et al., 2008; Kasturi et al., 2008; MacDonald et al., 2010). Dados clínicos e obtidos com modelos experimentais revelam que a obesidade masculina pode estar associada ao hipogonadismo e disfunção erétil (Chung et al., 1999; Esposito et al., 2004; Pasquali, 2006; Pasquali et al., 2007; Cano et al., 2008; Hammoud et al., 2008; Kasturi et al., 2008). Existem amplas evidências epidemiológicas e experimentais apontando para maiores taxas de subfertilidade e infertilidade masculina em indivíduos obesos (Guzick et al., 2001; Jensen et al., 2004; Kort et al., 2006; Sallmen et al., 2006; Nguyen et al., 2007; Ramlau-Hansen et al., 2007; Hammoud et al., 2008; Martini et al., 2012). Assim, tem sido constatado que a obesidade em adultos afeta a qualidade do sêmen por diminuir a concentração, contagem total e

motilidade de espermatozoides (Slama et al., 2002; Jensen et al., 2004; Magnusdottir et al., 2005; MacDonald et al., 2010; Mah e Wittert, 2010; Fernandez et al., 2011). Entretanto, pouco é conhecido sobre os efeitos do ambiente obesogênico (AO) na gestação ou nas fases iniciais do desenvolvimento pós-natal sobre o desenvolvimento testicular e fertilidade no adulto.

Em um estudo recente realizado em nosso laboratório foi comparado os efeitos da obesidade/consumo de dieta hiperlipídica em diferentes fases do desenvolvimento de ratos sobre a produção espermática na idade adulta (Reame et al., 2014). Os dados indicaram que o prejuízo para produção espermática é mais grave quanto maior o grau de comprometimento metabólico secundário à obesidade e quanto menor a síntese de testosterona. Interessantemente, além disso, constatamos que a obesidade materna e o excesso de lipídeos na gestação são tão prejudiciais para a eficiência espermática na idade adulta quanto à exposição ao AO por períodos prolongados, em fases posteriores do desenvolvimento. É conhecido que as alterações hormonais ou nutricionais podem levar a programação testicular e alterar a função do órgão na idade adulta, mas pouco é conhecido sobre os efeitos do AO no desenvolvimento desse órgão e em particular das células de Sertoli (Ramlau-Hansen et al., 2007). Considerando o papel central dessas células para a função espermatogênica, torna-se relevante avaliar se as mesmas também são afetadas pelo AO em diferentes fases do desenvolvimento e se isso interfere na expressão de fatores parácrinos por ela produzidos. Essas informações poderão trazer novos subsídios para interpretação dos mecanismos responsáveis pelo prejuízo espermático em situações de obesidade e as implicações para a fertilidade masculina.

Esse estudo investigou comparativamente os efeitos do AO, em fases diferentes do desenvolvimento, sobre a morfologia das células de Sertoli de ratos na idade adulta e sobre a expressão de AR e de receptores de estrógeno (ER β), da proteína Cx 43 e de fatores parácrinos intratesticulares, como as citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e o fator de crescimento FGF-2. Os períodos de exposição ao AO comparados foram: i) gestação, ii) gestação e amamentação, iii) após o desmame até a maturidade sexual, iv) da amamentação até a maturidade sexual, v) da gestação até a maturidade sexual.

Os resultados obtidos nesse estudo serão apresentados na forma de manuscrito.

Perturbações na sinalização parácrina de testículos de ratos *Wistar* expostos ao ambiente obesogênico induzido por dieta hiperlipídica: avaliação em diferentes fases do desenvolvimento

Vanessa Reame¹, Sebastião Roberto Taboga^{1,2}, Maria Etelvina Pinto-Fochi², Rejane Maira Góes^{1,2*}

¹Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas São Paulo, Brasil.

²Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

*Correspondência: Rejane Maira Góes. Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-970, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Telephone: +55 (17) 32212391, fax +55 (17) 32212390.
E-mail: remagoes@ibilce.unesp.br

Resumo

A obesidade está associada a vários prejuízos para o sistema reprodutor masculino. Um estudo recém-concluído em nosso laboratório indicou um prejuízo na produção espermática em ratos adultos sob efeito da obesidade em diferentes fases do desenvolvimento. Visando obter subsídios que nos permitam esclarecer os mecanismos intratesticulares que levaram ao comprometimento da produção espermática, foi investigado se os diferentes períodos de exposição ao ambiente obesogênico (AO) resultaram em alterações funcionais nas células de Sertoli e na expressão de fatores parácrinos intratesticulares envolvidos com a regulação testicular. Foram utilizados ratos Wistar adultos expostos à obesidade materna na gestação (O1), na gestação/ lactação (O2), ou sujeitos ao AO após desmame (O3), da lactação até a idade adulta (O4) ou da gestação até a idade adulta (O5). A obesidade materna ou o AO foram induzidos por dieta com 20% de lipídeos (ração controle: 4% de lipídeos), por 15 semanas. As análises em microscopia de luz não mostraram alterações morfológicas nas células de Sertoli e no número dessas células expressando o receptor de andrógeno nos estágios VII e VIII do ciclo do epitélio seminífero. Entretanto, a percentagem de túbulos com descolamento prematuro de células germinativas foi acentuada em O5, moderada nos grupos O1, O2 e O3 e menor em O4. A testosterona sérica diminuiu 60% em O3 e O5, 27% em O2, ~45% em O4 e não variou no O1. A dosagem de citocinas e de fator de crescimento, com o uso de ensaios multiplex, indicou aumento do TNF- α e a diminuição do FGF-2 no testículo dos grupos O1, O3 e O4, diminuição da IL-1 α e IL-1 β no grupo O2, e diminuição da IL-1 α no grupo O5. Nenhum grupo apresentou alteração para a IL-6. Adicionalmente, as análises por imunocitoquímica e por Western blotting mostraram que a expressão de conexina 43 diminuiu para o grupo exposto ao AO por toda a vida. As alterações no TNF- α e na IL-1 α pode ter aumentado a permeabilidade da barreira hematotesticular e juntamente com a queda na testosterona, podem explicar o descolamento de células germinativas e o prejuízo na eficiência e produção espermática. Esses dados indicam que o AO modula os fatores parácrinos testiculares de maneira diferencial, dependendo do período de exposição.

Palavras-chave: Obesidade, Testículo, Células de Sertoli, Fatores Parácrinos, Barreira Hematotesticular.

1. Introdução

Na última década, a prevalência de sobrepeso e obesidade aumentou em um ritmo alarmante nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento (Abelson e Kennedy, 2004; Haslam e James, 2005; WHO, 2015). Cerca de 13% da população mundial adulta (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesos em 2014 (WHO, 2015). O desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica pode ser iniciado muito cedo, ainda durante o desenvolvimento fetal e/ou neonatal, especialmente por meio da alimentação materna inadequada (Mcmillen e Robinson, 2005; Plagemann, 2005). Estudos também indicam que a obesidade materna durante a gravidez e o aleitamento aumenta o stress oxidativo no sêmen e no testículo da prole de ratos levando ao envelhecimento prematuro da capacidade reprodutiva (Rodríguez-González et al., 2015).

A obesidade provoca graves efeitos negativos sobre os sistemas orgânicos (Chen et al., 2009; WHO, 2015), inclusive prejuízos para o sistema reprodutor masculino (Moschos et al., 2002; Hammoud et al., 2006; MacDonald et al., 2010). Os dados da literatura indicam que a obesidade na idade adulta pode afetar a fertilidade por meio de três diferentes mecanismos: **1)** desequilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, pois indivíduos obesos do sexo masculino apresentam redução de testosterona, gonadotrofinas, SHBG (globulina ligadora de hormônios sexuais) e inibina B e aumento de estrógeno (Hammoud et al., 2006; 2008; Kasturi et al., 2008; MacDonald et al., 2010); **2)** aumento de liberação de hormônios como a leptina pelo tecido adiposo, o qual pode alterar o eixo hipotálamo-hipófise-gônada e também inibir a esteroidogênese das células de Leydig e reduzir a produção espermática (Caprio et al., 1999; Moschos et al., 2002) e **3)** aumento de citocinas produzidas pelo tecido adiposo (adipocitocinas), como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (Kim e Moustaid-Moussa, 2000; Ronti et al., 2006; Henry et al., 2012), importantes reguladores parácrinos da espermatogênese e da esteroidogênese (Guazzone et al., 2009).

A regulação do desenvolvimento testicular e em particular das células de Sertoli é bastante complexa e vulnerável a agentes que perturbem o cenário ou a ação de esteroides sexuais (Hutchison et al., 2008; Sharpe, 2010). Na idade adulta, as células de Sertoli fornecem o suporte estrutural e fisiológico para a espermatogênese, auxiliando na formação

e reestruturação da barreira hematotesticular (BHT) (Sharpe, 1994). A espermatogênese é dividida em 4 principais fases: (i) mitose espermatogonial, (ii) meiose, (iii) espermiogênese e (iv) espermição. Com exceção da primeira fase, todas as outras ocorrem no microambiente formado pela BHT que confere uma barreira imunológica que segrega todo o desenvolvimento das células germinativas pós-meióticas do sistema imune. Sendo assim é concebível que as junções entre as células de Sertoli adjacentes e entre essas e as células germinativas devam ser renovadas continuamente para acomodar a translocação e a transformação morfológica de células germinativas durante o seu desenvolvimento (Li et al., 2009a). Essas junções, ou seja, junção de adesão, junção gap e junções de oclusão, são importantes para manter a espermatogênese. As junções gap formam canais transmembrânicos entre as células adjacentes, o que permite a comunicação bidirecional entre elas (Goodenough, 1978). No testículo, essas junções são formadas pela Conexina 43 (Cx 43), a qual pode ter propriedades de junções gap e desmossomos no epitélio seminífero (Russell, 1977) desempenhando um papel essencial na espermatogênese (Risley et al., 1992).

Além disso, é conhecido que a espermatogênese é regulada tanto por mecanismos endócrinos quanto parácrinos (de Kretser, 1998). As citocinas e fatores de crescimento são polipeptídeos produzidos por uma variedade de células de origem imunológica e não imunológica (Dinarello, 1996) e estão envolvidos em mecanismos locais que regulam a renovação das células tronco (de Kretser, 1998). No testículo, as citocinas estão especialmente envolvidas na manutenção do microambiente imunossupressor criado nos túbulos seminíferos pela presença da BHT (Hedger e Meinhardt, 2003), bem como no controle da reestruturação das junções que compõe essa barreira (Lui e Cheng, 2007). Assim, a IL-1 e o TNF- α são conhecidos por regular a dinâmica da BHT via mecanismos que envolvem endocitose e degradação de proteínas, em estágios específicos do ciclo do epitélio seminífero (Lie et al., 2011; 2012). A IL-1 pode ser encontrada nas formas IL-1 α e IL-1 β , ambas são secretadas por macrófagos e são citocinas pleiotrópicas com muitos efeitos bem caracterizados sobre as respostas imunes em diversos tecidos, podendo causar inflamação e induzir a expressão de peptídeos pró-inflamatórios (Dinarello, 1996; Stylianou e Saklatvala, 2000). No testículo, a IL-1 α também é expressa por espermátócitos em paquíteno em ratos imaturos (Haugen et al., 1994) e por células de Sertoli, onde a

produção aumenta durante a maturação sexual. (Gérard et al., 1991; Jonsson et al., 1999). Assim como a IL-1 α , a IL-6 também é uma citocina pró-inflamatória e está envolvida na modulação da permeabilidade da BHT (Pérez et al., 2012). No testículo do rato, o TNF- α é expresso por espermátides esféricas, espermatócitos em paquíteno e macrófagos testiculares, e seu receptor se encontra tanto em células de Sertoli quanto de Leydig (De et al., 1993). O TNF- α é uma citocina multifuncional com efeitos não apenas em resposta pró-inflamatória (Fiers, 1991), mas em respostas imuno-reguladoras (Beutler, 1995), apoptose (Baker e Reddy, 1998), e também regula (induz/inibe) a esteroidogênese pelas células de Leydig (Warren et al., 1990; Skinner, 1991; Verajankorva et al., 2001) e a secreção de transferrina pelas células de Sertoli (Boockfor e Shwarz, 1991; Hoebe et al., 1996). Outro regulador da espermatogênese é o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) que é expresso e secretado por células de Sertoli em mamíferos e estimula a auto-renovação de células tronco espermátogoniais (Kubota et al., 2004; Mirzapour et al., 2012). Também expresso pelas células da linhagem germinativa, o FGF-2 induz a produção de testosterona pelas células de Leydig (Sordoillet et al., 1992) e por sua vez a testosterona promove a regulação gênica do FGF-2 no testículo adulto (Gonzalez-Herrera et al., 2006). Dessa forma o FGF-2 é um componente importante para a espermatogênese, pois regula a comunicação entre as células germinativas e entre essas e as células de Sertoli (Han et al., 1993).

Em um estudo recente realizado em nosso laboratório foi comparado os efeitos da obesidade/consumo de dieta hiperlipídica em diferentes fases do desenvolvimento de ratos sobre a produção espermática na idade adulta (Reame et al., 2014). Os dados indicaram que o prejuízo para produção espermática é mais grave quanto maior o grau de comprometimento metabólico secundário à obesidade e quanto menor a síntese de testosterona. Interessantemente, além disso, constatamos que a obesidade materna e o excesso de lipídeos na gestação são tão prejudiciais para a eficiência espermática na idade adulta quanto à exposição ao ambiente obesogênico (AO) por períodos prolongados, em fases posteriores do desenvolvimento. Em continuidade a esse estudo e visando obter subsídios que nos permitam esclarecer os mecanismos intratesticulares que levaram ao comprometimento da produção espermática, nós investigamos se os diferentes períodos de exposição ao AO resultaram em alterações morfológicas e funcionais nas células de Sertoli

e modificaram o ambiente parácrino intra-testicular. Foram comparados os efeitos da exposição ao AO na i) gestação, ii) gestação e amamentação, iii) após o desmame até a maturidade sexual, iv) da amamentação até a maturidade sexual, v) da gestação até a maturidade sexual.

2. Materiais e Métodos

Animais e delineamento experimental

Ratos da linhagem Wistar foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Durante o período experimental, os ratos foram mantidos no biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP), em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, alimentados com ração “*ad libitum*” e água filtrada. Todos os procedimentos referentes ao manuseio e experimentação animal efetuados estão de acordo com as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal desse Instituto (CEE/IBILCE protocolo nº. 022/09).

Os períodos de exposição ao AO, utilizados no presente estudo, estão ilustrados na Figura 1, que resume o delineamento experimental. Foram utilizados animais adultos, com 18 semanas de idade, anteriormente subdivididos nos seguintes grupos (n=15 por grupo): C- controle (filhos de mães normais e tratados com dieta balanceada para roedores); O1- AO durante o período gestacional (filhos de mães obesas transferidos para mães normais ao nascimento); O2- AO durante o período gestacional até o desmame (filhos de mães obesas amamentados em ninhada reduzida para quatro filhotes); O3- AO do desmame até a maturidade sexual (filhos de mães normais tratados com dieta hiperlipídica a partir do desmame); O4- AO após o nascimento até a maturidade sexual (filhos de mães normais transferidos para mães obesas ao nascimento e tratados com dieta hiperlipídica a partir do desmame); O5 - AO desde a gestação até a maturidade sexual (filhos de mães obesas, amamentados em mães obesas com ninhada reduzida para quatro filhotes e tratados com dieta hiperlipídica a partir do desmame). Nesse experimento, as fêmeas normais e obesas foram acasaladas com ratos normais, na proporção 1:1, no período noturno. O dia zero da

prenhêz foi determinado a partir de esfregaço vaginal para constatação da presença de espermatozoides. Durante a prenhez as fêmeas foram mantidas em caixas individuais.

A indução da obesidade materna ou à exposição ao AO da prole na vida pós-natal foram efetuadas pelo tratamento com dieta hiperlipídica e hipercalórica por 15 semanas. Essa dieta foi padronizada pelo Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e adquirida da Agrocere (Campinas, SP, Brasil) e contém 20% de lipídios contra 4% da dieta convencional. As mães e filhos controle foram tratados pelo período equivalente com dieta balanceada para roedores, fornecida pelo mesmo fabricante.

A transferência dos filhos de mães obesas para normais e vice-versa foi realizada pela técnica do “crossfostering”, segundo os procedimentos de Chernoff et al. (2009), onde os animais filhos de mães obesas, no dia do nascimento, foram transferidos às mães controle e concomitantemente os filhos de mães controle, nascidos no mesmo dia, foram transferidos às mães obesas.

Ao final do período experimental, parte dos animais foram eutanasiados por inalação de CO², seguida de decapitação para coleta de sangue e parte foi anestesiada e submetida à perfusão (Sprando, 1977).

Parâmetros biométricos e metabólicos

Os seguintes parâmetros metabólicos e bioquímicos foram avaliados:

- 1- *Peso corpóreo*: Os animais foram pesados após o desmame e no dia do sacrifício.
- 2- *Circunferência abdominal*: Foi medida após o desmame e no dia do sacrifício, para verificação da inferência de deposição de gordura abdominal.
- 3- *Peso úmido do testículo e epidídimo*: Foram determinados após a dissecação dos mesmos.
- 4- *Índice Gônado-Somático (IGS)*: Foi calculado com base na massa corporal e testicular, a partir da seguinte fórmula: $IGS = (\text{Peso testicular} / \text{Peso corporal}) \times 100$.
- 5- *Índice de adiposidade*: As gorduras retroperitoneal, visceral e epididimal foram isoladas e pesadas em todos os grupos após a morte do animal para determinação do índice de adiposidade: $(\text{soma das gorduras retroperitoneal, visceral e epididimal} / \text{peso corporal}) \times 100$ [Taylor e Phillips, 1996; Jeyakumar et al., 2009).

6- *Dosagens hormonais plasmáticas*: Amostras de sangue, coletadas no momento da decapitação, foram centrifugadas e estocadas a -80°C para posterior análise. Os níveis plasmáticos de testosterona, estradiol e leptina foram quantificados por ELISA Captura/Sanduiche (anticorpo-antígeno-anticorpo) utilizando kits comerciais específicos (Enzo Life Sciences International Inc., PA, EUA). Foram utilizados pelo menos 7 animais de cada grupo experimental e cada amostra foi analisada em triplicata.

Processamento dos testículos e análises morfológicas

Os animais cujos testículos foram utilizados para análises morfológicas, foram perfundidos como descrito previamente (Sprando, 1977). Assim, cinco ratos foram anestesiados com Ketamina (800 µl/kg) e Xilasina (200µl/kg), e os testículos e epidídimos direitos foram removidos e congelados, e a artéria testicular direita foi clampada. Em seguida, os animais receberam, via aorta, solução salina heparinizada seguida do fixador Bouin. Logo após a perfusão, os testículos esquerdos foram removidos, fixados adicionalmente por imersão durante 6 horas, fragmentados e lavados por vários dias em álcool 70% para remoção do ácido pícrico. Então, processados para inclusão em historesina (Leica-historesin embbeding kit, Nussloch, Alemanha) e em Paraplast (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os cortes histológicos em historesina (3µm de espessura) foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) e Periodic Acid Schiff (PAS) para estudos morfológicos gerais. Os cortes histológicos em parafina (4µm de espessura) foram aderidos em lâminas previamente silanizadas e submetidos à imunocitoquímica. As lâminas histológicas foram analisadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenaval, acoplado com câmara digital CCD e Sistema de aquisição e de Imagens.

Reação imunocitoquímica

Os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 e aquecidos a 98°C por 45 minutos para a recuperação antigênica. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi efetuado tratando-se os cortes com H₂O₂ 3% em metanol por 20 minutos. A seguir, o bloqueio de interações proteicas inespecíficas foi realizado através de albumina bovina 4% em PBS e soro normal de cavalo. Os cortes foram incubados com anticorpo primário para o receptor de andrógeno (AR: sc-816; Santa Cruz Biotechnology) diluído 1ul:75ul em BSA

1% ou com anticorpo Cx 43 (C6219; Sigma-Aldrich) diluído 1ul:100ul em BSA 1%, “overnight”, a 4°C. Após serem lavados em PBS e incubados em anticorpo secundário apropriado (Santa Cruz Biotechnology), os cortes passaram pela incubação com avidina/biotina (Novo Stain Super ABC kit, Novocastra) por 45 minutos. A revelação foi feita com diaminobenzidina- DAB, durante 3 minutos e a contra-coloração com hematoxilina de Harris. Os controles negativos para todas as reações imunocitoquímicas foram obtidos por omissão do anticorpo primário.

A imunocitoquímica para o AR foi avaliada quantitativamente nos túbulos seminíferos nos estágios VII e VIII do ciclo seminífero (cinco animais por grupo), os quais são mais dependentes de andrógeno e exibem a maior expressão desse receptor (Leblond e Clermont, 1952; Vornberger et al., 1994). As células de Sertoli positivas para o AR nesses estágios foram quantificadas e esse dado foi expresso como porcentagem de células de Sertoli marcadas/total destas células no túbulo.

Análise do conteúdo de proteínas por Western Blotting

Foram quantificados, com o uso de “Western blotting”, os níveis do AR, da Cx 43 e do receptor de estrógeno β (ER- β). Para isso, fragmentos testiculares foram mantidos a -80°C, após o sacrifício até o início das análises. O tecido foi homogeneizado a 0°C em tampão de extração RIPA (Sigma, StLois, MO, USA), coquetel de inibidores de proteases (Sigma, StLois, MO, USA) e Triton X 100. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min a 4°C para a precipitação das membranas e o sobrenadante foi armazenado. A dosagem de proteínas dos extratos foi realizada pelo método de Bradford, e 50 μ g de proteínas foram submetidos à SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em leite desnatado 5% em tampão Tris contendo 0,2% de Tween 20 (TBST) por 30 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas com o anticorpo primário AR (sc-816; Santa Cruz Biotechnology) ou Cx 43 (C6219; Sigma-Aldrich) ou ER- β (sc-8974 Santa Cruz Biotechnology), diluído 1:400 (AR e ER- β) ou 1:500 (Cx43) em BSA 1% em TBST “overnight” a 4°C. Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico diluído 1:4000 (AR e ER- β) ou 1:5000 (Cx 43) em BSA 1% em TBST por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram

revelados pelo kit de detecção quimioluminescente ECL (Bio-rad). Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 minuto com Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo-Scientific-Pierce, Rockford, IL, USA) e a intensidade luminescente foi capturada no Chemi-Doc System (Bio-Rad, Amadora, PT). A densidade das bandas foi analisada em programa de densitometria – ScionImage. Como controle interno, cada membrana foi recuperada da ligação com o primeiro anticorpo e incubada com β -actina, diluída 1:400 em BSA 1%.

Quantificação de citocinas e hormônios solúveis por ensaios tipo multiplex

Fragmentos testiculares foram mantidos a -80°C , após o sacrifício até o início das análises. O tecido foi homogeneizado a 0°C em solução de coquetel de inibidor de protease (complete Mini, EDTA-free, Roche) com fosfatase (PhosSTOP, Roche). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 14000 rpm, por 10 minutos, a 4°C , e o sobrenadante foi armazenado. Posteriormente, esse material foi utilizado para determinação da concentração de diferentes citocinas e fator de crescimento, com o uso do sistema de detecção múltipla baseado em “beads” magnéticos. Foram usados painéis fabricados pela Millipore Corporation (Billerica, MA, USA) para a quantificação sérica e tecidual dos seguintes fatores: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α (RECYTMAG-65K) e FGF-2 (HCYTOMAG-60K). As dosagens foram realizadas conforme a indicação do fabricante, utilizando-se seis amostras de diferentes animais por grupo. A leitura foi realizada em aparelho LUMINEX xMAP MAGPIX (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Os dados espectrométricos foram processados com o software MILLIPLEX® Analyst 5.1.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo GraphPad Prism 6.0 Software. Para identificar dados paramétricos ou não paramétricos foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados paramétricos foram comparados pelo teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey ou quando necessário pelo teste T, enquanto que os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 5$. Foram usadas as letras a, b, c e d para mostrar a diferença significativa entre os grupos.

3. Resultados

Dados biométricos e hormonais

Os dados biométricos e hormonais estão apresentados na Tabela 1. Em todos os grupos expostos ao AO (grupos O1, O2, O3, O4, O5), em relação ao controle (C), houve um aumento do peso corporal, da circunferência abdominal e do índice de adiposidade. O aumento no índice de adiposidade, em comparação com o controle, foi progressivo do grupo O1 ao grupo O5, sendo menor no grupo O1 (gestação), entre 70 e 80% nos grupos O2, O3 e O4, e o dobro no grupo exposto por toda a vida (O5). O peso do testículo e do epidídimo nos grupos sujeitos ao AO não alterou, mas com exceção dos grupos O1 e O2, todos os demais grupos experimentais apresentaram diminuição no IGS. Com relação aos níveis de leptina, observou-se um pequeno aumento no grupo O1, um aumento de duas vezes no grupo O2 e um aumento mais acentuado nos grupos O3, O4 e O5. Juntos esses dados indicam que, com exceção do grupo exposto ao AO apenas na gestação (O1), todos os demais ficaram obesos na idade adulta.

Em relação aos outros hormônios (estradiol e testosterona), os níveis séricos também não variaram no grupo exposto ao AO na gestação (O1). Entretanto os níveis de estradiol aumentaram nos grupos O2, O3 e O4 e esse aumento foi maior ainda no grupo exposto por toda a vida (O5), enquanto que os níveis séricos de testosterona diminuíram nos grupos obesos em comparação com o controle, principalmente nos grupos de maior período de exposição (O3, O4 e O5). Além disso, houve uma correlação inversa entre os níveis séricos de testosterona e de leptina para os grupos O2, O3, O4 e O5 (dados não mostrados). A figura 2 mostra as variações na produção espermática entre esses grupos (dados publicados em Reame et al., 2014).

Análises Morfológicas

O AO ocasionou densos aglomerados no lúmen tubular devido ao descolamento prematuro de células germinativas (Fig. 3B-F). A porcentagem de túbulos com descolamento prematuro de células germinativas foi acentuada em O5, moderada nos grupos O1, O2 e O3 e, apesar de não significativo estatisticamente, foi menor em O4 (Fig. 3G). A histologia testicular mostrou-se aparentemente normal (Fig. 4), entretanto, para o

grupo O5 a base do epitélio seminífero apareceu condensada, sendo usual sua separação do compartimento adluminal (Fig 3F e 4F).

Imunocitoquímica e Western Blotting

A exposição à dieta hiperlipídica não alterou a expressão de AR pelas células de Sertoli, visto que a intensidade da marcação (Fig. 5A-F) e a frequência de células positivas ao AR não variaram nos estágios VII e VIII do epitélio seminífero (Fig. 5G). Embora a imunocitoquímica não tenha indicado variação evidente para o AR, as análises dos níveis dessa proteína por Western Blotting, indicou diminuição significativa nos grupos O3, O4 e O5 (Fig. 5H). Por outro lado, a expressão de ER- β não variou entre os grupos (Fig. 6). A proteína Cx 43, também detectada por Western Blotting no testículo, apresentou uma única banda de ~ 39kDa. O AO causou diminuição significativa de 29,1% dessa proteína (Fig. 7A) no grupo de maior exposição à dieta hiperlipídica (O5), o que foi confirmado pela imunocitoquímica onde a marcação neste grupo foi menos expressiva (Fig. 7B-D).

Quantificação de citocinas e fator de crescimento

A Figura 8 mostra os efeitos do AO em diferentes fases da vida sobre a concentração intratesticular de citocinas e do FGF-2. Nos grupos O1, O3 e O4 houve um aumento do TNF- α (11,3%, 6,6% e 9,7% respectivamente) e uma diminuição do FGF-2 (21,1% para O1, 26,7% para O3 e 17,6% para O4) em relação ao controle. A IL-1 α diminuiu nos grupos O2 e O5 (22,7% e 36,1%, respectivamente) e a IL-1 β diminuiu somente no grupo O2 (36,8%). A IL-6 não sofreu alterações significativas nos grupos apresentados. As concentrações séricas dessas citocinas e do FGF-2 não mostrou diferença significativa entre os grupos, provavelmente devido a grande variação de valores observada dentro de cada grupo (Fig. 9).

4. Discussão

De acordo com um estudo publicado recentemente em nosso laboratório (Reame et al., 2014), no qual utilizou-se o mesmo delineamento experimental apresentado nesse trabalho, foram observados três níveis progressivos de comprometimento do estado metabólico

relacionados ao período e duração da exposição ao AO: os animais expostos na gestação (grupo O1) apresentaram apenas resistência à insulina, os expostos na gestação/lactação (grupo O2) tornaram-se resistentes à insulina e obesos, e aqueles expostos por períodos mais prolongados (grupos O3, O4 e O5) ficaram resistentes à insulina, obesos e diabéticos. Os prejuízos na produção diária de espermatozoides (PDE) foram proporcionais a esses três níveis de danos metabólicos e hormonais, sendo marginais em O1, aumentando em O2 e sendo ainda maiores em O3, O4, O5, e todos os grupos expostos ao AO, exceto O1, apresentaram queda nos níveis de testosterona (Reame et al., 2014). Em continuação a essas análises, o presente estudo fornece informações relacionadas ao comprometimento fisiológico das células de Sertoli que nos permite entender alguns dos mecanismos envolvidos na queda da produção espermática, mostrando que todos os grupos expostos ao AO apresentaram uma mudança no cenário de citocinas e fator de crescimento na dinâmica da reestruturação da BHT, causada por fatores e mecanismos diferentes de acordo com a fase de desenvolvimento em que foram expostos.

Os andrógenos e o estrógeno são essenciais para a fertilidade masculina e para a manutenção da espermatogênese (Sharpe, 1994; McLachlan et al., 2002; Carreau et al., 2011). As células de Sertoli são consideradas alvo da sinalização celular da testosterona e do estrógeno, os quais são necessários para que estas células suportem o desenvolvimento e a sobrevivência das células germinativas (Griswold, 1998; 2005). Essa sinalização é mediada, respectivamente, pelo AR e ER- β (McLachlan et al., 2002; Carreau et al., 2011). Mesmo tendo sido observadas variações nos níveis séricos de testosterona e estrógeno, nossas análises por imunocitoquímica e por Western Blotting indicam que a sinalização de andrógenos e estrógenos nas células de Sertoli não foi afetada pelo AO em nenhuma das fases examinadas. A expressão do ER- β não apresentou alterações significativas em nenhum dos grupos analisados. No caso do AR, o Western blotting mostrou uma diminuição significativa da quantidade de AR nos grupos O3, O4 e O5. Contudo, essas análises foram reforçadas pela análise da frequência de células de Sertoli expressando esse receptor, nos estágios VII e VIII do ciclo epitélial seminífero, e nenhuma variação foi observada entre os grupos. Esses estágios do ciclo foram escolhidos porque são os mais dependentes de andrógeno e, portanto, exibem uma maior expressão desses receptores (Leblond e Clermont, 1952; Vornberger et al., 1994), sendo portanto os mais indicados para

examinar alterações na sinalização de andrógenos. Portanto, essa diminuição do conteúdo de AR reflete uma menor expressão desses receptores por outros tipos celulares, como as células de Leydig, achado compatível com a redução da capacidade esteroidogênica dessas células, verificado para esses grupos (Pinto-Fochi et al., submetido).

Sabe-se que durante a espermição, que em ratos ocorre no estágio VIII do ciclo do epitélio seminífero, a BHT sofre uma reestruturação (Mruk et al., 2004). Várias vias de sinalização estão envolvidas nessa reestruturação, as quais podem ser reguladas por citocinas, fatores de crescimento, hormônios e proteínas (Li et al., 2009a). O TNF- α , TGF- β 2 (Fator de Crescimento Transformador beta 2) e TGF- β 3, atuam em conjunto com a testosterona (Yan et al., 2008), promovendo a integridade das junções na BHT (Meng et al., 2005; Wang et al., 2006). Citocinas e testosterona podem promover a dinâmica no processo de reestruturação da BHT por atuarem respectivamente na “abertura” e “fechamento” das junções, necessária à passagem de espermátócitos pré-leptótenos na BHT, mantendo ao mesmo tempo a integridade da barreira imunológica (Yan et al., 2008). Contudo, alguns estudos indicam que o TNF- α e o TGF- β 3 em excesso são capazes de perturbar a integridade da BHT *in vivo* (Li et al., 2006; Xia et al., 2009). Em um estudo realizado com ratos Sprague–Dawley onde foi administrado 2 μ g/testículo de TNF- α , mostrou que 15% de 600 túbulos apresentaram sinais de descolamento de células germinativas, em especial das espermátides do epitélio seminífero (Li et al., 2006). Esse tratamento demonstrou que os níveis de TNF- α aumentado perturbam a adesão célula de Sertoli-célula germinativa principalmente no ápice do epitélio seminífero (Li et al., 2006). Xia e cols. (2006) demonstraram que o rompimento da BHT e a perda de adesão de células germinativas parecem ser causados, pelo menos em parte, por uma alteração na reciclagem de proteínas integrais de membranas e na sua redistribuição na interface célula de Sertoli e célula germinativa na BHT. No presente estudo, houve uma diminuição de testosterona circulante para todos os grupos expostos ao AO, exceto para o grupo O1 e um aumento da expressão do TNF- α nos grupos O1 (11,3%), O3 (6,6%) e O4 (9,7%). Conforme publicado anteriormente (Reame et al., 2014), com exceção do grupo O1, todos os grupos apresentaram queda na produção diária de espermatozoides (PDE), contudo, quando essa mesma contagem foi expressa por grama do testículo, verificou-se prejuízo espermático até mesmo para o grupo O1. Além disso, todos os grupos apresentaram descolamento de

células germinativas do epitélio seminífero. Dessa maneira, podemos sugerir que esses dois resultados, o aumento de TNF- α e a diminuição da testosterona, pelo aumento da permeabilidade das junções na BHT contribuíram para o descolamento dessas células o que pode ter levado ao prejuízo espermático. Podemos ainda sugerir que a queda na testosterona nos grupos O3 e O4 se deu pelo aumento de TNF- α , já que esta citocina em quantidade aumentada provoca queda nos níveis séricos de testosterona, conforme indicado em estudos com ratos Wistar e homens saudáveis (Mealy et al., 1990; van der Poll et al., 1993). No entanto, foi constatado que o grupo O1 não apresentou queda na testosterona e que a taxa de descolamento de células germinativas no grupo O4 não foi tão elevada como nos demais grupos. Isso demonstra que há uma variação dos mecanismos que podem gerar consequências negativas sobre a produção espermática e que pode haver uma resposta diferente dependendo da fase do desenvolvimento em que o animal foi submetido ao AO.

A IL-1 α é outra citocina que está envolvida na regulação da dinâmica das junções na BHT. Foi demonstrado um aumento da permeabilidade na BHT nos testículos de ratos Sprague–Dawley adultos após a administração local de três doses de IL-1 α (250 ng/testículo) com cada dose administrada com 1 dia de diferença (Sarkar et al., 2008). Curiosamente a IL-1 α é expressa no epitélio seminífero em todas as fases do ciclo do epitélio seminífero, exceto no estágio VII, no qual é expressa a um nível muito baixo (Jonsson et al., 1999; Wahab-Wahlgren et al., 2000), contrastando com o elevado nível de TNF- α e TGF- β 3 detectados nos estágios VII-VIII do ciclo do epitélio seminífero. Sendo assim, o perfil de expressão e os mecanismos que medeiam a “abertura” da BHT induzidos por IL-1 α parecem ser diferentes daqueles induzidos por TNF- α e TGF- β 3. A IL-1 α exerce o seu efeito sobre a rede do citoesqueleto de actina sem afetar os níveis de proteínas de junções (Sarkar et al., 2008), enquanto que TNF- α e TGF- β 3 são capazes de diminuir os níveis de proteínas e perturbar a localização das mesmas na junção de oclusão e nas especializações ectoplasmáticas basais na BHT, além de interromper a rede de filamentos de actina (Li et al., 2006; Xia et al., 2006). Outra diferença está nos efeitos sobre a integridade da BHT que quando causada pela IL-1 α é gradual e não se recupera, mesmo depois de 90 dias após a sua administração diretamente no testículo (Sarkar et al., 2008). Por outro lado, quando induzida por TGF- β 3 e TNF- α é transiente e rápida, sendo revertida após 14 dias da administração (Li et al., 2006; Xia et al., 2006; 2009). Com base nessas

diferenças, podemos explicar a diminuição na PDE nos grupos O2 e O5, que apesar de também apresentarem queda na testosterona, não apresentaram mudança nos níveis de TNF- α , contudo uma queda nos níveis de IL-1 α foi observada. Desse modo, podemos inferir que o prejuízo a PDE causado pela exposição ao AO durante a gestação/lactação, comum aos grupos O2 e O5, pode ter sido causados por alterações nos níveis de IL-1 α , pois nos grupos que foram expostos apenas durante a gestação (O1), a partir da amamentação (O4) ou do desmame (O3) os níveis dessa citocina não foram alterados. Em adição, o maior nível de prejuízo espermático no grupo O5 em comparação com o O2 deve-se provavelmente aos efeitos aditivos das alterações nos níveis de testosterona.

Além das citocinas acima mencionadas, também foi analisada a quantidade de FGF-2, um importante fator regulatório da espermatogênese (Van Dissel-Emiliani et al., 1996). O FGF-2 é expresso pelas células da linhagem germinativa e induz a produção de testosterona pelas células de Leydig (Sordoillet et al., 1992). Estudos realizados para bloquear a ação da testosterona em testículos de camundongos adultos (com 6 semanas), através da depleção de AR levou à uma diminuição de 20% do FGF-2, o que propõe a regulação gênica do FGF-2 por testosterona no testículo adulto (Gonzalez-Herrera et al., 2006). Pesquisas também sugerem que o FGF-2 pode estar envolvido na regulação da proliferação e diferenciação das células germinativas no testículo imaturo e adulto de ratos e camundongos. (Mayerhofer et al., 1991). O FGF-2 também é expresso e secretado por células de Sertoli em mamíferos, estimula a auto renovação das células tronco espermatogoniais e regula a proliferação das mesmas (Zhang et al., 2012). Baseado nesses dados, podemos concluir que a queda de FGF-2 nos grupos O3 e O4, além do aumento de TNF- α , está relacionada com a queda da testosterona e que por sua vez pode ter prejudicado a espermatogênese, o que levou a diminuição na PDE. Apesar do FGF-2 ter diminuído também no grupo O1, os níveis de testosterona e a PDE nesse grupo não foram afetados, contudo quando os valores de contagem de espermatozoides foram expressos em gramas por testículo verificou-se um pequeno prejuízo espermático para o O1. Portanto, aparentemente a diminuição do FGF-2 sem a diminuição da testosterona não é capaz de causar um prejuízo espermático tão grave quanto aquele observado nos demais grupos. Por outro lado, o grupo O2 demonstrou queda nos níveis de testosterona e também na PDE, entretanto a queda nos níveis de FGF-2 não foi significativa, indicando que os prejuízos

espermáticos nesse grupo ocorreram devido à ação de outros fatores, como a IL-1 β , por exemplo, a qual apresentou diminuição significativa apenas no grupo O2. A IL-1 β é uma citocina inflamatória, que tem papel na diferenciação e desenvolvimento de linfócitos e no testículo pode estar envolvida na proliferação de espermatogônias, diferenciação de células germinativas, secreção de proteínas das células de Sertoli e na esteroidogênese (Stéphan et al., 1997; Gow et al., 2001).

A ação de outros mecanismos parece estar presente no grupo O5, pois esse grupo apresentou queda de testosterona e na PDE, contudo os níveis de FGF-2 apresentou um aumento em relação aos outros grupos expostos ao AO igualando os níveis observados para o grupo controle. O aumento de FGF-2 parecer ser consequência de exposição prolongada à dieta hiperlipídica, visto que a indução de obesidade em ratos Wistar pelo consumo prolongado dessa dieta aumentou o FGF-2 na próstata que levou a alterações estromais nesse órgão (Ribeiro et al., 2012). Além das citocinas discutidas acima e do FGF-2, a proteína Cx também participa da formação e regulação da BHT (Pelletier et al., 1995). Ao analisarmos a quantidade desta proteína no testículo, por Western blotting, uma única banda de ~ 39kDa foi detectada, o que corrobora o estudo de Li et al. (2009b), indicando uma isoforma da Cx 43 de menor peso molecular para o testículo de ratos Sprague-Dawley. De acordo com essa análise, apenas o grupo de maior exposição à dieta hipercalórica (O5) apresentou diminuição significativa dessa proteína. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a Cx 43 é capaz de regular outras proteínas dos complexos juncionais intercelulares que ocorrem entre as células adjacentes epiteliais (Kojima et al., 2007) e do epitélio seminífero (Carette et al., 2010). Nos testículos, este controle não é crucial para manter a integridade da BHT, mas provavelmente interfere na dinâmica da barreira, o que pode levar a um comprometimento no trânsito de células germinativas em todo o epitélio seminífero e, consequentemente, alterar a espermatogênese (Carette et al., 2010). Curiosamente, quando foi realizado o knockout para a expressão de Cx43 e da proteína adaptadora desmossomal placofilina-2 (pKP2) simultaneamente, a integridade da junção de oclusão na BHT teve perdas e houve uma redistribuição de suas proteínas, sugerindo que Cx43 e pKP2 na junção gap-desmossomo e/ou junção gap podem participar na regulação da dinâmica da BHT (Li et al., 2009b). Além disso, a redução e/ou uma mudança de localização da Cx43 no epitélio seminífero foi observada em estudos em que a adesão celular e a integridade da junção no

testículo foram afetadas negativamente, tal como por tóxicos ambientais ou drogas (Fiorini et al., 2004; 2006; Gilleron et al., 2009; Li et al., 2009b; 2009c). Assim, a redução do conteúdo de Cx 43 no grupo O5, provavelmente também contribuiu com o prejuízo espermático observado nos animais desses grupos, pois foi o grupo que apresentou mais alterações morfológicas, como condensação da base do epitélio seminífero com sua separação do compartimento adluminal e maior taxa de descolamento do epitélio seminífero. Entretanto, seriam necessárias análises mais detalhadas para confirmar essa aparente condensação e separação do compartimento adluminal.

Outras citocinas do tipo interleucinas também foram avaliadas, como a IL-1 β , citada anteriormente, e a IL-6. Assim como a IL-1 β (Stéphan et al., 1997; Gow et al., 2001), a IL-6 tem a capacidade de induzir inflamação local no testículo podendo causar danos nos túbulos seminíferos (Pérez et al., 2012). Entretanto, em nosso estudo não houve aumento significativo na quantidade dessas interleucinas, demonstrando que a exposição ao AO, nessas condições, não provoca surgimento de processos inflamatórios no testículo.

Conforme publicado anteriormente, todos os grupos apresentaram de alguma forma, prejuízos morfológicos, hormonais e espermáticos (Reame et al., 2014). Adicionalmente, no presente trabalho verificamos que todos os grupos exibiram alteração em pelo menos um dos fatores avaliados. Os grupos O1, O3 e O4 apresentaram aumento do TNF- α e a diminuição do FGF-2 e ambos esses resultados justificam a queda de testosterona nos grupos O3 e O4; o O2 apresentou diminuição da IL-1 α e IL-1 β ; e o O5 apresentou diminuição da IL-1 α e diminuição da Cx 43. O aumento do TNF- α e a diminuição do FGF-2 influenciaram os grupos expostos ao AO somente durante a gestação, ou amamentação + pós-desmame ou pós-desmame. A diminuição da IL-1 α teve ação negativa sobre os grupos expostos ao AO durante gestação + amamentação. Enquanto a Cx 43, agiu exclusivamente no grupo exposto ao AO em todas as fases. Apesar do grupo O5 ter sido o mais exposto ao AO, ele não apresentou alterações no TNF- α e no FGF-2 em relação ao grupo controle, apenas na IL-1 α , o que pode significar que para a exposição prolongada ao AO outros fatores, como os endócrinos, parecem ter sido mais afetados do que os parácrinos aqui analisados, contudo o TNF- α e o TGF- β 3 atuam da mesma maneira na dinâmica da BHT (Li et al., 2006; Xia et al., 2009) e o TGF- β 3 não foi analisado no presente trabalho e talvez seja a quantidade dessa citocina que tenha sido alterada nesse grupo, no entanto seria

necessário outras análises para investigar essa possibilidade. Dessa maneira, podemos concluir que o AO promove uma alteração na dinâmica da reestruturação da BHT independente da fase do desenvolvimento em que o animal foi exposto, contudo essa reestruturação é mediada por diferentes fatores dependendo da fase de exposição. Assim, podemos sugerir que essa alteração na dinâmica da reestruturação da BHT causada por citocinas, FGF-2 e Cx 43 juntamente com a queda na testosterona possivelmente contribuiu com o prejuízo espermático observado anteriormente.

5. Agradecimentos

Nós queremos agradecer ao Luiz Roberto Falleiros Júnior pela assistência técnica, assim como aos demais pesquisadores do Laboratório de Microscopia e Microanálise. Também gostaríamos de agradecer ao Prof Dr Fernando Ferrari pela ajuda com os testes estatísticos e à Profa Dra Paula Rahal e a Profa Dra Sônia Oliani pela disponibilidade de seus laboratórios para algumas técnicas desenvolvidas no projeto, assim como à aluna Jacqueline F. Shimizu e ao aluno Lucas Azevedo pelo auxílio nessas técnicas. Este trabalho foi financiado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (Proc. # 2011/01612-4; parceria com M.E.P.-F. - Proc. # 2009/16071-9 e VR - Proc. # 2010/14815-8); CNPq (Parceria com R.M.G. - Proc. # 306258/2011) e PROPe/UNESP – Pro-Reitoria de pesquisa da Universidade Estadual de São Paulo (Parceria com M.E.P.-F. - Proc. # 2013/70).

6. Referências Bibliográficas

Abelson P, Kennedy D. 2004. The obesity epidemic. *Science* 304(5676):1413.

Baker SJ, Reddy EP. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261-3270.

Beutler B. 1995. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med* 43:227-235.

Boockfor FR, Shwarz LK. 1991. Effects of interleukin-6, interleukin-2, and tumor necrosis factor α on transferrin release from Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 129: 256-62.

Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A. 1999. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 140:4939-4947.

Carette D, Weider K, Gilleron J, Giese S, Dompierre J, Bergmann M, Brehm R, Denizot JP, Segretain D, Pointis G. 2010. Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev Biol.* 346(1):54-67.

Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. 2011. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis* 1:2, 90-94; Landes Bioscience.

Chen A, Feresu SA, Fernandez C, Rogan WJ. 2009. Maternal obesity and the risk of infant death in the United States. *Epidemiology* 20:82–83.

Chernoff N, Gage MI, Stoker TE, Cooper RL, Gilbert ME, Rogers EH. 2009. Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. *ReprodToxicol* 28(4):489-94.

De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, Enders GC. 1993. Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 133, 389_396.

de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod*; 13 (Suppl 1): 1-8.

Dinarello CA. 1996. Biologic basis for Interleukin-1 in disease. *Blood* 87: 2095-147.

Fiers W. 1991. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285:199-212.

Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. 2004. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 18:413–21.

Fiorini C, Decrouy X, Defamie N, Segretain D, Pointis G. 2006. Opposite regulation of connexin33 and connexin43 by LPS and IL-1 α in spermatogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 290:C733–C40.

Gérard N, Syed V, Bardin W, Genetet N, Jegou B. 1991. Sertoli cells are the site of interleukin-1 α synthesis in rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 82:R13–R6.

Gilleron J, Carette D, Carpentier F, Segretain D, Pointis G. 2009. Three-dimensional analysis of connexin 43 gap junction in the ex vivo rat seminiferous tubules: short-term effects of hormonal effectors. *Microsc Res Tech*. 72(11):845-55.

Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats AC. 2006. Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J*. 20(3):476-8.

Goodenough DA. 1978. Gap junction dynamics and intercellular communication. *Pharmacol Rev* 30:383–392.

Gow RM, O'Bryan MK, Canny BJ, Ooi GT, Hedger MP. 2001. Differential effects of examethasone treatment on lipopolysaccharide-induced testicular inflammation and reproductive hormone inhibition in adult rats. *J Endocrinol*. 168(1):193-201.

Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 9(4):411-6.

Griswold MD. 2005. Perspective on the function of Sertoli cells. In: Griswold MD, Ed. *Sertoli Cell Biology*. San Diego: Elsevier Science 15-8.

Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. 2009. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc Res Tech*. 72(8):620-8. doi: 10.1002/jemt.20704.

Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT. 2006. Obesity and male reproductive potential. *J Androl* 27(5):619-26.

Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. 2008. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *FertilSteril* 90:897-904.

Han IS, Sylvester SR, Kim KH, Schelling ME, Venkateswaran S, Blanckaert VD, McGuinness MP, Griswold MD. 1993. Basic fibroblast growth factor is a testicular germ cell product which may regulate Sertoli cell function. *Mol Endocrinol*. 7(7):889-97.

Haslam D, James P. 2005. Obesity. *Lancet* 366(9492):1197-209.

Haugen TB, Landmark BF, Josefsen GM, Hansson V, Hogset A. 1994. The mature form of interleukin-1 α is constitutively expressed in immature male germ cells from rat. *Mol Cell Endocrinol*; 105:R19–R23.

Hedger MP and Meinhardt A. 2003. Cytokines and the immune-testicular axis. *J Reprod Immunol* 58:1–26.

Henry SL, Bensley JG, Wood-Bradley RJ, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Armitage JA. 2012. White adipocytes: more than just fat depots. *Int J Biochem Cell Biol*; 44(3):435-40.

Hoeben E, Damme JV, Put W, Swinnen JV, Verhoeven G. 1996. Cytokines derived from activated human mononuclear cells markedly stimulate transferrin secretion by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 137: 514-21.

Hutchison GR, Scott HM, Walker M, McKinnell C, Ferrara D, Mahood IK, Sharpe RM. 2008. Sertoli cell development and function in an animal model of testicular dysgenesis syndrome. *Biol Reprod*. 78(2):352-60.

Jeyakumar SM, Lopamudra P, Padmini S, Balakrishna N, Giridharan NV, Vajreswari A. 2009. Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rats strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob. *NutrMetab* 6:27.

Jonsson CK, Zetterstrom RH, Holst M, Parvinen M, Soder O. 1999. Constitutive expression of interleukin-1 α messenger ribonucleic acid in rat Sertoli cells is dependent upon interaction with germ cells. *Endocrinology* 140:3755–61.

Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. 2008. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 29:251-259.

Kim S, Moustaid-Moussa N. 2000. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr.* 130(12):3110S-3115S.

Kojima T, Murata M, Go M, Spray DC, Sawada N. 2007. Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J. Membr. Biol.* 217, 13–19.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. 2004. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(47):16489-94.

Leblond CP and Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 55:548-573.

Li MWM, Xia W, Mruk DD, Wang CQF, Yan HHN, Siu MKY, et al. 2006. Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier integrity and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J Endocrinol*;190:313–29.

Li MWM, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2009a. Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20(4):329-38.

Li MWM, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2009b. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106:10213–8.

Li MWM, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2009c. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol.*

Lie PPY, Cheng CY, Mruk DD. 2011. Interleukin-1 α is a regulator of the blood-testis barrier. *FASEB J.* 25(4):1244-53.

Lie PPY, Cheng CY, Mruk DD. 2012. Cell the biology of interleukin-1: emerging concepts in the regulation of the actin cytoskeleton and cell junction dynamics. *Mol Life Sci.* 69(4):487-500.

Lui WY and Cheng CY. 2007. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis. A molecular and biochemical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:299–311.

MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. 2010. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 16(3):293-311.

Mayerhofer A, Russell LD, Grothe C, Rudolf M and Gratzl M. 1991. Presence and localization of a 30-kDa basic fibroblast growth factor-like protein in rodent testes. *Endocrinology* 129, 921–924.

McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. *Recent Prog Horm Res* 57:149-79.

Mcmillen IC and Robinson JS. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571–633.

Mealy K, Robinson B, Millette CF, Majzoub J, Wilmore DW. 1990. The testicular effects of tumor necrosis factor. *Ann. Surg.* 211, 470_475.

Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. 2005. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16696–16700.

Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, Rafieian SH. 2012. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia*. 44 Suppl 1:41-55.

Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 77:433-444.

Mruk DD, Cheng CY. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev* 25:747–806.

Pelletier RM. 1995. The distribution of connexin 43 is associated with the germ cell differentiation and with the modulation of the Sertoli cell junctional barrier in continual (guinea pig) and seasonal breeders' (mink) testes. *J. Androl.* 16, 400–409.

Pérez CV, Sobarzo CM, Jacobo PV, Pellizzari EH, Cigorrage SB, Denduchis B, Lustig L. 2012. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biol Reprod.* 87(5):122.

Pinto-Fochi ME, Ribeiro DL, Taboga SR, Góes. Detrimental effects of the obesogenic environment by consumption of high-fat diet during different stages of development on steroidogenic capacity of Leydig cells, *PLoS One*, submetido.

Plagemann A. 2005. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. *PhysiolBehav* 86:661–668.

Reame V, Pytlowanciv EZ, Ribeiro DL, Pissolato TF, Taboga SR, Góes RM, Pinto-Fochi ME. 2014. Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatogenic efficiency of wistar rats at adulthood: correlations with metabolic status. *Biol Reprod.* 91(6):151.

Ribeiro DL, Pinto ME, Maeda SY, Taboga SR, Góes RM. 2012. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. *Cell Tissue Res.* 349(2):577-88.

Risley M, Tan I, Roy C, Sáez J. 1992. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J. Cell Sci.* 103, 81–96.

Rodríguez-González GL, Vega CC, Boeck L, Vázquez M, Bautista CJ, Reyes-Castro LA, Saldaña O, Lovera D, Nathanielsz PW, Zambrano E. 2015. Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes (Lond).*

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64(4):355-65.

Russell L. 1977. Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am J Anat*; 148:301–12.

Sarkar O, Mathur PP, Cheng CY, Mruk DD. 2008. Interleukin 1 alpha (IL1A) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat. *Biol Reprod*; 78:445–54.

Sharpe RM. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD, Eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press 1363-434.

Sharpe RM. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 1697–1712.

- Skinner MK. 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrin Rev* 12: 45-77.
- Sordoillet C, Savona C, Chauvin MA, de Peretti E, Feige JJ, Morera AM, Benahmed M. 1992. Basic fibroblast growth factor enhances testosterone secretion in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Mol Cell Endocrinol*. 89(1-2):163-71.
- Sprando RL. 1977. Perfusion rat testis through the heart using heparin. In: Russel LD, Ettlin APS, Cleeg ED (eds.), *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. p 277-288.
- Stéphan JP, Syed V, Jegou B. 1997. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol. Cell Endocrinol*. 134: 109.
- Stylianou E, Saklatvala J. 2000. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1075-1079.
- Taylor BA, Phillips SJ. 1996. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 34(3):389-398.
- van der Poll T, Romijn JA, Endert E, Sauerwein HP. 1993. Effects of tumor necrosis factor on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in healthy men. *Metabolism* 42:303–307.
- Van Dissel-Emiliani FM, De Boer-Brouwer M, De Rooij DG. 1996. Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology*; 137(2):647-54.
- Verajankorva E, Martikainen M, Pollanen P. 2001. Cytokines in the BALB/c mouse testis in various conditions. *Asian J Androl* 3: 9-19.
- Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*; 134:2307–2316.

Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, et al. 2006. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology*; 147:5624–33.

Warren DW, Pasupuleti V, Lu Y, Plater BW, Horton R. 1990. Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells in vitro. *J Androl* 11: 353-60.

Wahab-Wahlgren A, Holst M, Ayele D, Sultana T, Parvinen M, Gustafsson K, Granholm T, Söder O. 2000. Constitutive production of interleukin-1 α mRNA and protein in the developing rat testis. *Int J Androl*. 23(6):360-5.

WHO, 2015. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Acesso em: 02 de fevereiro de 2015.

Xia W, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2006. Differential interactions between transforming growth factor- β 3/T β R1, TAB1, and CD2AP disrupt blood-testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion. *J Biol Chem* 281:16799–813.

Xia W, Wong EWP, Mruk DD, Cheng CY. 2009. TGF- β 3 and TNF- α perturb blood-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis. *Dev Biol* 327:48–61.

Yan HHN, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2008. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J* 22:1945–59.

Zhang Y, Wang S, Wang X, Liao S, Wu Y, Han C. 2012. Endogenously produced FGF2 is essential for the survival and proliferation of cultured mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*. 22(4):773-6.

Tabela 1. Parâmetros biométricos e hormonais dos grupos C, O1, O2, O3, O4 e O5. Os valores representam \pm o desvio padrão.

Grupos	C	O1	O2	O3	O4	O5
Parâmetros						
Peso corporal (g)	302 \pm 81 ^a	393 \pm 27 ^b	383 \pm 30 ^b	397 \pm 59 ^b	409 \pm 52 ^b	398 \pm 50 ^b
Circunferência abdominal (cm)	17 \pm 2 ^a	19 \pm 0.8 ^b	19 \pm 1.1 ^b	20 \pm 1.1 ^b	21 \pm 1.6 ^b	20 \pm 1.5 ^b
Índice de adiposidade (%)	1.7 \pm 0.8 ^a	2.5 \pm 0.6 ^{a,b}	2.8 \pm 0.6 ^{b,c}	2.9 \pm 0.6 ^{b,c}	3.1 \pm 0.5 ^{b,c}	3.5 \pm 1 ^c
Peso do epidídimo (g)	0.56 \pm 0.09 ^a	0.58 \pm 0.07 ^a	0.58 \pm 0.08 ^a	0.56 \pm 0.06 ^a	0.60 \pm 0.03 ^a	0.56 \pm 0.06 ^a
Peso do testículo (g)	1.5 \pm 0.3 ^a	1.7 \pm 0.1 ^a	1.6 \pm 0.2 ^a	1.6 \pm 0.1 ^a	1.6 \pm 0.1 ^a	1.6 \pm 0.1 ^a
IGS	0.92 \pm 0.06 ^a	0.85 \pm 0.05 ^a	0.81 \pm 0.07 ^a	0.80 \pm 0.08 ^b	0.80 \pm 0.08 ^b	0.81 \pm 0.08 ^b
Testosterona (ng/dl)	360 \pm 29.2 ^a	344 \pm 27.4 ^{a,b}	262 \pm 21.3 ^{b,c}	142 \pm 29 ^c	194 \pm 49.8 ^{b,c}	138 \pm 34.3 ^c
Leptina (ng/ml)	2 \pm 0.4 ^a	3 \pm 0.7 ^{a,b}	6 \pm 1 ^{b,c}	14 \pm 1 ^d	11 \pm 3.2 ^{b,c,d}	11 \pm 2 ^{c,d}
Estrógeno (pg/dl)	27 \pm 0.9 ^a	21 \pm 2.61 ^a	48 \pm 5.0 ^b	42 \pm 2.9 ^b	47 \pm 5.2 ^b	73 \pm 4.1 ^c

a, b, c e d = diferença significativa entre os grupos C, O1, O2, O3, O4 e O5

7. Legenda das Figuras

Figura 1. Esquema do delineamento experimental utilizado no estudo. Os grupos foram divididos de acordo com o tipo de dieta ingerida pelos animais durante o experimento e o período de exposição ao ambiente obesogênico. ↓ = término do experimento e morte dos animais.

Figura 2. Gráfico da produção diária de espermatozoides por órgão ($\times 10^6$ /testículo/dia) do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5) (A) e gráfico da produção diária de espermatozoides ($\times 10^6$ /g de testículo/dia) do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5) referente à eficiência espermática (B). Dados publicados em Reame et al, 2014.

Figura 3. Seções histológicas dos testículos de ratos Wistar do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5) (A-F). Observam-se células que foram destacadas prematuramente do epitélio germinativo, as quais formaram densos aglomerados no lúmen seminífero de ratos sujeitos ao ambiente obesogênico. O gráfico mostra a porcentagem de túbulos seminíferos com descolamento de células germinativas (CG) (G). Legenda: intersticial (in), túbulos seminíferos (st), descolamento (*). Aumento: 200x. Coloração: PAS.

Figura 4. Seções histológicas para avaliação do epitélio seminífero de ratos Wistar do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5). As setas indicam as células de Sertoli. Aumento: 1000x. Coloração: H&E.

Figura 5. Seções histológicas dos testículos de ratos Wistar do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5) submetidas à imunocitoquímica para detecção dos receptores de andrógeno (AR). As setas indicam a marcação das células de Sertoli (CS) que foram identificadas e quantificadas por esse método (A-F). Gráfico da frequência de células de Sertoli AR-positivas do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5) (G). Quantificação do conteúdo de AR por Western blotting (H). Aumento: 400x

Figura 6. Quantificação do conteúdo de ER- β nos testículos de ratos Wistar do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5) por Western Blotting.

Figura 7. Quantificação do conteúdo de Cx 43 nos testículos de ratos Wistar do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5) por Western Blotting (A). Imunocitoquímica para detecção da Cx 43 (B-D). As setas indicam a marcação das células de Sertoli. Aumento: 400x.

Figura 8. Gráficos dos resultados para as citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e para o FGF-2 no testículo de ratos Wistar do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5).

Figura 9. Gráficos dos resultados para as citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e para o FGF-2 em amostras séricas do sangue de ratos Wistar do grupo controle (C) e dos grupos expostos ao ambiente obesogênico (O1, O2, O3, O4 e O5).

Figura 1

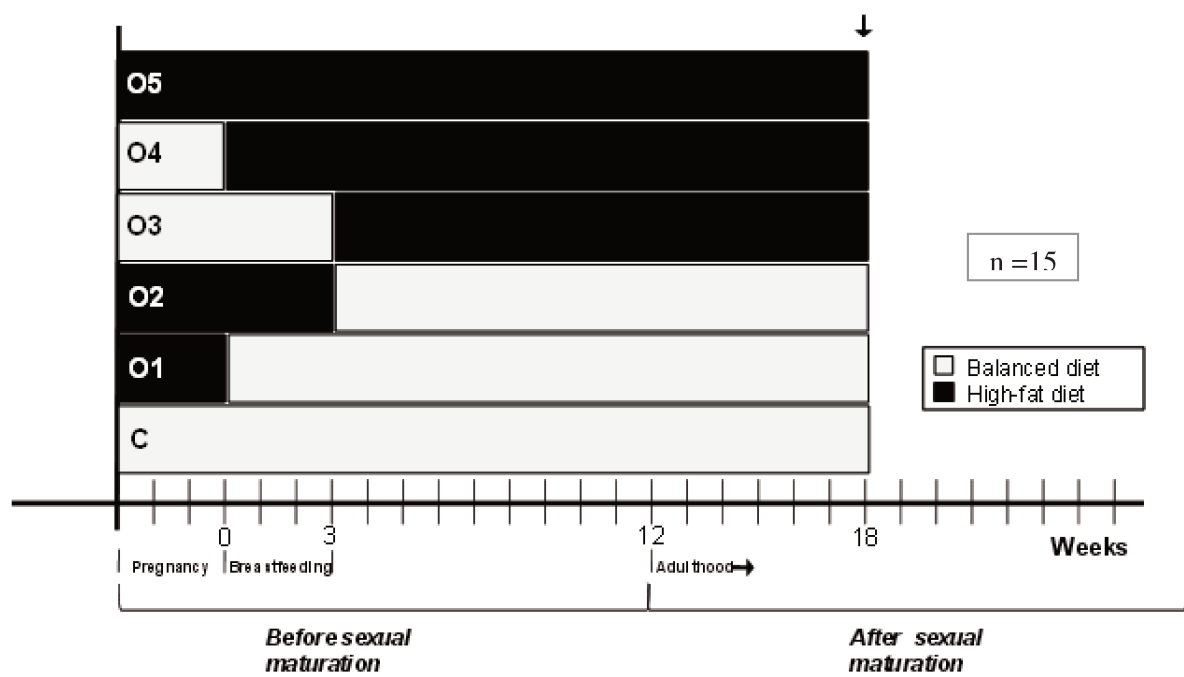


Figura 2

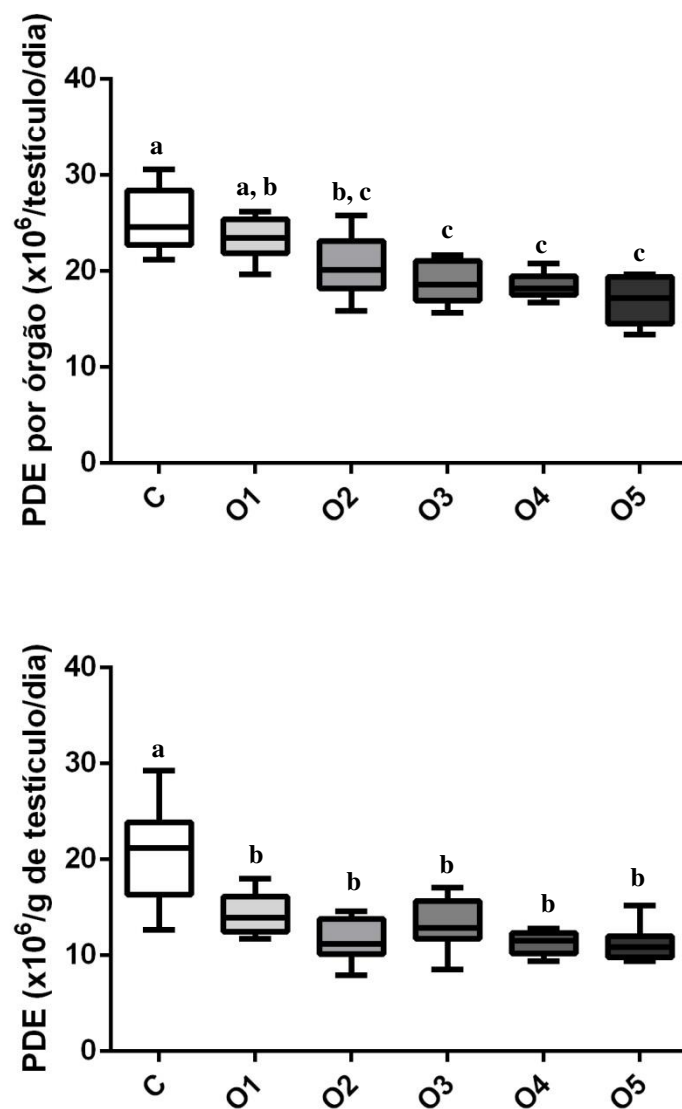


Figura 3

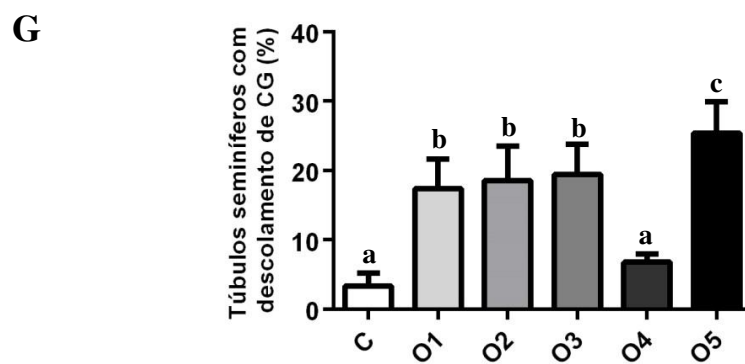
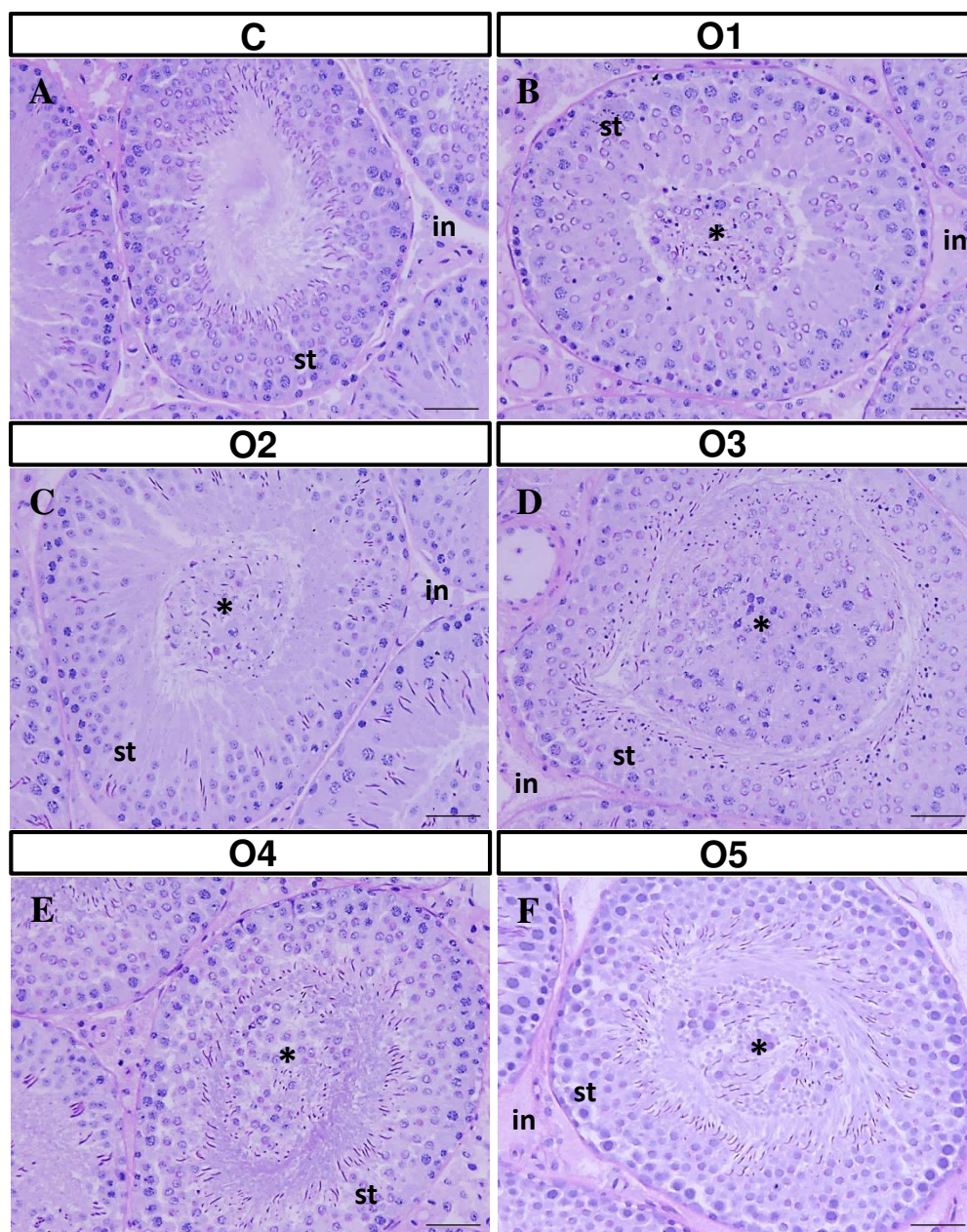


Figura 4

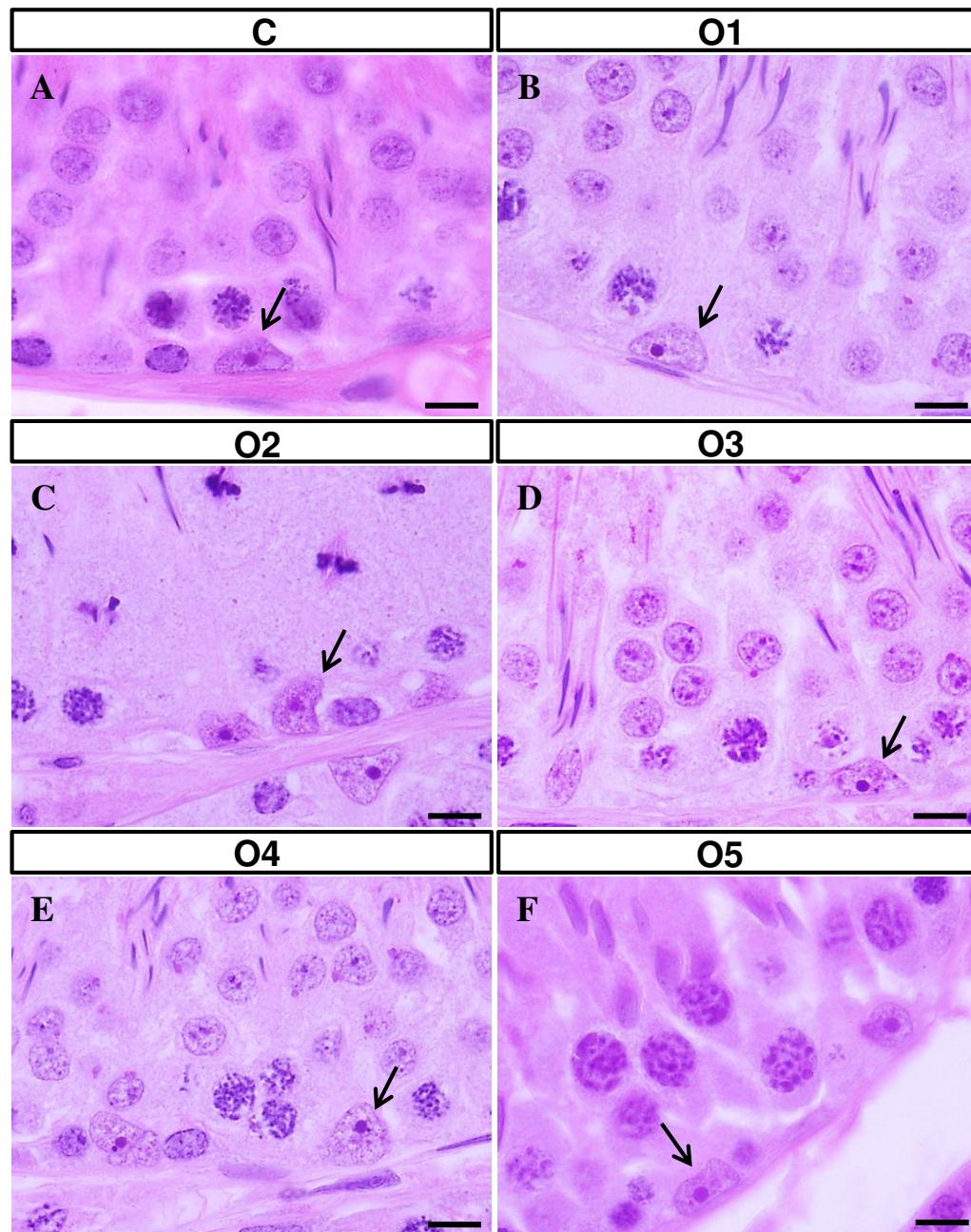


Figura 5

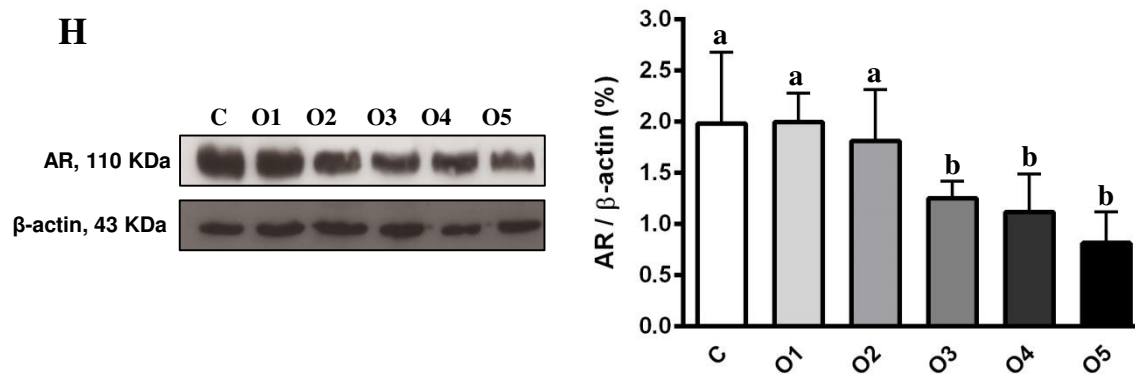
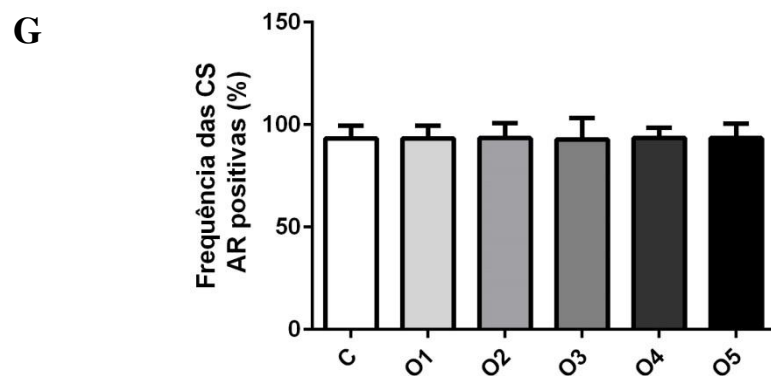
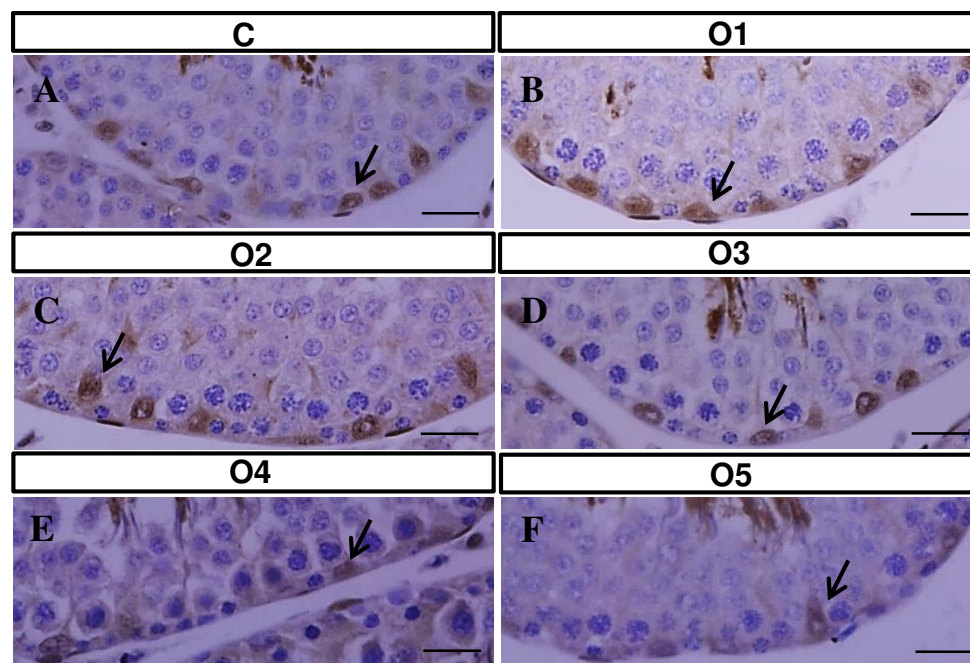


Figura 6

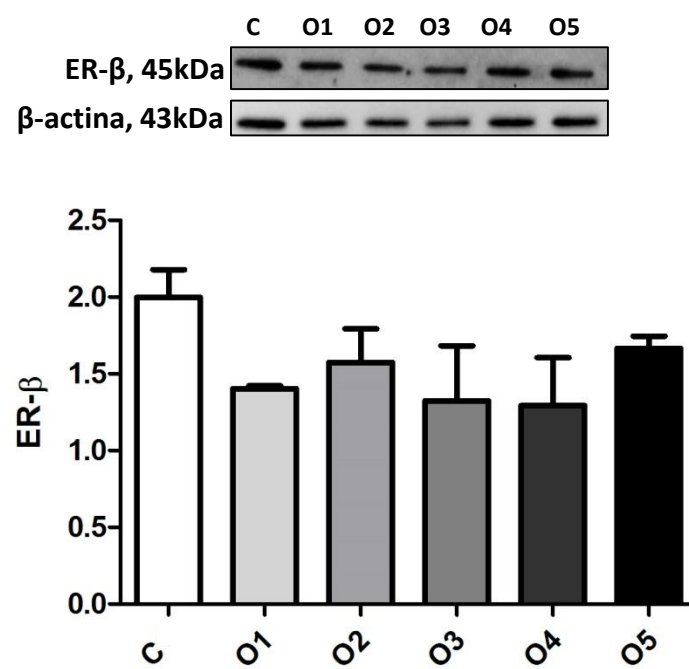


Figura 7

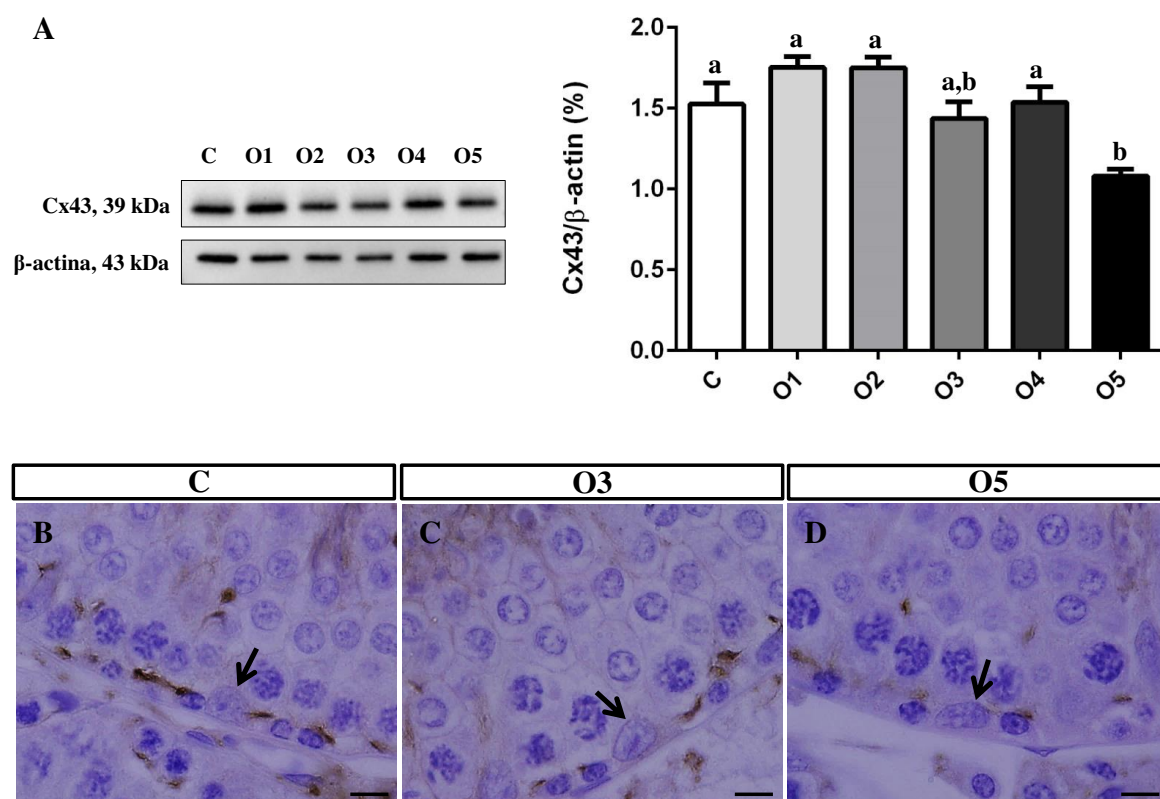


Figura 8

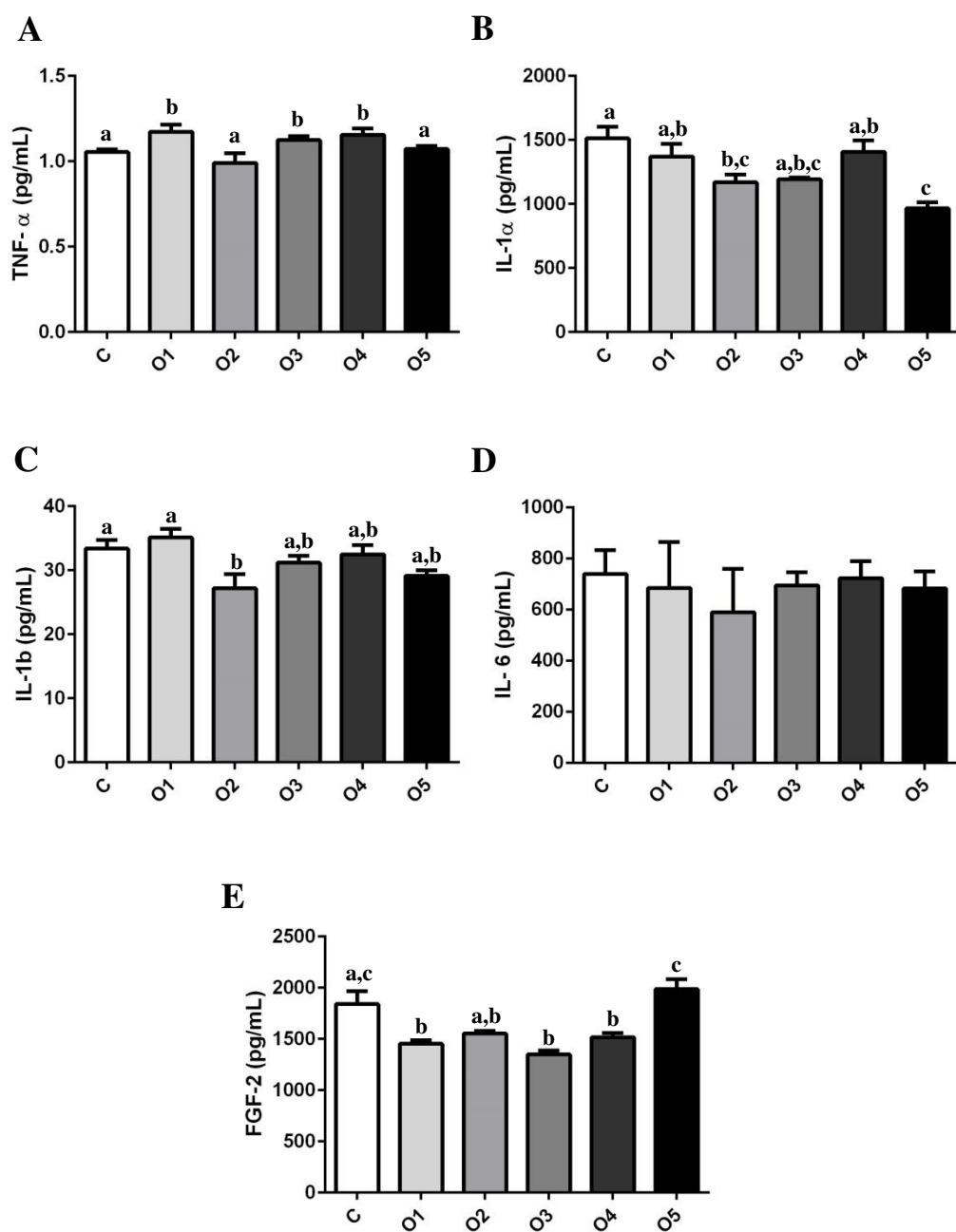
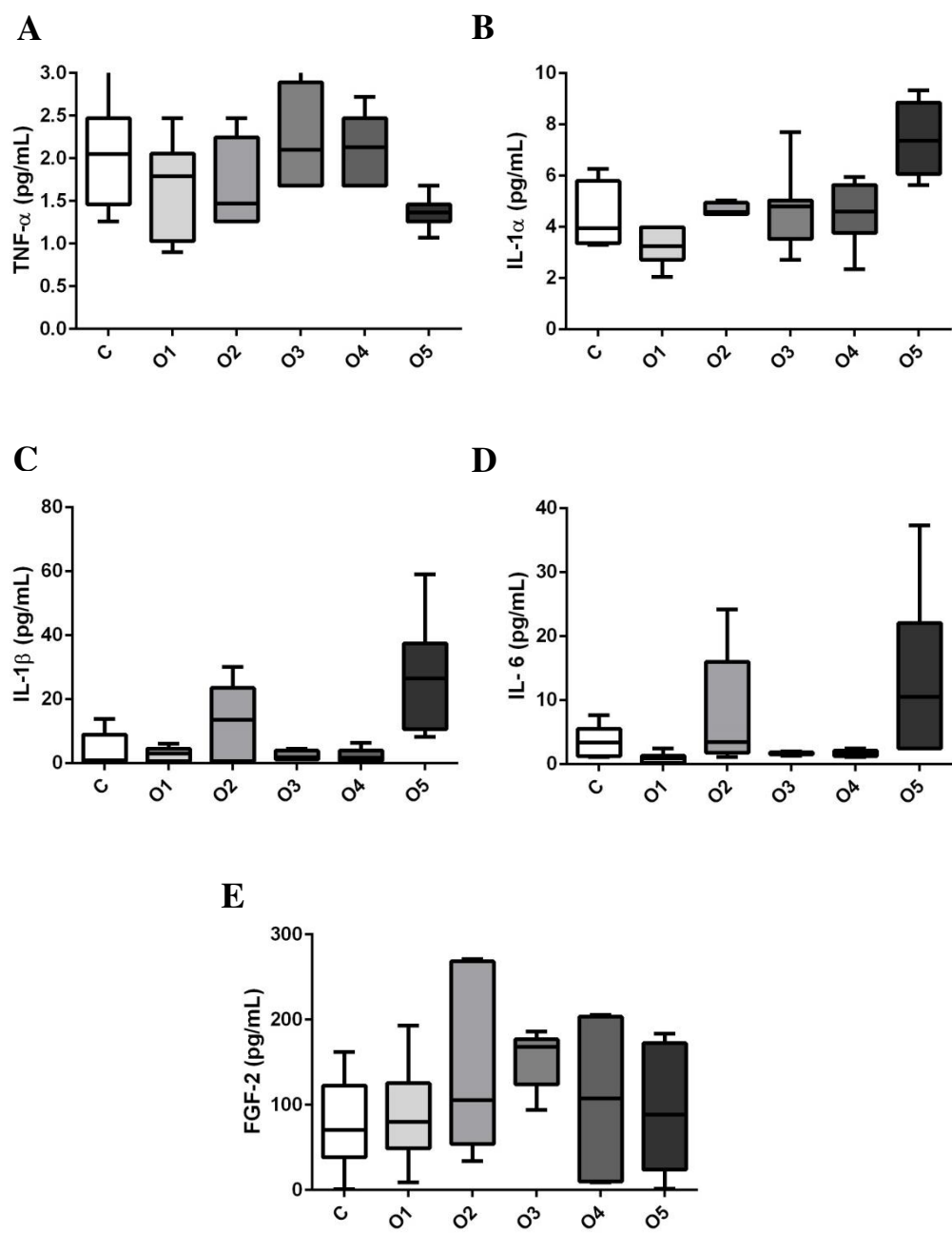


Figura 9



1. Todos os grupos expostos ao AO exibiram alteração em pelo menos um dos fatores parácrinos avaliados.
2. O aumento do TNF- α e a diminuição do FGF-2 influenciaram os grupos expostos ao AO somente durante a gestação (O1), ou pós-desmame (O3) ou amamentação + pós-desmame (O4).
3. A diminuição da IL-1 α teve ação negativa sobre os grupos expostos ao AO durante gestação + amamentação.
4. O aumento do TNF- α e a diminuição do FGF-2 podem justificar a queda de testosterona nos grupos O3 e O4.
5. Houve uma diminuição da IL-1 α no grupo O2 o que pode ter levado às alterações na dinâmica da BHT e ocasionado o descolamento de células do túbulo seminífero e a queda na PDE e na eficiência espermática verificada para esse grupo.
6. O grupo O5 apresentou diminuição da IL-1 α e diminuição da Cx 43. A queda da IL-1 α nesse grupo, assim como em O2 pode ter levado às alterações na dinâmica da BHT e ocasionado o descolamento de células do túbulo seminífero e a queda na PDE e na eficiência espermática. Apesar do grupo O5 ter sido o mais exposto ao AO, ele não apresentou alterações no TNF- α e no FGF-2 em relação ao grupo controle, o que pode significar que para a exposição prolongada ao AO outros fatores, como a queda na testosterona, possam ter sido mais afetados do que os parácrinos aqui analisados, contudo o TGF- β 3 não foi analisado neste trabalho e talvez seja a quantidade dessa citocina que tenha sido alterada para esse grupo, no entanto seria necessário outras análises para averiguar essa possibilidade.
7. Podemos concluir que o AO promove uma alteração na dinâmica da reestruturação da BHT independente da fase do desenvolvimento em que o animal foi exposto, contudo essa reestruturação é mediada por diferentes fatores dependendo da fase de exposição.
8. Assim, podemos sugerir que essa alteração na dinâmica da reestruturação da BHT causada por citocinas e FGF-2 juntamente com a queda na testosterona possivelmente contribuiu com o prejuízo espermático observado.

Armitage JA, Taylor PD, Poston L. 2005. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy-rich diet during development. *J Physiol* 565:3–8.

Boockfor FR, Wang D, Lin T, Nagpal ML, Spangelo BL. 1994. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. *Endocrinology* 134:2150–2155.

Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. 2004. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 27; 215(1-2):135-41.

Bravo, J., Heath, J.K., 2000. Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J.* 19, 2399/2411.

Cancilla B, Davies A, Ford-Perriss M, Risbridger GP. 2000. Discrete cell- and stage-specific localization of fibroblast growth factors and receptor expression during testis development. *J. Endocrinol.* 164, 149–159.

Cano P, Jiménez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP, Esquifino AI. 2008. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 33(2):118-25.

Carreau S, Wolczynski S, Galeraud-Denis I. 2010. Aromatase, estrogens and human male reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1546):1571-9.

Carreau S, Bouraima-Lelong H and, Delalande C. 2011. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis* 1:2, 90-94; Landes Bioscience.

Catalano PM and Ehrenberg HM. 2006. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *Br J Obstet Gynaecol* 113:1126-1133.

Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. 2009. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care* 32(6):1076-80.

Chen A, Feresu SA, Fernandez C, Rogan WJ. 2009. Maternal obesity and the risk of infant death in the United States. *Epidemiology* 20:82–83.

Cheng CY, Wong EW, Lie PP, Li MW, Mruk DD, Yan HH, Mok KW, Mannu J, Mathur PP, Lui WY, Lee WM, Bonanomi M, Silvestrini B. 2011. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. *Spermatogenesis* 1(2):105-115.

Chung WS, Sohn JH, Park YY. 1999. Is obesity an underlying factor in erectile dysfunction? *Eur Urol* 36:68-70.

Cudicini C, Lejeune H, Gomez E, Bosmans E, Ballet F, Saez J, Jégou B. 1997. Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1426_/1433.

De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, Enders GC, 1993. Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 133, 389_/396.

de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod*; 13 (Suppl 1): 1-8.

Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Hauck EW, Weidner W. 2003. Urogenital infection and sperm motility. *Andrologia* 35(5):283-7.

Dym M and Fawcett DW. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *BiolReprod* 3:308–326.

Elheija MA, Dyomin V, Ganaiem M, Lunenfeld E, Vardy NS, Huleihel M. 2011. Distinct expression of interleukin-1 α , interleukin-1 β , and interleukin-1 receptor antagonist in testicular tissues and cells from human biopsies with normal and abnormal histology. *J Interferon Cytokine Res.*; 31(4):401-8.

Esposito K, Giugliano F, Di Palo C, Giugliano G, Marfella R, D'Andrea F, D'Armiento M, Giugliano D. 2004. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *JAMA* 291:2978-2984.

Fernandez CDB, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WDG. 2011. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9:32.

Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats AC. 2006. Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J.* 20(3):476-8.

Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 9(4):411-6.

Grootegoed JA, Siep M, and Baarends WM. 2000. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14,331–343.

Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. 2009. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc Res Tech.* 72(8):620-8.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL. 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345:1388-1393.

Hales DB, Diemer T, Hales KH. 1999. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 10(3):201-17.

Hales DB. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 57:3-18.

Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. 2008. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *FertilSteril* 90:897-904.

Haugen TB, Landmark BF, Josefsen GM, Hansson V, Hogset A. 1994. The mature form of interleukin-1 α is constitutively expressed in immature male germ cells from rat. *Mol Cell Endocrinol*; 105:R19–R23.

Heindel JJ and Saal FS. 2009. Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol Cell Endocrinol* 304(1-2):90-6.

Hutchison GR, Scott HM, Walker M, McKinnell C, Ferrara D, Mahood IK, Sharpe RM. 2008. Sertoli cell development and function in an animal model of testicular dysgenesis syndrome. *Biol Reprod*. 78(2):352-60.

International Committee on Veterinary Histological Nomenclature, 1994: *Nomina Histologica*, an edn. International Committee on Veterinary Histological Nomenclature, New York, pp. 19.

Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. 2004. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 82:863–70.

Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, Kumar TR & O'Shaughnessy PJ. 2004. Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* 145, 318–329.

Josso N, di Clemente N, Gouedard L. 2001. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179 (1–2), 25–32.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: The signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149:1–38.

Karl J and Capel B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203(2), 323–333.

Karzai AW and Wright WW. 1992. Regulation of the synthesis and secretion of transferrin and cyclic protein-2/cathepsin L by mature rat Sertoli cells in culture. *Biol Reprod.* 47(5):823-31.

Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. 2008. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 29:251-259.

Koike S and Noumura T. 1994. Cell- and stage-specific expression of basic FGF in the developing rat gonads. *Growth Regul.* 4, 77–81.

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. 2006. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 27:450-452.

Lahr G, Mayerhofer A, Seidl K, Bucher S, Grothe C, Knochel W and Gratzl M. 1992. Basic fibroblast growth factor (bFGF) in rodent testis. Presence of bFGF mRNA and of a 30 kDa bFGF protein in pachytene spermatocytes. FEBS Lett. 302, 43–46.

Laslett AL, McFarlane JR, Hearn MT and Risbridger GP. 1995. Requirement for heparan sulfate proteoglycans to mediate basic fibroblast growth factor (FGF-2)-induced stimulation of Leydig cell steroidogenesis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 54, 245–250.

Li MWM, Xia W, Mruk DD, Wang CQF, Yan HHN, Siu MKY, et al. 2006. Tumor necrosis factor α reversibly disrupts the blood-testis barrier integrity and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. J Endocrinol;190:313–29.

Li MWM, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2009a. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A;106:10213–8.

Li MWM, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2009b. Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation. Cytokine Growth Factor Rev. 20(4):329-38.

Lin T, Wang D, Nagpal ML. 1993. Human chorionic gonadotropin induces interleukin-1 gene expression in rat Leydig cells in vivo. Mol. Cell. Endocrinol. 95, 139_/145.

Lovell-Badge R. 1992. The role of Sry in mammalian sex determination. Ciba Found Symp. 165, 162–179, discussion 179–182.

Lysiak JJ. 2004. The role of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. Reprod Biol Endocrinol 2:1–10.

MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. 2010. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 16(3):293-311.

Magnusdottir E V, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M and Olafsdottir K. 2005. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human Reproduction* Vol.20, No.1 pp. 208–215.

Mah PM, Wittert GA. 2010. Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol* 316(2):180-6.

Martini AC, Molina RI, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M. 2012. Obesity and male fertility. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 69(2):102-10.

Mayerhofer A, Russell LD, Grothe C, Rudolf M and Gratzl M. 1991. Presence and localization of a 30-kDa basic fibroblast growth factor-like protein in rodent testes. *Endocrinology* 129, 921–924.

McLachlan RI. 2000. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14, 345–362.

Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. 2005. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16696–16700.

Moore C, Hutson JC. 1994. Physiological relevance of tumor necrosis factor in mediating macrophage-Leydig cell interactions. *Endocrinology* 134:63-69.

Nehar D, Mauduit C, Boussouar F, Benahmed M. 1998. Interleukin-1 α stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 59: 1425.

Nguyen R, Wilcox A, Skjaerven R, Baird DD. 2007. Men's body mass index and infertility. *Hum Reprod* 17:2488–93.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev.* 22(3):289-318.

Okuda, Y., Sun, X.R., Morris, P.L., 1994. Interleukin-6 (IL-6) mRNAs expressed in Leydig and Sertoli cells are regulated by cytokines, gonadotropins and neuropeptides. *Endocrine J.* 2, 617–624.

Okuda, Y., Bardin, C.W., Hodgskin, L.R., Morris, P.L., 1995. Interleukins-1a and -1b regulate interleukin-6 expression in Leydig and Sertoli cells. *Rec. Prog. Horm. Res.* 50, 367–372.

Oritani K, Tomiyama Y, Kincade PW, Aoyama K, Yokota T, Matsumura I, Kanakura Y, Nakajima K, Hirano T, Matsuzawa Y. 1999. Both Stat3-activation and Stat3-independent bcl-2 downregulation are important for interleukin-6-induced apoptosis of 1A9-M cells. *Blood* 93:1346–1354.

Orth JM, Gunsalus GL and Lamperti AA. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122, 787–794. (doi:10.1210/endo-122-3-787).

Pasquali R. 2006. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas* 54:363-371.

Pasquali R, Patton L, Gambineri A. 2007. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:482-487.

Pentikäinen V, Erkkilä K, Suomalainen L, Ojala M, Pentikäinen MO, Parvinen M, Dunkel L. 2001. TNF α down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4480–4488.

Petersen C and Söder O. 2006. The Sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res.* 66(4):153-61.

Pointis G, Gilleron J, Carette D and Segretain D. 2011. Testicular connexin 43, a precocious molecular target for the effect of environmental toxicants on male fertility. *Spermatogenesis* 1:4, 303-317.

Ramlau-Hansen CH, Nohr EA, Bonde JP, Storgaard L & Olsen J. 2007. Is maternal obesity related to semen quality in the male offspring? A pilot study. *Hum. Reprod.* 22, 2758–2762.

Reame V, Pytlowanciv EZ, Ribeiro DL, Pissolato TF, Taboga SR, Góes RM, Pinto-Fochi ME. 2014. Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatogenic efficiency of Wistar rats at adulthood: correlations with metabolic status. *Biol Reprod.* 91(6):151.

Riccioli A, Starace D, D'Alessio A, Starace G, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, Ziparo E. 2000. TNF- α and IFN- γ regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium. *J Immunol* 165:743–749.

Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. 1990. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat.* 188(1):21-30.

Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. 2006. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* 17:520–3.

Sarkar O, Mathur PP, Cheng CY, Mruk DD. 2008. Interleukin 1 alpha (IL1A) is a novel regulator of the blood-testis barrier in the rat. *Biol Reprod*; 78:445–54.

Scott HM, Hutchison GR, Mahood IK, Hallmark N, Welsh M, De Gendt K, Verhoeven G, O'Shaughnessy PJ & Sharpe RM. 2007. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology* 148, 2027–2036.

Scott HM, Hutchison GR, Jobling MS, McKinnell C, Drake AJ, Sharpe RM. 2008. Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinology*. 149(10):5280-7.

Sharpe RM. 1984. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod*. 30(1):29-49.

Sharpe, RM, McKinnell, C, Kivlin, C & Fisher, JS. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125, 769–784.

Sharpe RM. 2005. Sertoli cell endocrinology and signal transduction: androgen regulation. In *Sertoli cell biology* (eds M. K. Skinner & M. D. Griswold), pp. 199–216. London, UK: Elsevier/Academic Press.

Sharpe RM. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 1697–1712

Setchell BP and Waites GM. 1975. The blood-testis barrier, in *The Handbook of Physiology* (Hamilton DW and Greep RO eds) pp 143–172, Williams and Wilkens, Baltimore.

Siu MK, Lee WM, Cheng CY. 2003. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- α , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology* 144:371–387.

Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, et al. 2002. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 17:503–15.

Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. 2008. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Apr; 109(3-5):323-30. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.03.004.

Solari AJ and Fritz IB. 1978. The ultrastructure of immature Sertoli cells. Maturation-like changes during culture and the maintenance of mitotic potentiality. *Biol. Reprod.* 18(3), 329–345.

Sordoillet C, Savona C, Chauvin MA, de Peretti E, Feige JJ, Morera AM, Benahmed M. 1992. Basic fibroblast growth factor enhances testosterone secretion in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Mol Cell Endocrinol.* 89(1-2):163-71.

Spiteri-Grech J and Nieschlag E. 1993. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis - a review. *Journal of Reproduction and Fertility* 98, 1-14.

Stéphan JP, Syed V, Jegou B. 1997. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* 134: 109.

Syed V, Soder O, Arver S, Lindh M, Khan S, Ritzen EM. 1988. Ontogeny and cellular origin of an interleukin-1like factor in the reproductive tract of the male rat. *Int J Androl*; 11: 437-47.

Syed V, Stéphan JP, Gérard N, Legrand A, Parvinen M, Bardin CW, Jégou B, 1995. Residual bodies activate Sertoli cell interleukin-1a (IL-1a) release, which triggers IL-6 production by an autocrine mechanism, through the lipoxygenase pathway. *Endocrinology* 136, 3070_/3078.

Symonds ME. 2007. Integration of physiological and molecular mechanisms of the developmental origins of adult disease: new concepts and insights. *ProcNutrSoc* 66: 442-450.

Symonds ME, Sebert SP, Budge H. 2009. The impact of diet during early life and its contribution to later disease: critical checkpoints in development and their long-term consequences for metabolic health. *ProcNutrSoc* 68(4):416-21.

Van Dissel-Emiliani FM, De Boer-Brouwer M, De Rooij DG. 1996. Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology*; 137(2):647-54.

Waites GM, Speight AC, Jenkins N. 1985. The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. *J. Reprod. Fertil.* 75(1), 317–326.

Wang RS, Yeh S, Chen LM, Lin HY, Zhang C, Ni J, et al. 2006. Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology*; 147:5624–33.

White CL, Purpera MN, Morrison CD. 2009. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5):R1464-72.

WHO, 2015. Organização Mundial de Saúde. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em 05 de março de 2015.

Xia W, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2006. Differential interactions between transforming growth factor- β 3/T β R1, TAB1, and CD2AP disrupt blood-testis barrier and Sertoli-germ cell adhesion. *J Biol Chem* 281:16799–813.

Xiong Y, Hales DB. 1993. Expression, regulation, and production of tumor necrosis factor- α in mouse testicular interstitial macrophages in vitro. *Endocrinology* 133, 2568_/ 2573.

Xiong Y, Hales DB. 1994. Immune-endocrine interactions in the mouse testis: cytokine-mediated inhibition of Leydig cell steroidogenesis. *Endocrine J.* 2, 223_/228.

Yan HHN, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. 2008. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J* 22:1945–59.

Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S. 2005. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab.* 1 (6), 371–378.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada
**"Repercussões da obesidade materna e/ou pós-natal sobre as células de Sertoli e a
expressão de fatores parácrinos intra-testiculares":**

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 022/09, Instituição: Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce) - Câmpus de São José do Rio Preto.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Vanessa Reame
Aluna: Vanessa Reame

Rajane Maira Góes
Orientadora: Dra Rajane Maira Góes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(✓) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto/disciplina de pesquisa intitulado **"EFEITOS DA OBESIDADE MATERNA E SUPERNUTRIÇÃO PÓS-NATAL SOBRE O APARELHO GENITAL MASCULINO DE RATOS: POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES TESTICULARES E PROSTÁTICAS"** (protocolo nº. 22/2009 - CEUA), sob responsabilidade da Professora Doutora Rejane Maira Góes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 10 de dezembro de 2009.

CERTIFICATE

Certify that the project / discipline research entitled **"EFFECTS OF MATERNAL OBESITY AND POST- CHRISTMAS OVERNUTRITION GENITAL APPLIANCE ON MALE RATS : POSSIBLE MECHANISMS INVOLVED IN TESTICULAR AND PROSTATE CHANGES"** (protocol no. 22/2009 - CEUA), under the responsibility of Professora Doutora Rejane Maira Goes, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of this Institute, at the meeting of December 10, 2009.

São José do Rio Preto, 10 de abril de 2015.



Prof. Dr. Luiz Henrique Morinda
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Comissão de Ética no Uso de Animais