



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

ANA CAROLINA NEGRIN

**" INTERFERÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AO DI-N-BUTIL
FTALATO E DO CONSUMO EXCESSIVO DE LIPÍDIOS SATURADOS
PARA OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DO GERBILO "**

**" INTERFERENCE OF *IN UTERO* EXPOSURE TO DI-N-BUTYL
PHTHALATE AND AN EXCESSIVE CONSUMPTION OF SATURATED-
FAT DIET IN THE REPRODUCTIVE PARAMETERS OF THE GERBIL "**

**CAMPINAS
2018**

ANA CAROLINA NEGRIN

**" INTERFERÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AO DI-N-BUTIL
FTALATO E DO CONSUMO EXCESSIVO DE LIPÍDIOS SATURADOS
PARA OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DO GERBILO"**

**" INTERFERENCE OF *IN UTERO* EXPOSURE TO DI-N-BUTYL
PHTHALATE AND AN EXCESSIVE CONSUMPTION OF
SATURATED-FAT DIET IN THE REPRODUCTIVE PARAMETERS OF
THE GERBIL"**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do Título de Doutora em Biologia
Celular e Estrutural, na área de Biologia
Celular.*

*Thesis presented to the Institute of Biology
of the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the
degree of PhD in Cellular and Structural
Biology, in the area of Cellular Biology.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA
CAROLINA NEGRIN E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. REJANE MAIRA GÓES.

ORIENTADOR (A): PROFA. DRA. REJANE MAIRA GÓES

COORIENTADOR (A): PROFA. DRA. MARIA ETELVINA PINTO FOCHI

**CAMPINAS
2018**

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

N312i Negrin, Ana Carolina, 1988-
Interferências da exposição *in utero* ao di-n-butil ftalato e do consumo excessivo de lipídios saturados para os parâmetros reprodutivos do gerbilo / Ana Carolina Negrin. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

1. Dibutilftalato. 2. Ácidos graxos saturados. 3. Óleo de milho. 4. Parâmetros espermáticos. 5. Gerbilo da Mongólia. I. Góes, Rejane Maira. II. Pinto-Fochi, Maria Etelvina. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Interference of *in utero* exposure to di-n-butyl phthalate and an excessive consumption of saturated-fat diet in the reproductive parameters of the gerbil

Palavras-chave em inglês:

Dibutyl phthalate

Saturated fatty acids

Corn oil

Sperm parameters

Mongolian gerbil

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Rejane Maira Góes [Orientador]

Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

Juliana Elaine Perobelli

Estela Sasso Cerri

João Ernesto de Carvalho

Data de defesa: 28-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 28 de março de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Rejane Maira Góes (Orientadora)

Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

Juliana Elaine Perobelli

Estela Sasso Cerri

João Ernesto de Carvalho

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

Agradecimentos

Agradeço à minha querida orientadora, Prof. Dra. Rejane Maira Góes, pessoa de potencial e perspicácia incríveis. Obrigada pela confiança, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados ao longo de todos esses anos e por acreditar nessa parceria. Obrigada por ter contribuído com o meu amadurecimento profissional e pessoal.

À querida Profa. Dra. Maria Etelvina Pinto Fochi, coorientadora inteligente e amiga. Obrigada, Mãe, pela maravilhosa amizade por nós construída e por todos os grandiosos ensinamentos. Como eu já disse, meu carinho e admiração por você são enormes.

Ao querido Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, meu primeiro orientador, por todos os ensinamentos a mim transmitidos, sejam eles profissionais ou pessoais, e pela amizade.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Prof. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato e Prof. Dr. João Ernesto Carvalho, pelo cuidado e atenção na análise prévia da tese e pelas valiosas sugestões.

Aos membros da comissão examinadora, Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, Profa. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes, Profa. Dra. Juliana Elaine Perobelli, Profa. Dra. Estela Sasso Cerri, e aos membros suplentes Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Taize Machado Augusto e Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo, pela disponibilidade, pela atenção dispensada e pelas contribuições para o aprimoramento e a conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp e todos os docentes por me receberem e contribuírem com minha formação. Meu agradecimento especial à Lílíam Alvez Senne Panagio, secretária do Programa, por todo profissionalismo e eficiência e pelo carinho, mesmo a longas distâncias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro inicial.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro a mim concedido (Processo nº 20141/04146-2).

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE-UNESP, por ser a minha “morada” nos últimos 11 anos e por ter disponibilizado o espaço físico para a realização deste trabalho.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM), Luiz Roberto Falleiros Junior, pela amizade, pela ajuda prestada e pela alegria que você carrega e transborda por onde passa. É um presente poder conviver com você, Lois!

Ao Danilo, vulgo Kexu, pessoa de presteza e conhecimento extraordinários. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo e por ter se dedicado tanto a me auxiliar com as análises bioquímicas. Obrigada, também, a todos do LQBOA que de alguma forma de ajudaram com essas análises, especialmente à Déia e à Ju.

Aos queridos amigos do LMM, presentes ou que já estão desbravando outros caminhos: Profa. Dra. Patricia Vilamaior, Silvana Pegorin, Maê, Ricardo, Ana Paula, Manoel, Bianca, Mateus, Mari Zanatelli, Cíntia, Marina, Eloísa, Carol Christante, Mari Marcielo, Vanessa, Júlia, Ellen, Luiz Henrique, Sarah, Manuela, Camila, Nayara, Fernanda, Carol Bedolo, Cássia, Guilherme, Carol Frandsen, Douglas, Tatiane, Gustavo, Joyce, Ayvin, Juliana, Diego, Bruno Zani, Bruno Sanches e Maysa. Obrigada a cada um de vocês, seja pela amizade, pelas risadas ou pelos conhecimentos compartilhados. Vocês foram os melhores colegas de trabalho que eu poderia desejar!

Agradeço especialmente aos queridos Vanessa, Júlia e Luiz Henrique pela amizade e confiança que desenvolvemos ao longo desses anos de LMM. Que continuemos a dividir nossas risadas e experiências por muitos anos. Amo vocês!

Agradecimentos especiais

Gostaria de agradecer a Deus pelas oportunidades concebidas, por me guiar e me iluminar em meu caminho. Por ser meu protetor!

À minha mãe, Irani, pelo amor incondicional, por todo o apoio, paciência, dedicação e amizade. Obrigada por ser essa mãe tão maravilhosa e acreditar em mim sempre. Obrigada por me acalmar e não me fazer desistir dos meus sonhos. Você é meu bem mais precioso e meu exemplo. Te amo além da vida!

Ao meu pai, Antonio, pelo amor, pelo apoio e pela confiança em mim depositada. Obrigada por me ajudar nesse meu caminho de incertezas e me ajudar a tornar tudo isso realidade. Amo você!

Ao meu amor, André, por ser meu companheiro em todos os momentos. Obrigada por tornar meus dias mais felizes e por acreditar no meu potencial. Obrigada por estar sempre tão presente. Seu suporte e seu amor são peças fundamentais na minha vida. Por você e nossa família busco sempre por um futuro melhor. Eu não poderia sonhar algo que me completasse mais. Te amo pra sempre!

À minha irmã, Daniela, por me apoiar e estar sempre ao meu lado e por todo o carinho. Amo você, minha irmã!

À minha gêmea Mari, minha companheirona de jornada acadêmica e da vida. Obrigada pela amizade maravilhosa, pelas risadas, pelo apoio e pela dedicação em todos esses anos de pós-graduação. Aprendemos tantas coisas juntas. Tenho certeza que você teve um papel fundamental em todo esse meu caminho. Muito obrigada por tudo! O doutorado acabou, mas torço muito para que estejamos sempre juntas nessa “one way” da vida! Amo você!

Às minhas amigas Déia, Lari, Ju, Carol Zanon, Ana e Mari Gomes por todo o carinho e companheirismo e pela amizade. Sou eternamente grata a Deus por ter colocado vocês em meu caminho. Amo cada uma!

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa importante jornada, em especial à minha família.

RESUMO

Os efeitos deletérios dos desreguladores endócrinos (DE) e de dietas ricas em gordura sobre os parâmetros reprodutivos masculinos constituem sérios problemas da vida moderna. O di-n-butil ftalato (DBP) é um DE conhecido por causar graves anomalias reprodutivas quando administrado durante a diferenciação sexual, mas o prejuízo dessa exposição para os parâmetros espermáticos do gerbilo permanece pouco conhecido. O consumo elevado de lipídios na dieta também tem sido associado a prejuízos para a fertilidade masculina, por comprometer a qualidade e a quantidade de espermatozoides, entretanto a ação dos lipídios sobre os aspectos reprodutivos é variável, dependendo da quantidade e da natureza do lipídio. Assim, este estudo avaliou as consequências da exposição gestacional ao DBP para a função testicular e os parâmetros espermáticos do gerbilo da Mongólia e as interferências nos efeitos do DBP do veículo diluidor óleo de milho, largamente utilizado na administração de substâncias lipossolúveis. Também investigou os efeitos da dieta rica em lipídios saturados (banha de porco), do desmame até a idade adulta, sobre esses aspectos reprodutivos. Foram utilizados gerbilos adultos (16 semanas de idade) nascidos de mães alimentadas com ração padrão e intactas (C), expostas apenas ao óleo de milho (O) ou ao óleo de milho contendo DBP (Ph). Metade dos filhotes de mães intactas recebeu, a partir do desmame até a idade adulta, ração contendo elevado teor de lipídios saturados (D). O DBP (100 mg/kg/dia) e o óleo de milho (0,1 mL) foram administrados às mães, via gavagem, do dia gestacional 8 ao 23. Foram utilizados 12 animais por grupo experimental. A exposição gestacional ao DBP causou dislipidemia, aumentou os níveis séricos e intratesticulares de estradiol, elevou os níveis de biomoléculas oxidadas no sangue e reduziu a reserva e a motilidade espermática do gerbilo. O consumo materno de óleo de milho aumentou, ainda que marginalmente, os níveis de colesterol não-HDL, elevou os níveis séricos de estradiol e o conteúdo testicular de ER α e diminuiu a reserva espermática e a taxa de espermatozoides móveis sem progressão da prole na idade adulta. O consumo pós-natal de dieta rica em banha aumentou os níveis séricos de colesterol total e colesterol não-HDL, diminuiu os níveis intratesticulares de testosterona e aumentou os de estradiol ($p=0,052$). Essas alterações foram acompanhadas do aumento no conteúdo testicular dos receptores nucleares ER α e LXR α , bem como da redução da motilidade dos espermatozoides. Conclui-se que a exposição gestacional ao DBP perturba o metabolismo lipídico e a esteroidogênese e compromete a motilidade e reserva espermática do gerbilo na idade adulta. Além disso, o óleo de milho, *per se*, altera o perfil lipídico e hormonal e prejudica a quantidade e a qualidade espermática, sugerindo que este veículo interfere na

resposta reprodutiva do DBP. Também se conclui que a dieta rica em banha induz obesidade, hipercolesterolemia e prejuízo para motilidade espermática do gerbilo.

ABSTRACT

The deleterious effects of endocrine-disrupting chemicals (EDC) and high-fat diets on male reproductive parameters are serious problems in modern life. Di-n-butyl phthalate (DBP) is an EDC known to cause severe reproductive anomalies when administered during sexual differentiation, but the damage caused by such exposure to the sperm parameters of the gerbil remains little known. High lipid intake in the diet has also been associated with impairments in male fertility, since it compromises sperm quantity and quality. However, lipid activity on reproductive functions varies according to the amount and nature of the lipid. The present study evaluated the consequences of gestational exposure to DBP for testicular function and sperm parameters of the Mongolian gerbil and the interference in the DBP effects of the diluent vehicle corn oil, widely used in the administration of liposoluble substances. The study also investigated the effects of a high-saturated-fat diet (lard), from weaning up to adulthood, on these reproductive aspects. Adult gerbils (16 weeks of age), born from mothers fed a standard diet, and intact (C), exposed only to corn oil (O), or to corn oil containing DBP (Ph) were used. Half of the offspring of intact mothers received a diet containing high-saturated fat, from weaning up to adulthood (D). DBP (100 mg/kg /day) and corn oil (0.1 ml) were administered to mothers, via gavage, from gestational day 8 to 23. Twelve animals were used per experimental group. Gestational exposure to DBP caused dyslipidemia, increased serum and intratesticular estradiol levels, enhanced the levels of oxidized biomolecules in the blood, and reduced sperm reserve and motility in gerbil. Maternal corn oil consumption increased, even if only marginally, the non-HDL cholesterol levels, enhanced serum estradiol levels and testicular ER α content, and decreased both sperm reserve and the rate of sperm without progressive movement in the adult offspring. Postnatal consumption of a lard diet increased serum levels of total cholesterol and non-HDL cholesterol, decreased intratesticular testosterone levels and increased intratesticular estradiol levels ($p=0.052$). These changes were accompanied by an increase in the testicular content of the nuclear receptors ER α and LXR α , as well as a reduction in sperm motility. It was concluded that gestational exposure to DBP disrupts the lipid metabolism and steroidogenesis and compromises the sperm reserve and motility of the adult gerbil. In addition, corn oil *per se* altered the lipid and hormonal profile and impaired sperm quantity and quality, suggesting that this vehicle interferes with the reproductive DBP response. It was also concluded that a diet rich in lard induces obesity and hypercholesterolemia and impairs the gerbils sperm motility.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: receptor de andrógeno

BBP: butil-benzil ftalato

CES: ciclo do epitélio seminífero

DBP: di-n-butil ftalato

DE: desregulador endócrino

DEHP: di(2-etil-hexil) ftalato

DEP: di-etil ftalato

DMP: di-metil ftalato

ER: receptor de estrógeno

EROs: espécies reativas de oxigênio

ER α : receptor de estrógeno α

ER β : receptor de estrógeno β

FSH: hormônio folículo estimulante

IMC: índice de massa corpórea

LH: hormônio luteinizante

LXR: receptor X do fígado

LXR α : receptor X do fígado α

LXR β : receptor X do fígado β

MBP: mono-butil ftalato

MEHP: mono-etil-hexil ftalato

PPAR: receptor de ativação da proliferação de peroxissomos

PPAR γ : receptor de ativação da proliferação de peroxissomos γ

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO.....	14
I.1 BIOLOGIA TESTICULAR	14
I.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS E DI-N-BUTIL FTALATO (DBP)	19
I.3 OBESIDADE E LIPÍDIOS SATURADOS	24
I.4 GERBILO DA MONGÓLIA.....	26
II OBJETIVOS	28
III RESULTADOS	29
III.1 MANUSCRITO 1	30
III.2 MANUSCRITO 2.....	67
IV CONCLUSÕES.....	98
V REFERÊNCIAS.....	99
VI ANEXOS	113

I INTRODUÇÃO

I.1 BIOLOGIA TESTICULAR E EPIDIDIMÁRIA

O desenvolvimento testicular requer a proliferação e a diferenciação de três populações celulares principais: as células de Leydig, as células de Sertoli e as células germinativas (Orth, 1982; Boulogne *et al.*, 1999; Mendi-Handagama e Ariyaratne, 2001).

Diversos aspectos do desenvolvimento testicular e da masculinização, como o desenvolvimento das células testiculares, dependem da produção e ação dos esteroides sexuais (Sharpe, 2001). A testosterona, por exemplo, rege uma série de transformações na gônada em desenvolvimento, como a proliferação das células de Sertoli, durante os períodos fetal e neonatal (Sharpe *et al.*, 2003). Este hormônio também interfere na proliferação das células germinativas fetais ou gonócitos (Merlet *et al.*, 2007). Os estrógenos, por sua vez, influenciam o desenvolvimento dos gonócitos e das células de Leydig (Delbès *et al.*, 2004, 2007; Viguera-Villasenõr *et al.*, 2006).

Os testículos possuem dupla função: produzir espermatozoides (espermatogênese) e sintetizar hormônios (esteroidogênese). A espermatogênese é um processo complexo e altamente organizado no qual a espermatogônia tronco, através de uma série de eventos envolvendo mitose, meiose e diferenciação celular, torna-se um espermatozoide maduro (Russell *et al.*, 1990; Sharpe, 1994). Este processo ocorre dentro dos túbulos seminíferos do testículo, em estreita associação com as células de Sertoli (Dym e Fawcett, 1970).

O parênquima testicular, constituído por túbulos seminíferos e tecido intersticial, é envolvido por uma cápsula chamada túnica albugínea. O tecido intersticial contém vasos sanguíneos e linfáticos, essenciais para o transporte de hormônios e nutrientes dentro e fora do testículo. O tipo de celular mais frequentemente encontrado no interstício é a célula de Leydig (Christensen, 1975), que está envolvida na secreção de androgênios, notadamente a testosterona. Dentro dos túbulos seminíferos, as células de Sertoli repousam em uma membrana basal, sob a qual estão o endotélio linfático e as células mioides peritubulares (Dym e Fawcett, 1970). A estrutura da célula de Sertoli é extremamente complexa e seu citoplasma possui processos citoplasmáticos que formam uma íntima associação com os diversos tipos de células germinativas do epitélio seminífero (Russell, 1993). O epitélio seminífero de mamíferos consiste de diferentes gerações de células germinativas organizadas em uma série de estágios ou associações celulares bem definidas (Segatelli *et al.*, 2002). A associação entre célula germinativa-célula de Sertoli constitui o que denominamos de ciclo do epitélio seminífero (CES) (Leblond e Clermont, 1952). Cada associação particular de células

germinativas é referida como um estágio, sendo o número e a duração dos estágios da espermatogênese espécie-específico e definido pelas características morfológicas da espermátide, particularmente do núcleo e do acrossomo (Segatelli *et al.*, 2002). São definidos 12 estágios no CES do camundongo, 14 no do rato e seis no do humano (Russel *et al.*, 1990). Segatelli *et al.* (2002) caracterizou os estágios do CSE do gerbilo da Mongólia, modelo animal utilizado no presente estudo (Fig 1). Em 2004, Segatelli e colaboradores estimaram a duração de cada estágio da espermatogênese, (Fig. 2), fornecendo, assim, fundamentos para o estudo da biologia reprodutiva deste roedor.

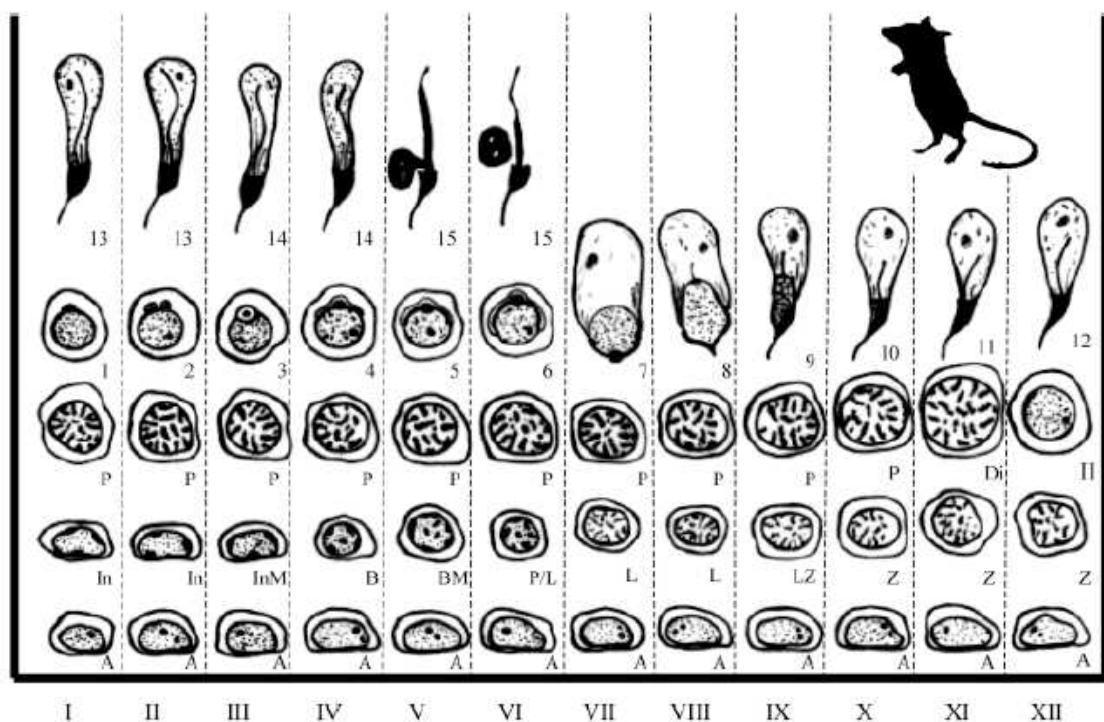


Figura 1. Esquema do ciclo do epitélio seminífero do gerbilo. A coluna vertical, designada em algarismos romanos, representam as associações celulares. A progressão do desenvolvimento da célula é demonstrada horizontalmente, seguindo da borda esquerda para a direita. A progressão celular continua na borda esquerda da linha superior. O ciclo termina com a completa espermição da célula germinativa. Os símbolos designam fases específicas do desenvolvimento da célula germinativa. (A) espermatogônia A, (In) espermatogônia intermediária, (B) espermatogônia B, (InM) e (BM) espermatogônias In e B em divisão mitótica. Divisões meióticas: (Pl) preleptóteno, (L) leptóteno, (Z) zigóteno, (P) paquíteno, (Di) espermatócito primário em diplóteno, (II) espermatócito secundário. Números cardinais 1 a 15: fases da espermiogênese (Segatelli *et al.*, 2000) (retirado de Segatelli *et al.*, 2002).

Quando o desenvolvimento de células germinativas está completo, as espermátides maduras são liberadas das células de Sertoli no lúmen do túbulo, sendo então denominadas espermatozoides. Os espermatozoides seguem para o epidídimo através dos ductos eferentes com a ajuda do fluido testicular, já que nesse momento os gametas são imóveis (O'Donnell *et al.*, 2001). Na passagem pelo epidídimo os espermatozoides sofrem uma série de mudanças bioquímicas para tornarem-se espermatozoides móveis capazes de fertilização (O'Donnell *et al.*, 2001). Proteínas sintetizadas e secretadas pelas células epiteliais do epidídimo estão envolvidas no processo de maturação do espermatozoide (Yenuqu *et al.*, 2006). Além disso, a maturação espermática requer um ambiente luminal específico, o qual é mantido pela atividade absorviva e secretória do epitélio epididimal (Orgebin-Crist e Tichenor, 1973).

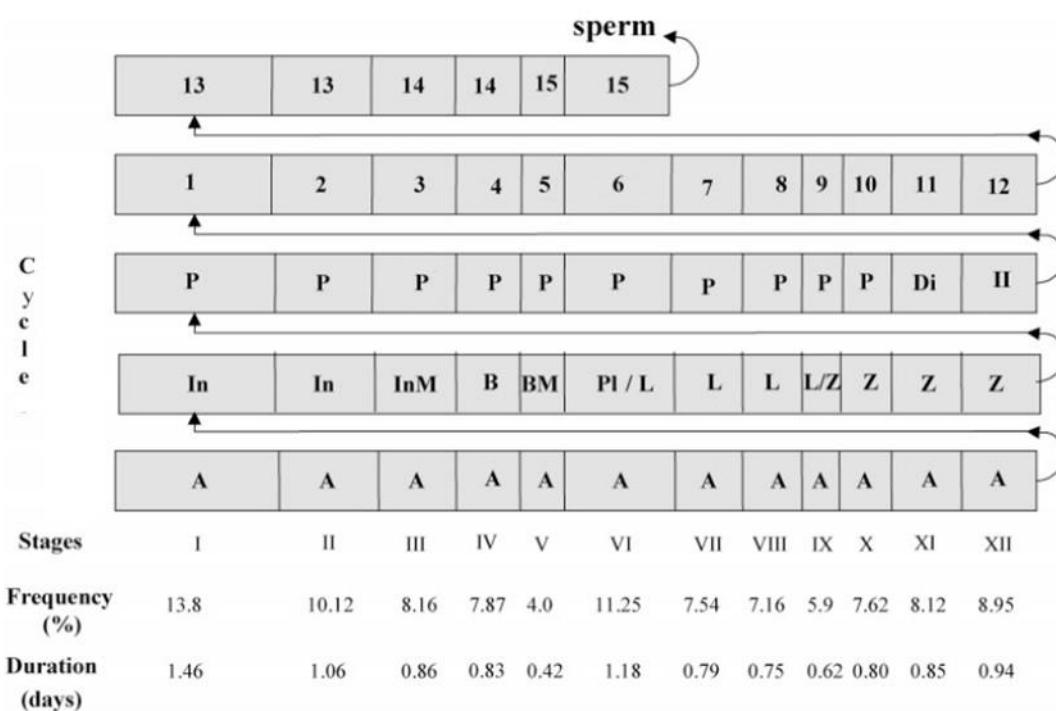


Figura 2. Diagrama mostrando a composição de células germinativas, a frequência (%) e a duração em dias de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero. Os números romanos verticais indicam os ciclos espermatogênicos e os romanos horizontais, os estágios do ciclo do epitélio seminífero com suas frequências relativas (%) e durações (dias). O espaço dado a cada estágio é proporcional à sua frequência e duração. As letras indicam os tipos de células germinativas presentes em cada estágio do ciclo. (A) espermatogônia A, (In) espermatogônia intermediária, (B) espermatogônia B, (InM) e (BM) espermatogônias In e B em divisão mitótica. Divisões meióticas: (Pl) preleptóteno, (L) leptóteno, (Z) zigóteno, (P) paquíteno, (Di) espermatócito primário em diplóteno, (II) espermatócito secundário. Numeros cardinais: 1 a 6, espermátides redondas; 7 a 15, espermátides alongadas (retirado e modificado de Segatelli *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, além da produção de espermatozoides, o testículo está envolvido na produção de hormônios que são necessários para diversas funções do organismo, incluindo a manutenção de funções sexuais secundárias e a regulação, por *feedback* negativo, da secreção das gonadotrofinas LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante) (O'Donnell *et al.*, 2011). Estes hormônios são os maiores reguladores da espermatogênese (Sharpe, 1994). FSH regula este processo por estimular numerosos fatores nas células de Sertoli, enquanto que o LH estimula a secreção de testosterona pelas células de Leydig. A ação da testosterona é mediada através da ligação aos receptores de andrógenos (AR), os quais pertencem à superfamília dos receptores esteroides, cujos membros funcionam, principalmente, como fatores de transcrição para regular a expressão de genes alvo (Matsumoto *et al.*, 2005). ARs estão presentes nos testículos adultos nas células de Sertoli, células peritubulares e células de Leydig. (Zhou *et al.*, 2002). Além da testosterona, outros componentes são importantes no fluído testicular (Sharpe *et al.*, 1994), como o estrógeno (Hess *et al.*, 2002). Os estrógenos também são sintetizados nos testículos. A enzima aromatase, pertencente à superfamília dos citocromo P450, é a responsável por catalisar a conversão irreversível de substratos androgênicos (testosterona e androstenediona) em estrógenos (estradiol e estrona) (Brodie, 1985). Estrógenos testiculares interagem com receptores de estrógeno (ER), dos tipos α e β , para mediar a transcrição de genes específicos. Em contraste com os ARs, que são majoritariamente localizados em células somáticas, ERs são encontrados na maioria das células do testículo, inclusive nas células germinativas (Carreau *et al.*, 2011). ER α e ER β são produtos de genes distintos localizados em cromossomos separados (O'Donnell *et al.*, 2001). Além disso, possuem mecanismos moleculares e características funcionais distintas, que incluem diferenças na afinidade de ligação com determinado ligante, apesar da similar afinidade de ligação com o estradiol (Kuiper *et al.*, 1997).

Assim, a espermatogênese é um processador bastante dinâmico e depende de uma fina regulação hormonal. A apoptose, processo de morte celular programado, é notável durante a espermatogênese de várias espécies de mamíferos e desempenha um papel crítico na determinação da produção espermática (Allan *et al.*, 1987; Russell *et al.*, 1990; Sharpe, 1994; Sinha Hikim e Swerdloff, 1999). Estudos mostram que baixas concentrações de testosterona intratesticular estão relacionadas a aumentos significativos nas taxas de morte celular nos testículos de ratos (Sinha Hikim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001), o que pode acarretar em prejuízos para a capacidade reprodutiva do animal.

Diversos são os métodos de avaliação da qualidade do sêmen e, consequentemente, da capacidade reprodutiva de um animal. Dentre os indicadores do potencial de fertilidade masculina estão a morfologia dos espermatozoides, o número de espermátides presentes nos testículos, a produção diária de espermatozoides e a motilidade espermática (Brooks, 1983; Ashby *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2005; Menkveld *et al.*, 2011). A exposição a químicos ambientais e o estilo de vida atual da população são fatores que tem impactado de forma negativa a espermatogênese (Sharpe, 2010). Estudos epidemiológicos mostram que a exposição a ftalatos, químico pertencente à classe dos desreguladores endócrinos, está associada à pobre qualidade do sêmen de homens inférteis e relatam significativa associação entre os níveis urinários monobutil ftalato e baixa concentração e motilidade espermática (Duty *et al.*, 2003, 2004; Hauser, 2006). Alterações nos padrões de motilidade podem levar à ineficiência da passagem dos espermatozoides através do muco cervical, causando prejuízos para a reprodução, já que depende do rápido movimento progressivo (Aitken *et al.*, 1985; Björndahl, 2010). A implicação clínica da morfologia anormal dos espermatozoides para a capacidade de fertilização é outro importante critério de avaliação, onde a classificação é feita de acordo com os defeitos na cabeça, no pescoço, na peça intermediária e na cauda dos espermatozoides, além da presença anormal de gotas citoplasmáticas (Menkveld *et al.*, 1990; Coetzee *et al.*, 1998). No entanto, este indicador deve ser avaliado em conjunto com outros parâmetros para determinar os possíveis prejuízos para a eficácia reprodutiva (Van Waart *et al.*, 2001).

Evidências indicam que o desequilíbrio entre substâncias peroxidativas e antioxidantes no sêmen leva a desordens metabólicas e funcionais nas células germinativas masculinas e pode ser a causa de alguns aspectos da infertilidade (Fraczek e Kurpisk, 2007). O metabolismo aeróbico produz continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs) que são potencialmente danosas aos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática das células germinativas (Jones *et al.*, 1979; Fujii *et al.*, 2003). Diferentes células testiculares apresentam diferentes susceptibilidade às EROs (Bauche *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 2003). EROs são especialmente prejudiciais aos espermatozoides, uma vez que, apesar das defesas antioxidantes serem ativas no sêmen, a atividade é limitada à pequena quantidade de citoplasma espermático (Lewis *et al.*, 1997). Assim, uma vez que os espermatozoides são altamente sensíveis às injúrias causadas pela alta concentração de EROs, o aumento o ambiente oxidativo leva a danos celulares, como a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA, podendo culminar em anormalidade espermática e comprometimento da qualidade do sêmen (Aitken e Clakson, 1987; Rabbani *et al.*, 2010; Shiva *et al.*, 2011).

1.2 DI-N-BUTIL FTALATO COMO DESREGULADOR ENDÓCRINO E METABÓLICO

É amplamente conhecido que processos que levam à desregulação nos hormônios sexuais em períodos críticos da vida, como os períodos fetal/neonatal e a puberdade, podem alterar a diferenciação das diversas populações celulares do testículo e o desenvolvimento de outros órgãos andrógeno-dependentes, podendo haver comprometimento da capacidade reprodutiva do indivíduo na idade adulta (Wilson, 1978; Andrade *et al.*, 2006; Christiansen *et al.*, 2010; Sharpe, 2010). É o caso de determinados químicos ambientais que mimetizam ou bloqueiam a ação hormonal, conhecidos como desreguladores endócrinos (DE) (Brown, 1999; Waissmann, 2002).

Segundo a *Environmental Protection Agency* (EPA, 1997), um desregulador endócrino é definido como “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural do organismo, o qual é responsável pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”. Vários são os compostos que podem funcionar como DE, sejam eles sintéticos, como os alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCD) e bisfenol A, ou naturais, como os estrogênios naturais e fitoestrogênios (Bila e Dezotti, 2007). Além disso, os efeitos dos DE podem ser temporários ou permanentes dependendo da dose e do período de exposição (Kavlock *et al.*, 1996; WHO, 2001; Waissmann, 2002).

Uma classe de DE com interesse crescente pela comunidade científica é composta pelos ésteres de ftalato (EPA, 2006). Os ftalatos são substâncias orgânicas derivadas do composto ácido 1,2-benzeno dicarboxílico e, geralmente, apresentam baixa toxicidade (Loureiro, 2002; Foster, 2006). Alguns exemplos desta categoria de DE são o di-metil ftalato (DMP), di-n-butil ftalato (DBP), di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP), butil benzil ftalato (BBP) e di-etil ftalato (DEP) (Fig. 3). Estruturalmente, os ftalatos apresentam dois grupos ésteres ligados a um anel benzeno (Fig. 3), sendo a configuração *orto* conhecida genericamente como éster de ftalato, ou apenas ftalato. Segundo Howdeshell *et al.* (2008), ésteres de ftalato com 4-6 carbonos ligados na posição *orto* são considerados ativos. As configurações *meta* e *para* são conhecidas, respectivamente, como isoftalatos e teraftalatos (Kluwe, 1982).

Os ftalatos são produtos químicos usados como plastificantes desde a década de 1940 em diversos tipos de plásticos, principalmente o PVC (cloreto de polivinila) (Loureiro, 2002). Constituindo de 10-60% dos plásticos, eles conferem flexibilidade e transparência ao produto (Thomas e Thomas, 1984). Também estão presentes em cosméticos, brinquedos infantis, produtos alimentícios e materiais hospitalares (Mylchreest *et al.*, 2000; Lottrup *et al.*,

2006). Devido ao fato de não se ligarem covalentemente aos polímeros com os quais são misturados, os ftalatos podem ser liberados na comida, bebida e outros produtos que estiverem em contato (Thomas e Thomas, 1984; Huber *et al.*, 1996). Sua produção aumenta proporcionalmente à indústria de plásticos e estão disseminados em todos os ecossistemas do mundo, sendo lançados no ambiente a partir de despejos domésticos e industriais e emissões atmosféricas (Loureiro, 2002). Apesar da dificuldade em se estimar a quantidade exata, pressupõe-se que cerca de seis milhões de toneladas de ftalatos sejam produzidas em todo o mundo todos os anos (Rudel e Perovich, 2009).

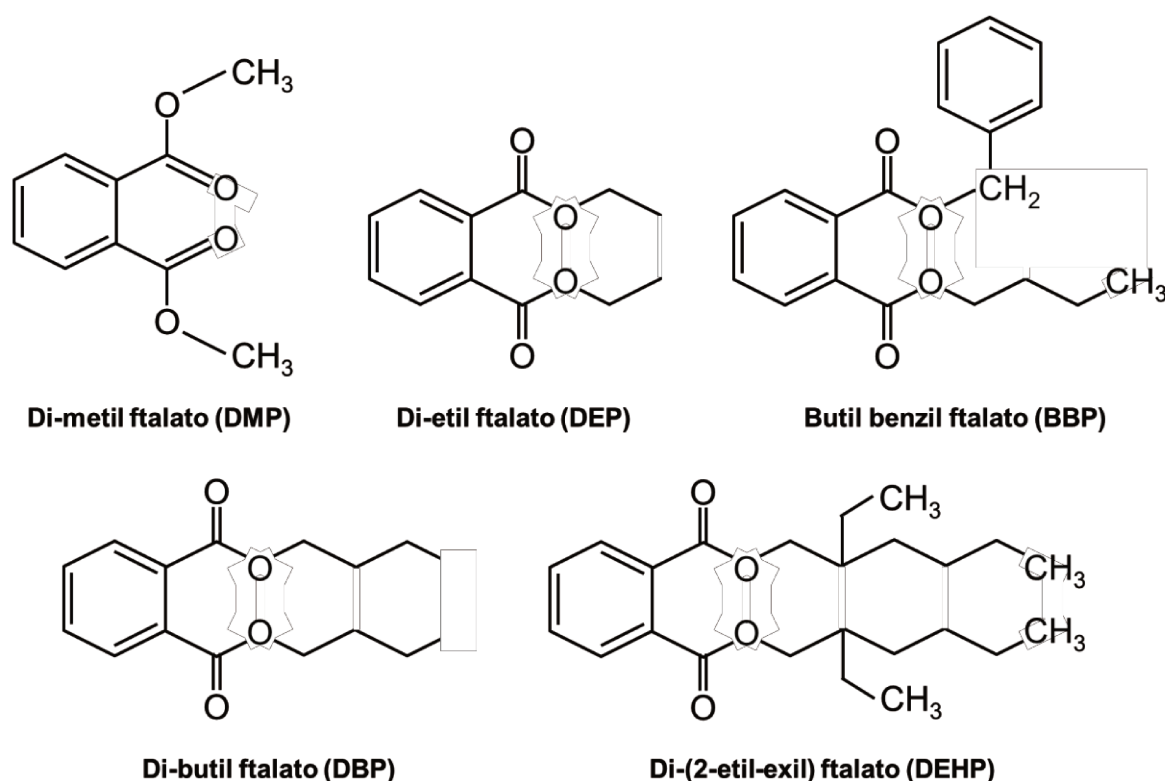


Figura 3. Estrutura química de alguns ftalatos mais utilizados pela indústria (retirado e modificado de Olujimi *et al.*, 2010).

A determinação de um panorama geral para a ingestão diária média de ftalatos é bastante difícil, já que essa estimativa depende de vários aspectos, como idade, sexo e níveis de exposição ambiental a que a população está sujeita. Estudo realizado na Alemanha com 85 adultos mostrou que a ingestão média diária dos ftalatos DEP, DBP e DEHP é 2,32 $\mu\text{g/kg/dia}$, 5,22 $\mu\text{g/kg/dia}$ e 10,3 $\mu\text{g/kg/dia}$, respectivamente (Koch *et al.*, 2003). Frederiksen *et al.* (2011) estimaram que a ingestão diária média de DEP, DBP e DEHP por crianças e adolescentes dinamarqueses foi de 1,09 $\mu\text{g/kg/dia}$ para o DEP, 4,29 $\mu\text{g/kg/dia}$ para o DBP e 4,04 $\mu\text{g/kg/dia}$

para o DEHP. Inúmeros estudos mostram que além de serem encontrados em amostras de urina humana (Blount *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2003, 2007; Kondo *et al.*, 2010; Frederiksen *et al.*, 2011), metabólitos de ftalatos também estão presentes no leite materno (Mortensen *et al.*, 2005; Main *et al.*, 2006) e no fluido amniótico (Silva *et al.*, 2004; Calafat *et al.*, 2006). As principais fontes de exposição humana e animal aos ftalatos são a ingestão de alimentos e líquidos que tenham tido contato com plásticos, tintas e outros constituintes das suas embalagens (Blount *et al.*, 2000; Mylchreest *et al.*, 2000; Loureiro, 2002), bem como a inalação e o contato dérmico (Kavloc *et al.*, 2002).

Os DE têm potencial de agir em qualquer nível do eixo hipotálamo-pituitária-gônada e são especialmente danosos durante a fase fetal, um período do desenvolvimento altamente sensível a distúrbios causados por químicos ambientais, que podem alterar permanentemente os mecanismos homeostáticos do sistema endócrino e também causar danos estruturais graves (IPCS, 2002). Alguns estudos mostram as mudanças histológicas que ocorrem nos testículos após a exposição aos ftalatos *in utero* e demonstram que estes são diretamente afetados durante a diferenciação fetal e neonatal, exibindo hipotrofia (Moore *et al.*, 2001; Carruthers e Foster, 2005; Heng *et al.*, 2012), atrofia dos túbulos seminíferos (Gray e Gangolli, 1986), e agregação de células de Leydig (Howdeshell *et al.*, 2008). Além disso, outros estudos revelam que a exposição a altas doses de ftalatos durante os períodos críticos do desenvolvimento está associada ao aumento de hipospadias e criptorquidismo, além de redução da distância anogenital e do peso do epidídimo e das glândulas acessórias sexuais (Moore *et al.*, 2001; Fisher, 2004). Também há dados de que estes desreguladores causam redução na produção diária de espermatozoides e na qualidade do sêmen, comprometendo a capacidade reprodutiva do indivíduo adulto (Foster *et al.*, 2000; Sharpe, 2010).

Devido ao fato de os ésteres de ftalato poderem atravessar a membrana placentária e também estarem presentes no leite materno, grande atenção tem sido voltada aos efeitos destes compostos sobre a prole, após a exposição materna (Shea, 2003; Huang *et al.*, 2009; Scarano *et al.*, 2009; Wittassek *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). Scarano *et al.* (2010) expuseram ratas prenhes a 100 mg/kg/dia de DBP durante a gestação e a lactação e verificaram que os testículos fetais apresentaram alterações histopatológicas devido a quedas nos níveis de testosterona fetal, porém não foi verificado comprometimento dos parâmetros reprodutivos e da estrutura epididimal na idade adulta. Por outro lado, Fisher *et al.* (2003) demonstraram que roedores expostos a esta mesma dose de DBP durante a gestação apresentam alterações nos testículos neonatais, contudo os efeitos persistiram até a idade adulta. Assim, os efeitos

toxicológicos do DBP sobre o testículo são contraditórios e parecem variar dependendo do período de exposição.

Os distúrbios causados por ftalatos, como o DEHP e o DBP, são atribuídos a alterações funcionais nas células de Sertoli e nas células de Leydig durante o desenvolvimento (Sharpe, 2001; Fisher *et al.*, 2003; Foster, 2006). As células de Sertoli são consideradas os principais alvos de toxicidade e qualquer comprometimento funcional nessas células causa efeitos secundários imediatos nas células que delas dependem, ou seja, nas células germinativas (Meistrich, 1984). Kleymenova *et al.* (2005) e Bao *et al.* (2011) verificaram que a exposição *in utero* ao DBP altera o citoesqueleto de vimentina das células de Sertoli, comprometendo seu contato com as células germinativas, podendo causar prejuízos para a espermatogênese. Outra consequência imediata da toxicidade dos ftalatos é a redução na síntese de testosterona durante o período fetal e, por vezes, na vida adulta (Mylchreest *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 2000), mostrando a susceptibilidade das células de Leydig a agentes que interfiram na esteroidogênese (Creasy, 2001), além das consequências da regulação direta sofrida por essas células a partir de alterações nas células de Sertoli (Hazra *et al.*, 2013).

Assume-se que a toxicidade do DBP, e outros ftalatos, esteja associada à atividade biológica de seu principal metabólito, o monoéster monobutil ftalato (MBP) (Latini, 2005; Fig. 4). Após os processos de absorção e metabolização, a excreção do MBP na urina e nas fezes são consideradas rápidas (Latini, 2005). Estudo de Tanaka *et al.* (1978) revelou que mais de 90% do DBP administrado intravenosa ou oralmente a ratos Wistar machos é excretado na urina e nas fezes dentro de 48h após sua administração. Em humanos, a taxa de excreção renal observada foi de aproximadamente 70% do MBP (Tanaka *et al.*, 1978; Anderson *et al.*, 2001).

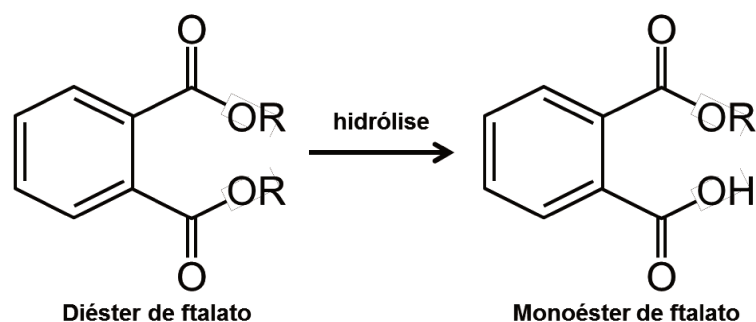


Figura 4. Estrutura química genérica de ésteres de ftalato e seu metabólito (retirado e modificado de Hauser e Calafat, 2005).

Estudos realizados na última década têm demonstrado um forte indício de que a exposição aos DE contribui para o aumento da incidência de obesidade (Lubrano, 2008; Lubrano 2009; Hatch *et al.*, 2010; Newbold, 2010; Tang-Péronard *et al.*, 2011; Lubrano, *et al.*, 2013; Manikkam *et al.*, 2013). Tanto pesquisas com animais quanto estudos epidemiológicos indicam que uma variedade de DE regulam inapropriadamente o metabolismo de lipídios, promovendo a adipogênese e obesidade (Grün e Blumberg, 2006; Lubrano, 2008), sendo, por isso, chamados de desreguladores metabólicos. Assim, em 2006, Bruce Blumberg propôs a “hipótese obesogênica”, que postula que algumas categorias de DE podem afetar o peso corporal e levar à obesidade por alterar a sinalização de células envolvidas na regulação da diferenciação e maturação dos adipócitos ou do metabolismo de lipídios (Grün e Blumberg, 2006; Hatch *et al.*, 2010). Dentre os desreguladores endócrinos capazes de induzir uma resposta obesogênica estão o bisfenol A, os pesticidas organoclorados e os ftalatos (Hatch *et al.*, 2010).

Os mecanismos propostos para explicar a associação entre DE e obesidade incluem, além de efeitos nos hormônios esteroides, efeitos nos hormônios tireoidianos e ativação dos receptores nucleares de ativação da proliferação de peroxissomos (PPAR), um membro da superfamília de receptores nucleares, os quais ativam a principal via de diferenciação dos adipócitos e de estocagem de energia (Evans *et al.*, 2004). Em testículos de ratos adultos, PPARs estão localizados no tecido intersticial e nos túbulos seminíferos (Braissant *et al.*, 1996). Análises de *microarrays* sugerem que o PPAR do tipo γ pode desempenhar um importante papel na regulação da expressão dos principais genes do metabolismo lipídico da célula de Sertoli durante o desenvolvimento pós-natal (Thomas *et al.*, 2011). Alguns estudos têm demonstrado que o aumento na expressão testicular de PPAR causadas por exposição aos ftalatos, como o DBP e o DEHP, está associado à distúrbios reprodutivos (Corton e Lampinskas, 2005; Ryu *et al.*, 2007).

Também há dados indicando que os DE ativam outros receptores nucleares, como os receptores X do fígado (LXRs) dos tipos α e β . LXR α e LXR β estão envolvidos não apenas na regulação da homeostase do colesterol e dos ácidos graxos, mas também na homeostase de glicose, na imunidade, no desenvolvimento de ossos e nas funções cerebrais (Cao *et al.*, 2004). No que se refere ao aparelho reprodutor masculino, estes receptores estão envolvidos com a homeostase de lipídios nas células de Sertoli (LXR β), além da regulação da síntese de esteroides pelas células de Leydig (LXR α) (Muczynski *et al.*, 2012). Estudo *in vitro* de exposição de testículos e ovários fetais humanos ao mono-(etilhexil) ftalato (MEHP)

demonstrou que LXR α tem sua atividade aumentada nas células somáticas, culminando em maior síntese de colesterol e lipídios (Muczynski *et al.*, 2012).

I.3 OBESIDADE E LIPÍDIOS SATURADOS

Alterações do sistema endócrino também são resultados de disfunções metabólicas, como a obesidade. O sobrepeso e a obesidade são graves problemas de saúde pública, com incidência crescente na maioria dos países (WHO, 2001), e estão intimamente ligados a doenças como diabetes tipo II, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (Guh *et al.*, 2009). O índice de massa corpórea (IMC) é um dos principais métodos de avaliação do grau de obesidade de um indivíduo, sendo os valores entre 25 e 29,9 indicativos de sobrepeso e valores iguais ou acima de 30, de obesidade.

A contribuição do tecido adiposo para a homeostase corpórea tem sido ampliada para além do papel de reserva energética e sua capacidade endócrina hoje é bem fundamentada (Ahima e Flier, 2000; Kershaw e Flier, 2004). O acúmulo de tecido adiposo decorrente da obesidade pode alterar o padrão de síntese, metabolismo e ação de diversos hormônios (Kirschner, 1982; Tymchuk *et al.*, 1998; Lordelo *et al.*, 2007), incluindo os esteroides sexuais (Pasquali, 2006; Hammoud *et al.*, 2008). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o desequilíbrio nos esteroides sexuais decorrentes da obesidade pode afetar o sistema reprodutor e a fertilidade feminina (Pasquali, 2006; Pasquali *et al.*, 2007; Broughton e Moley, 2017). Em homens, o acúmulo de tecido adiposo está associado à diminuição dos níveis séricos de testosterona total e livre (Giagulli *et al.*, 1994), disfunção erétil (Chung *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2004), redução da qualidade do sêmen (número, motilidade e morfologia dos espermatozoides) e aumento nas taxas de infertilidade (Guzick *et al.*, 2001; Hammoud *et al.*, 2006; Kort *et al.*, 2006; Sharpe, 2010). Na Figura 5 está apresentado o papel do acúmulo de adipócitos para a infertilidade masculina.

A obesidade é frequentemente atribuída ao estilo de vida do Ocidente, que combina dietas ricas em gorduras e calorias e atividade física reduzida (Desai *et al.*, 2013). É bem estabelecido que o consumo crônico de dieta hiperlipídica pode causar aumento do peso corporal, dos índices de adiposidade, além de diminuir a sensibilidade à insulina (Jen, 1980; Hill *et al.*, 1992; Guo e Jen, 1995). No entanto, existem poucas informações clínicas a respeito do impacto de diferentes componentes lipídicos da dieta, uma vez que nestes estudos é bastante complexo identificar os efeitos causados por um tipo particular de lipídio. Jensen *et al.* (2013) conseguiu identificar, através de questionário sobre a frequência alimentar de 136 itens selecionados, que o consumo de dieta rica em lipídios saturados está associado com a

redução da qualidade do sêmen de jovens dinamarqueses. O elevado consumo de lipídios saturados não é considerado, de modo geral, um hábito saudável e tem sido associado ao aumento de doenças cardiovasculares e câncer de próstata (Escrich *et al.*, 2007; Hooper *et al.*, 2011). De acordo com Kris-Etherton *et al.* (2007), a ingestão de ácidos graxos saturados deve ser menor que 10%. Jensen *et al.* (2013) observou que homens que consumiram mais de 10% de lipídios saturados apresentavam baixa concentração espermática.

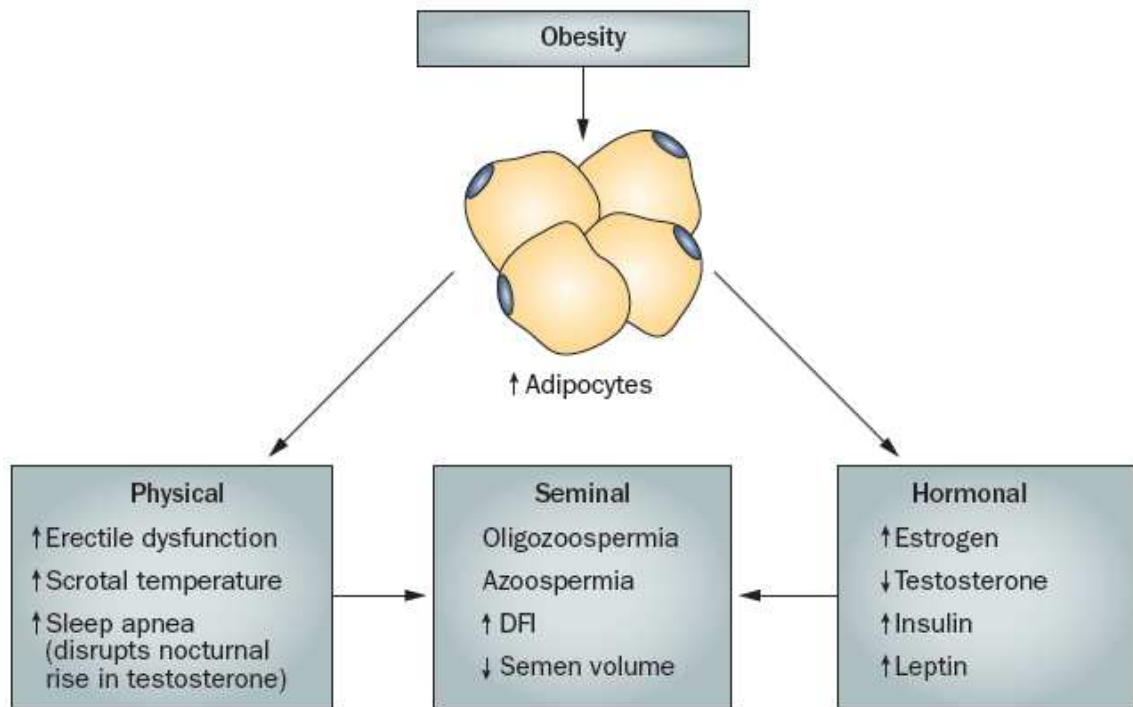


Figura 5. Papel dos adipócitos para a infertilidade masculina. Um aumento no tamanho ou no número de adipócitos como resultado da obesidade pode causar mudanças físicas e hormonais. As mudanças físicas podem incluir aumento na temperatura escrotal, na incidência de apneia e na disfunção erétil. As mudanças hormonais podem compreender aumento nos níveis de leptina, estrógeno e insulina e diminuição nos níveis de testosterona. Estas alterações contribuem para a oligozoospermia, azoospermia, aumento dos índices de fragmentação do DNA (DFI) e redução do volume de sêmen. Todas as três categorias contribuem para a infertilidade ligada à obesidade (Du Plessis *et al.*, 2010).

Devido à dificuldade dos estudos epidemiológicos em obter estes dados com precisão, estudos experimentais fazem uso de dietas enriquecidas com lipídios de interesse como modelo de indução de obesidade e para observar as consequências para a capacidade reprodutiva do animal (Pauli *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2011; Reame *et al.*, 2014; Pinto-Fochi *et al.*, 2016). Escobar *et al.* (2009) observaram que ratos alimentados por 10 semanas a partir do desmame com dieta rica em lipídios saturados, provenientes da

banha de porco, apresentavam aumento de peso corporal e nos níveis circulantes de testosterona. Observaram também maior expressão prostática dos receptores AR e PPAR γ , os quais resultaram em maiores taxas de proliferação das células epiteliais da próstata ventral de ratos, fornecendo *insights* sobre os mecanismos pelos quais este componente lipídico modula a iniciação ou progressão do câncer neste órgão (Escobar *et al.*, 2009).

Trabalhos experimentais sobre os efeitos dos lipídios saturados para os parâmetros espermáticos são escassos na literatura. Rato *et al.* (2013) verificaram que ratos que ingeriram por um mês 5mL de emulsão energética contendo banha como fonte lipídica (20g de banha, 1g de thyreostat, 5g de colesterol, 1g de glutamato do sódio, 10g de sacarose, 20mL Tween 80 e 30mL de propilenoglicol em 100mL de volume final) apresentaram redução nos níveis séricos e intratesticulares de testosterona, redução na porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais e aumento na taxa de motilidade espermática. Os autores sugerem que este aumento seria devido às alterações na modulação no metabolismo testicular, uma vez que o conteúdo intratesticular de glicose e de enzimas chave do metabolismo glicolítico foi aumentado (Rato *et al.*, 2013). No entanto, os dados diferem dos demais encontrados na literatura, que demonstram que dietas ricas em lipídios, ainda que sejam lipídios insaturados, comprometem a motilidade dos espermatozoides e a capacidade reprodutiva de roedores (Bakos *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2011).

I.4 GERBILO DA MONGÓLIA

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é um pequeno roedor da subfamília Gerbillinae, proveniente das regiões áridas da China e da Mongólia (Schwentker, 1963; Fig. 6). As colônias de laboratório disponíveis para a investigação científica em todo o mundo foram desenvolvidas a partir de 20 pares importados do Japão em 1954, descendentes de gerbilos originalmente capturados no leste da Mongólia na década de 1930, segundo Razolli *et al.* (2003). De acordo com estes autores, a endogamia resultou em perda significativa de diversidade genética nesses roedores de laboratório. Os gerbilos foram introduzidos nas Américas como nova proposta experimental nos anos cinquenta e, durante muito tempo, ficaram limitados aos Estados Unidos como animais de excelência para a pesquisa biomédica (Robinson, 1974).

O interesse nesse roedor tem resultado em crescente utilização do mesmo em investigações científicas. Nas últimas décadas, o gerbilo tem sido utilizado em inúmeros estudos desenvolvidos no Brasil (Segatelli *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2010a, b; de Jesus *et al.*, 2015; Pinto-Fochi *et al.*, 2016a, b; Antoniassi *et al.*, 2017) e em outros países (Saltzman *et al.*,

2008; Beu *et al.*, 2009; Juana *et al.*, 2010), os quais avaliam diferentes aspectos do aparelho genital masculino. Perez *et al.* (2012) e de Jesus *et al.* (2015) utilizaram as próstatas feminina e masculina, respectivamente, em estudos acerca da ação de DE. Os resultados destes estudos têm indicado a glândula prostática desse animal como um importante indicador de alterações no aparelho genital, devido à sua susceptibilidade a lesões.



Figura 6. Gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*).

Vários aspectos da biologia reprodutiva do gerbilos são conhecidos. Sabe-se que sua gestação dura de 24 a 26 dias e que a implantação ocorre no 8º dia de gestação (Norris e Adams, 1981). Segatelli e colaboradores descreveram as características estruturais do testículo adulto, a duração da espermatogênese e os processos de diferenciação das espermátides (Segatelli *et al.*, 2000, 2002, 2004). Trabalhos recentes desenvolvidos em nosso laboratório foram os pioneiros, no que diz respeito ao método utilizado, na avaliação dos parâmetros espermáticos do gerbilo (Pinto-Fochi *et al.*, 2016a; Negrin *et al.*, submetido). Estes dados juntamente com dados já presentes na literatura (Segatelli *et al.*, 2002, 2004) demonstram que o gerbilo é um bom modelo animal para investigação de toxicologia reprodutiva.

Dentre os compostos ambientais considerados tóxicos, os ésteres ftalatos aparecem como um dos mais largamente estudados devido aos potenciais danos reprodutivos que podem causar em ambos os sexos. Os ftalatos podem causar alterações no aparelho reprodutor masculino de diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem (Swan, 2008), o rato (Foster *et al.*, 2006; Giribabu *et al.*, 2012), o hamster (Gray *et al.*, 1982), o furão (Lake *et al.*, 1976) e o coelho (Higuchi *et al.*, 2003). Considerando-se que a variedade genética dentro de mamíferos e roedores é bastante grande, quanto mais modelos experimentais estudados, melhor será o entendimento da ação dos ftalatos para os organismos vivos.

II OBJETIVOS

O presente estudo avaliou as consequências da exposição gestacional ao di-n-butil ftalato e do ambiente nutricional pós-natal enriquecido com lipídios saturados, provenientes da banha de porco, para a função testicular e os parâmetros espermáticos do gerbilo da Mongólia.

A resposta do testículo submetido a estas condições foi analisada através avaliações histológicas, nos perfil metabólico, na esteroidogênese, no conteúdo de proteínas testiculares, nos parâmetros espermáticos e nos marcadores de estresse oxidativo.

III RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho foram divididos em dois manuscritos. O primeiro deles foi submetido à “*Reproductive Toxicology*”. O segundo encontra-se em fase de elaboração.

III.1 MANUSCRITO 1

Maternal supplementation with corn oil associated or not with di-n-butyl phthalate increases circulating estradiol levels of gerbil offspring and impairs sperm reserve

Ana Carolina Negrin¹, Mariana Marcielo de Jesus¹, Caroline Maria Christante¹, Danilo Grünig Humberto da Silva³, Sebastião Roberto Taboga^{1,2}, Maria Etelvina Pinto-Fochi^{2,4}, Rejane Maira Góes^{1,2*}

¹Department of Functional and Structural Biology, Institute of Biology, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

²Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University - UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³Department of Chemistry and Environmental Sciences, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University - UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Faculdade de Medicina, União das Faculdades dos Grandes Lagos - UNILAGO, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author at: Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Telephone: +55 17 32212391, fax +55 17 32212390.

E-mail addresses: acnegrin@gmail.com (AC Negrin), marianamarcielo@gmail.com (MM de Jesus), cachristante@hotmail.com (CM Christante), dangrunig@gmail.com (DGH Silva), taboga@ibilce.unesp.br (SR Taboga), mep.fochi@yahoo.com.br (ME Pinto-Fochi), remagoes@ibilce.unesp.br (RM Góes).

Abbreviations: AR, androgen receptor; CAT, catalase; DBP, di-n-butyl phthalate; DSP, daily sperm production; EDC, endocrine disrupting chemical; ER α , estrogen receptor α ; E₂, estradiol; GPx, glutathione peroxidase; HDL, high-density lipoprotein; LXR α , liver X receptor α ; MDA, malondialdehyde; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; SOD, superoxide dismutase; T, testosterone; TBARS, thiobarbituric acid reactive substance; TNF α , tumor necrosis factor α .

Abstract

This study evaluated the consequences of gestational exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) for testicular steroidogenesis and sperm parameters of the adult gerbil and the interference of corn oil (*co*), a vehicle widely used for administration of liposoluble agents, on DBP effects. Pregnant gerbils received no treatment or were treated from gestational day 8 to 23 via gavage with 0.1mL/day of *co* only or containing DBP (100mg/kg/day). Maternal *co* intake enhanced serum estradiol levels and testicular content of ER α , and reduced sperm reserve of adult offspring. Gestational DBP exposure caused dyslipidemia, increased serum and intratesticular estradiol levels and reduced sperm reserve and motility. Thus, maternal *co* supplementation alters circulating estradiol and impairs sperm quantity and quality of offspring. Gestational DBP exposure alters lipid metabolism and testicular steroidogenesis and worsens the negative effects of *co* on the sperm reserve and motility of gerbil. Therefore, *co* interferes with the reproductive response to DBP.

Keywords: Di-n-butyl phthalate; corn oil; lipid metabolism; sperm reserve; sperm motility

1 Introduction

Endocrine disrupting chemical (EDC) exposure during critical periods of development, such as the fetal period and lactation, may lead to transient effects or permanently affect the homeostatic mechanisms of the endocrine system, causing physiological alterations in adulthood [1-5]. Phthalate esters are a class of EDC of growing interest for the scientific community. Phthalates are chemicals used as plasticizers in several types of plastics, mainly PVC (polyvinyl chloride) [6], being found in cosmetics, children's toys, food products and hospital supplies [7]. EDC forms non-covalent bindings with the polymers with which they are mixed [8], so, at high temperatures, they can be released into food, beverage, and other products with which they come into contact [8,9].

Certain phthalates, particularly di-n-butyl phthalate (DBP), have been shown to interfere with the development of the male reproductive tract of the offspring when administered to pregnant rats [7,10-12]. Mylchreest *et al.* [7] demonstrated that rats exposed to DBP (0.5 to 500 mg/kg/day) during late gestation showed dose-dependent alterations in reproductive development, causing reduction in anogenital distance, increase in nipple number, reduction in epididimal weight, besides malformations in the testis and epididymis, and hypospadias at the highest doses. In addition, gestational exposure to DBP can reduce male fertility by decreasing testicular and epididimal sperm counts [13,14].

Another consequence of phthalate toxicity is a reduction in testosterone synthesis during the fetal period and, sometimes, in adult life [10, 15,16]. According to Giribabu *et al.* [16], rats exposed to 100 and 500 mg/kg/day of DBP during gestation present a reduction in serum testosterone levels due to an alteration in steroidogenic enzyme expression 3 β -HSD and 17 β -HSD. This reduction was also accompanied by impaired fertility, since the animals had decreased sperm count and motility [16]. Due to these results, the authors classify DBP and other phthalates as anti-androgenic compounds [10,17]. At the same time, other studies have demonstrated the estrogenic activity of phthalates, which are capable of binding to estrogen receptors (ER) [18,19]. Despite the anti-androgenic classification of phthalates, *in utero* exposure of rats to 100 mg/kg/day of DBP from gestational day 12 to postnatal day 21 altered neither testosterone levels in adult rats nor sperm counts in the testis and epididymis, sperm morphology and motility [12].

The vast majority of experimental studies focusing on the action of phthalates on reproductive organs have been performed on classical rodents such as the mouse [16, 20-22] and the rat [7,10-17]. It is therefore relevant to expand our knowledge of the reproductive

effects of phthalates on other rodents, such as the Mongolian gerbil. Mongolian gerbils were introduced into the Americas as a new experimental proposal in the 1950s [23] and since then they have been increasingly used in different areas of biomedical research. In our own laboratory, the gerbil has been chosen as a very useful rodent for evaluation of the prostate response, particularly because of the fact that the high frequency of the prostatic gland in the females, in comparison with other classical rodents, makes it possible to compare the prostatic response between the sexes. We therefore examined the response of the prostatic gland of the gerbil to different agents such as hormones, endocrine disruptors and dietary components [24-28]. However, the testicular response of the gerbil to phthalates is largely unknown. Experimental and epidemiological studies indicate that a variety of EDCs, including phthalates, inappropriately regulate lipid metabolism, promoting adipogenesis and obesity [29,30]. Evidence has shown that the lipid metabolism of Mongolian gerbil in response to dietary lipid components is more similar to that of the human than that of other rodents, such as the rat [31]. Thus, the gerbil may be considered to be a more suitable model for the evaluation of agents that may affect the lipid metabolism in terms of comparison with the human species.

Most of the studies found in the literature make use of corn oil as the diluent vehicle of the liposoluble compounds to be tested, such as DBP, when administered via gavage [4,11,16, 32,33]. Recent data obtained in our laboratory have shown that small amount of corn oil, such as that used to administration of liposoluble agents, may alter sexual steroids and reproductive physiology of the Mongolian gerbil. Corn oil can play a major role in the human diet, since it provides essential fatty acids and vitamin E, besides being a source rich in polyunsaturated fats, such as omega-6 [34] and phytosterols [35]. Then, the intake of corn oil by pregnant gerbils can potentially alter the development of the reproductive organs. Additionally, considering the composition of corn oil, it is relevant to examine whether this vehicle can interfere in the phthalate effects. Thus, the aim of the present study was to investigate whether gestational exposure of pregnant gerbils to di-n-butyl phthalate impacts on the sperm parameters, lipid metabolism, testicular steroidogenesis and oxidative stress markers of adult male offspring. In addition, we evaluated the consequences of corn oil administration to pregnant gerbils on these parameters and the possible interference on di-n-butyl phthalate effects.

2 Material and Methods

2.1 Animals and experimental design

Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) were maintained in the Animal Breeding Center of São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE, São José do Rio Preto, Brazil) in polyethylene cages with shaving substrate, under controlled light (12-hour light/dark cycle) and temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) conditions. Gerbils had free access to food and water. The experimental procedures were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Institute (093/2014 CEUA / UNESP).

In order to obtain the gerbils from different experimental groups, thirty-six families were formed using one male gerbil at 14 weeks of age and one female at 12 weeks of age. The age of the females for family formation was chosen based on the studies of Marston and Chang [36] and the age of the male was based on a study of spermatic reserve that shows that full sexual maturation only occurs after 12 weeks of age [37]. Day 0 of pregnancy was confirmed by vaginal swabs. Afterwards, the families were randomly divided into three groups according to the treatment of the pregnant females. The treatment occurred by gavage (via oral), from gestational day 8 to 23. This period was chosen because gerbil implantation occurs on gestational day 8 and the gestation lasts from 24 to 26 days [38]. The number of pups per littermate varied between 6 and 8 and, at weaning, only one male per litter was chosen and placed in individual cages until the end of the experiment. Thus, three groups of adult male gerbils (16 week old) were used in this study ($n=12$ animals per group): Control group (C) – control animals, born from intact mothers, without any treatment; Oil group (O) – animals exposed during gestation to 0.1 mL/day of commercial corn oil (Cargil, Brazil); Phthalate group (Ph) – animals exposed during gestation to 0.1 mL/day of corn oil containing 100 mg/kg of DBP (Sigma-Aldrich, 524980, MO, USA). The dose of 100 mg/kg/day of DBP is the lowest dose at which adverse effects begin to occur in the reproductive system of male rats (LOAEL) [7].

The male gerbils were weighed and euthanized by CO_2 inhalation, followed by decapitation for blood collection. Euthanasia was performed between 7:30 and 11:00 a.m. The weights of the testes and epididymis were measured, and the gonadosomatic index (GSI) was determined based on the formula $[(\text{testicular weight}/\text{body weight}) \times 100]$.

2.2 Metabolic characterization

The body weights of offspring at weaning (5 weeks old) and in adulthood (16 weeks old) were determined and the adiposity index was estimated by the formula [(sum of epididymal, retroperitoneal and visceral fat/body weight) x 100], according to Taylor and Phillips [39]. The glucose concentrations were determined at the end of the experiment with the Accu-Chek Active monitor (Roche Diagnostics, Switzerland), from blood drops taken from the cervical region.

The lipid profile was evaluated by colorimetric-enzymatic tests to assess total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), non-HDL and triglycerides levels (In vitro Diagnóstica Ltda, MG, Brazil). The test was realized in serum samples, after blood centrifugation (1,200g, 20 min). Each sample was evaluated in triplicate in a Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The triglycerides/HDL ratio was calculated as a predictor of insulin resistance, as proposed by Fan *et al.* [40].

2.3 Sperm counts

Spermatids resistant to homogenization (stages 13, 14 and 15 of spermiogenesis) [41] and spermatozoa present in the caput/corpus and cauda of the epididymis were estimated as described by Robb *et al.* [42], with modifications according to Fernandes *et al.* [43]. After homogenization of the testes and epididymis regions in 0.9% NaCl with 0.5% TritonX100, testicular and epididimal samples were diluted 10x and 20x, respectively. Counts were performed in Neubauer chambers (Laboropitk Ltd, UK). To determine the daily sperm production (DSP), the number of spermatids per testis was divided by 5.81, which is the number of days in which mature spermatids resistant to homogenization are present in the seminiferous epithelium [41]. DSP per gram was calculated in order to determine the efficiency of the spermatogenic process [44,45]. Sperm reserve was obtained by the number of spermatozoa in the cauda of the epididymis multiplied by 2. The sperm transit time through the caput/corpus and cauda of the epididymis was obtained by dividing the number of spermatozoa present in each of these regions by the DSP [46].

2.4 Sperm motility

Estimation of sperm motility was performed immediately after euthanasia, using the cauda of the epididymis. Sperm was obtained through perforations made with the aid of a needle in 1.0 mL of modified HTF medium (Human Tubal Fluid, Irvine Scientific, CA, USA)

at 34 °C. A Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Israel) warmed to 34 °C was loaded with 10 µL of sperm solution. The evaluation of sperm motility was assessed by visual estimation (100 spermatozoa per animal, in duplicate) under a phase-contrast microscope (Olympus BX60, Olympus Corporation, Japan) at 200x magnification. Spermatozoa were classified as motile with progressive movement, motile without progressive movement and immotile [47].

2.5 Histological alterations and apoptosis index

The testes were removed and fixed in Bouin's fluid for 12h. Fragments were washed several times in 70% alcohol, processed for inclusion in Paraplast (Merck, Germany) in a TP1020 processor (Leica Microsystems Brazil, China) and used for general histological analysis.

Histological sections stained with Hematoxylin-Eosin (HE) were used for the general histological analysis. The entire histological section from each testis fragment was examined, and the number of seminiferous tubules affected by some type of histopathological alteration was counted and expressed as a percentage of the total number of seminiferous tubules of the section. Two histological sections of two distinct fragments per animal were evaluated in five animals per group.

Apoptotic cells were detected using the DNA fragmentation assay associated with cell death, based on the TUNEL reaction, according to the kit instructions (ApopTag Plus in situ, Apoptosis Detection Kit, Millipore, 57101, CA, USA). Briefly, after digestion with proteinase K (#JA 1477, Calbiochem, Germany), the histological sections were submitted to procedures designed to inactivate endogenous peroxidase (3% H₂O₂ in PBS, 5 min), and then incubated with the enzyme deoxynucleotidyl terminal transferase (TdT) for 40 minutes at 37 °C. At the end of the reaction, the sections were incubated with peroxidase, revealed with diaminobenzidine (DAB) and counterstained with Harris' Hematoxylin. The estimation of the apoptosis index was determined by the ratio of the number of apoptotic cells in the entire histological section and the corresponding section area. This analysis was performed in five histological sections of five distinct animals per group.

The images were obtained with a Pike F-505C VC50 camera (Allied Vision Technologies, Germany) attached to an Olympus VS10 Virtual Microscope Slide Scanning System (Olympus Corporation, Japan).

2.6 Protein expression in testicular samples

The protein content of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), liver X receptor α (LXR α), androgen receptor (AR) and estrogen receptor α (ER α) were quantified in testis samples by Western blotting. Total extracts were obtained from 100 mg of tissue fragments, homogenized in RIPA buffer (Sigma, MO, USA) with a cocktail of protease inhibitors (Sigma, MO, USA) and Triton X100. The homogenate was centrifuged at 18,000 g for 20 minutes at 4 °C and the supernatant was stored at -80 °C. The protein dosage was quantified by the Bradford method [48] and 30 μ g of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Italy). Blots were blocked with 5% nonfat dry milk in TBST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.2% Tween-20) for 30 minutes at room temperature, followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibodies, according to Table 1. Thereafter, the membranes were washed in TBST for three 10-min cycles, incubated for 1 h with a specific secondary horseradish peroxidase–conjugate antibody (Table 1) at room temperature, and washed in TBST for three 10-min cycles once more. Protein expression was normalized to the β -actin values (Table 1). Antibody detection was revealed using the ECL chemiluminescent detection kit (GE Healthcare, Italy). The membranes were revealed in G: BOX Chemi XRQ photodocumentator (Syngene Synoptics Ltd, UK) and the band densities were analyzed in a densitometry program - Image J 1.34 (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, MD, USA).

2.7 Testicular TNF α concentration

Testicular fragments were homogenized in lysis buffer (50 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl) with a Protease Inhibitor Cocktail Set I (Cat. No. 539131, Calbiochem-Merck, Germany). The homogenate was centrifuged at 18,000 g for 10 minutes at 4 °C. Supernatant was used for total protein dosage [48] and determining of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor α (TNF α). TNF α was quantified by capture/sandwich ELISA using specific commercial kits from R&D System (DY510, MN, USA), and the results were normalized by concentration of total proteins.

2.8 Hormone levels

After euthanasia, blood samples were centrifuged (1,200 g, 20 min) and the serum obtained was frozen at -80 °C for hormone analyses. Serum testosterone (T) and estradiol (E₂) levels were analyzed in duplicate by capture/sandwich ELISA using specific commercial kits,

according to the instructions of the manufacturer (Testosterone EIA Kit, No. 582701, and Estradiol EIA Kit, No. 582251, Cayman Chemical Company, MI, USA).

Intratesticular hormone concentration was performed after the testes were processed for extraction of steroids, according to Pinto-Fochi *et al.* [49]. Testis fragments were homogenized in PBS and incubated in a tube with diethyl ether for 10 minutes initially at room temperature and subsequently on dry ice. The supernatants were removed and transferred to another tube and stored until complete evaporation of the diethyl ether. The material was suspended in PBS and stored at -80 °C until hormone determining. T and E₂ concentrations were also analyzed in duplicate using ELISA capture/sandwich and specific commercial kits (Testosterone Test System, code 3775-300, Monobind Inc., CA, USA, and Estradiol EIA Kit, No. 582251, Cayman Chemical Company, MI, USA).

The readings were performed in a SpectraMax Plus 384 microplate reader (Molecular Devices, CA, USA).

2.9 Activity of antioxidant enzymes

Testicular and epididimal fragments were weighed and stored at -80 °C. Then, the fragments were homogenized in 1: 4 volume of Tris-HCl buffer (0.2 mM, pH 7.5) with 1mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5M saccharose and 0.15 M KCl, and centrifuged at 10,000 g for 20 minutes at 3 °C. The supernatant was centrifuged once more at 50,000 g for 60 minutes at 1 °C. The new supernatant fraction was collected, aliquoted and used to determine the enzyme activities of Catalase (CAT) [50], Glutathione peroxidase (GPx) [51] and Superoxide dismutase (SOD) by kit, according to the instructions of the manufacturer (Sigma-Aldrich, No. 19160, MO, USA). The total protein content was determined by the Bradford method [48]. Analyses of CAT and GPx were performed in a Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). SOD activity was determined with a Victor TM X3 microplate reader (Perkin ElmerR, MA, USA). The aforementioned analyses were also applied to the hemolysate obtained through blood samples collected, immediately after euthanasia, in polyethylene tubes containing heparin.

2.10 Oxidized biomolecule levels

As oxidation marker, the levels of colored adducts produced by the reaction of oxidized biomolecules with thiobarbituric acid (TBA) [52] were measured in plasma samples and fragments of testis and epididymis. Plasma samples were obtained after centrifugation of the hemolysate (850 g, 10 min). Testicular and epididimal fragments were weighed and

homogenized in 1: 3 volume of Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 8). Following the addition of 300 μ L TBA, the homogenate was incubated at 90 °C for 40 minutes and, subsequently, incubated on ice to stop the reaction. Afterwards, 600 μ L n-butanol was added to the homogenate, which was centrifuged at 2,500 g for 5 minutes. The supernatant was collected and used for oxidized biomolecule determination. Products were detected by spectrophotometry (SpectraMax Plus 384 microplate reader, Molecular Devices, CA, USA), according to Uchiyama and Mihara [53].

2.11 Statistical analysis

Statistical analyses were performed by Statistica 8.0 software (Statsoft. Inc., OK, USA), while the graphics were done using GraphPad Prisma 5.01for Windows (GraphPad Software, CA, USA). First, the data were checked for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Parametric data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test was used. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Effects on metabolic parameters

The intake by pregnant mothers of corn oil alone or containing DBP did not affect the body weight and the adiposity index of the offspring when compared to the offspring of untreated mothers (Table 2). Neither the glucose levels (C: 81.2 ± 3.5 ; O: 78.6 ± 2.9 ; Ph: 84.0 ± 3.0 mg/dL; $p=0.49$) nor the triglyceride/HDL ratio (C: 3.3 ± 0.5 ; O: 3.2 ± 0.5 ; Ph: 4.1 ± 0.6 ; $p=0.59$) were affected. Regarding the lipid profile, the O group showed an increase non-HDL cholesterol serum levels in relation to the C group ($\sim 37\%$; $p=0.53$) (Fig. 1). When the Ph and C groups were compared there was an increase in serum levels of total cholesterol ($\sim 43\%$), non-HDL cholesterol ($\sim 66\%$) and triglycerides ($\sim 90\%$) (Fig. 1).

3.2 Effects on sperm parameters

The gerbils of the O and Ph groups did not show any change in testicular and epididimal weights nor in GSI in relation to the gerbils from the C group (Table 2). There were no alterations in the testicular sperm counts and DSP of the O and Ph groups in relation to those in the C group (Table 3). The sperm reserve was reduced by $\sim 21\%$ in the O group and $\sim 68\%$ in the Ph group in relation to the control animals, since the number of spermatozoa

in the caput/corpus of the epididymis was reduced in the Ph group and the number in the cauda of the epididymis was decreased in the O and Ph groups (Table 3). The sperm transit time through the epididymis was not altered in the Ph group, however, it decreased by about 16% in the O group when compared to the C group (Table 3).

DBP exposure during gestation had a negative effect on sperm motility, with a reduction in the rate of spermatozoa with progressive movement and an increase in the rate of spermatozoa without progressive movement and immotile spermatozoa in relation to the animals of the C and O groups (Fig. 2). In the O group there was also an increase in the rate of spermatozoa without progressive movement when compared to the C group (Fig. 2).

3.3 Effects on testis histology, apoptosis and expression of nuclear receptors

Histopathological analysis did not indicate tissue lesions in the testis of the animals of both groups, except for an increase in the number of seminiferous tubules presenting premature detachment of the germinative epithelium in the O group in relation to the C group (Fig. 3). Four out of five animals evaluated per group showed premature cell detachment in both O and Ph groups (C: 0 ± 0 ; O: 1.42 ± 0.46 ; Ph: $0.72 \pm 0.38\%$ of the total tissue section area).

The relative density of apoptotic cells in the testis did not change in the O group, but increased by about 48% in the animals exposed to DBP in comparison to the C animals (Fig. 4).

Testicular expression of the nuclear receptors PPAR γ , LXR α and AR did not vary in the O and Ph groups (Fig. 5A, B, C). On the other hand, ER α content in the testis was approximately 78% higher in the O group when compared to the C group (Fig. 5D). ER α expression did not vary in the Ph group when compared with the control group (Fig. 5D).

No differences were observed in testicular concentrations of TNF α among the groups (C: 4.54 ± 0.18 ; O: 5.23 ± 0.29 ; Ph: $4.89 \pm 0.46 \times 10^{-8}$ pg/mL; $p=0.34$).

3.4 Effects on sexual steroids

No alterations were observed in serum and intratesticular T levels among the groups (Fig. 6A, B). When compared to the C group, serum levels of E $_2$ increased by about 52% and 54% in the O and Ph groups, respectively (Fig. 6C). Intratesticular E $_2$ levels were approximately 86% higher in the Ph group in relation to the C and O groups (Fig. 6D).

3.5 Effects on oxidative stress markers

In relation to the activity of the antioxidant enzymes, CAT and SOD activity was higher in the blood of the O and Ph animals when compared to the animals of the C group (Fig. 7A, G), while GPx activity was unchanged among the groups (Fig. 7D). In the testis, the antioxidant activity of CAT was lower in the O group than in the C group (Fig. 7B), and no changes were observed in GPx and SOD activity among the groups (Fig. 7E, H). In the epididymis, there was no change in the activity of CAT, GPx and SOD enzymes in both O and Ph groups (Fig. 7C, F, I).

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay demonstrated that there was an increase by about 80% in plasmatic oxidized biomolecule levels of the Ph animals in comparison to the C animals (Fig. 7J). No changes were observed in the levels of testicular oxidized biomolecules among the groups (Fig. 7K). However, there was a reduction of approximately 46% in epididymal oxidized biomolecule levels in the Ph group compared to the O group (Fig. 7L).

4 Discussion

The present study with gerbils demonstrated that the maternal intake of a small amount of corn oil (100 μ l/day), a vehicle widely used for the dilution of liposoluble agents, led to persistent alterations in the sex steroid metabolism, causing an increase in both circulating estradiol and the content of ER α in the testis of the male offspring at adulthood and a reduction in the sperm reserve. It was also demonstrated that gestational exposure to 100 mg/kg/day of DBP in the same volume of corn oil further reduced the sperm reserve and impaired sperm motility of the adult offspring. The alterations caused by DBP were associated with perturbations in the intratesticular synthesis of estradiol and systemic alterations in the lipid metabolism.

Effects on adiposity and the lipid metabolism

DBP and other EDCs are known to act as obesogenic agents, promoting obesity by altering the lipid metabolism and adipogenesis process [29]. In the present study, it was verified that the animals exposed to DBP were dyslipidemic, presenting higher levels of serum triglycerides, total cholesterol and non-HDL cholesterol. Thus, gestational exposure to DBP causes dyslipidemia in gerbils in adulthood. Mice exposed *in utero* to the diethylstilbestrol (DES) deregulator also showed higher serum triglyceride levels, as well as leptin and interleukin 6 (IL-6) at two months of age, even before they become overweight and obese [3]. These animals presented higher adiposity and obesity from the third month of life,

suggesting that high levels of triglycerides, leptin and IL-6 would be important early markers of the metabolic syndrome [3]. In comparison with mice exposed during gestation to DES [3], the data obtained here for the gerbil, after DBP exposure, also reveal alterations in total cholesterol and non-HDL cholesterol. Experimental feeding of gerbils with a high-fat diet for two weeks showed that gerbils exhibit a higher susceptibility to hypercholesterolemia than other rodents, which is related to the stable expression of sterol regulatory element binding protein (SREBP)-2 in the liver [54]. These findings may explain the hypercholesterolemia detected in the present study for gerbils after DBP exposure and not for other rodents [3].

It should be noted that isolated exposure to corn oil also marginally altered non-HDL cholesterol levels, which were ~ 63% higher in the O group than in the C group ($p = 0.053$). Clinical and experimental studies have implicated this plant oil, as well as corn fiber oil, in the regulation of serum cholesterol levels of adult individuals [35,55,56]. A study by Poveda *et al.* [57] demonstrated that the consumption of 0.2 mL/day of corn oil by female Wistar rats for two weeks enhanced the serum HDL cholesterol levels. The authors suggest that the high concentration of tocopherols, a vitamin E constituent present in corn oil, may improve the lipid profile and increased HDL cholesterol levels [57]. It is known that fatty acids in the maternal circulation can be transported through the placenta and captured by the liver of the fetus, being subsequently esterified and released as triglycerides in the circulation [58]. In postnatal life, the lipid metabolism and, consequently, the profile of circulating lipids is largely determined by hepatic function [59]. Other studies indicate that the offspring of mice fed a high-fat diet during gestation have impaired hepatic function in adulthood [60]. Our results corroborate the data of Gregorio *et al.* [60], indicating that, despite not affecting adiposity in early adulthood, the consumption of a small amount of corn oil during pregnancy may interfere with the lipid metabolism of the offspring in a different manner from that occur in our own consumption, increasing cholesterol levels [57]. It was not the aim of this study to evaluate the mechanisms by which corn oil and DBP impairs the lipid metabolism, which would require other analyses of the liver and adipose tissue, which were not predicted in this study. However, it is known from the literature that phthalates can act in the induction of metabolic syndrome by interfering with the signaling of LXR α , PPAR γ and ER α [22, 61-63]. Our data suggest that ingestion of the corn oil diluent vehicle interferes with the lipid metabolism, especially of cholesterol, and DBP potentiates these disorders, increasing serum triglycerides levels, demonstrating an additive or synergistic effect of the two compounds. It has been hypothesized that oils containing high levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids,

such as canola and fish oil, could counteract some of the adverse effects induced by phthalates.

Effects on sexual hormones

Disorders caused by EDCs in critical periods of development, such as the fetal period, may be transitory or affect the homeostatic mechanisms of the endocrine system permanently [1-5]. We found that gestational exposure of gerbils to 100 mg/kg/day of DBP increases the serum and intratesticular estradiol levels. However, these changes occur without impacting the serum and intratesticular levels of testosterone. It is known that intrauterine exposure of other rodents to phthalates reduces testosterone synthesis during the fetal period [15,64,65], leading to reproductive damage that persists up to adulthood [15,66]. However, Giribaru *et al.* [16] observed that rats exposed during gestation to the same DBP dose used here exhibited a decrease in serum testosterone levels in adulthood. Therefore, in comparison with other rodents, the gerbil appears to be less susceptible to DBP effects regarding the regulation of circulating testosterone, being the main impact in circulating and intratesticular estradiol levels. The aromatase enzyme is responsible for the conversion of testosterone and androstenedione to estradiol and estrone, respectively [67]. Thus, it is possible that gestational exposure to DBP may have induced the overexpression and increased aromatase enzyme activity by testicular cells, culminating in higher estradiol levels.

Comparing the hormonal changes of the gerbils exposed to DBP with offspring from mothers that ingested only corn oil, higher circulating estradiol levels were observed without alterations in intratesticular levels of this hormone. Pearlman [68] introduced the concept that the plasma level of a steroid was related to its production rate divided by its metabolism rate. This relationship is designated as the metabolic clearance rate [69], and it has proved to be a powerful tool in the study of steroid physiology. Higher estradiol serum levels in the O group may be due to alterations in the metabolic clearance rate, caused by reduction in hepatic metabolism of steroids, or damage in the mechanism of blood transport and cell entrance. It should be noted that, although the pregnant females were treated with a small amount of corn oil (100µl/day), it corresponds to about 0.83 mg of phytosterols, which can result in an effective physiological response in hormone-regulated organs, such as the liver and the reproductive organs. In conclusion, these data indicate that maternal corn oil alters the systemic metabolism of estradiol in adulthood.

Testicular effects and sperm parameter alterations

Studies have shown that exposure to phthalates, such as DBP and DEHP and their monoesters, increases the expression of PPAR in the testis, culminating in damage to the male reproductive system [70]. Ryu *et al.* [71] treated prepuberal rats at 750 mg/kg/day of DBP for 30 days and observed a significant increase in PPAR γ levels in the testis. Testicular PPAR γ content was unchanged in the gerbils showing that the present *in utero* exposure to DBP did not affect the expression of this receptor. We also found no alterations in the LXR α , AR or ER α contents after DBP exposure. Increases in germ-cell apoptosis are often observed after exposing experimental animals to various testicular toxicants [72,73]. In this study, gestational exposure to DBP increased by about 48% the relative density of apoptotic cells in the testis. LXR α and PPAR γ had been implicated in increased rates of cell death. LXR α -deficient mice present an increased apoptosis of the germ cells [74]. Ryu *et al.* [71] demonstrated that PPAR γ might mediate DEHP-induced apoptosis in testicular cells. However, the increase in apoptosis in the testis of the gerbils exposed to DBP was not related to alteration in PPAR γ and LXR α expression. Higher intratesticular estradiol concentration may be responsible for apoptosis-induction in the testis [75].

Among other adverse effects of DBP exposure are decreases in the weight of the epididymis, testis and accessory sex glands [76-78]. Gerbils exposed to 100 mg/kg/day of DBP during gestation did not present alterations in testis and epididymis weights and in GSI, as well as other abnormalities in the reproductive system. DSP was unchanged either, but decreased sperm concentration in the epididymis and markedly impaired sperm motility. Considering that motility is one of the most important sperm parameters used for evaluation of semen quality [79,80], we can conclude that high doses of DBP during pregnancy compromised sperm motility and the reproductive function of the gerbil. Giribabu *et al.* [16] verified that prenatal exposure to DBP alters the reproductive function of Wistar rats by reducing sperm concentration and motility.

The acquisition of sperm motility is dependent on the presence of androgens [81] and of an adequate process of sperm maturation in the epididymis [82,83]. Although estradiol is also essential for male fertility [84,85], high estrogen levels are detrimental to epididymal function. A study by Goyal *et al.* [32] demonstrated that the administration of low doses (≥ 8 μ g/day) of DES, an estrogenic compound, to adult rats for 12 days reduced the epididymal weight and the sperm concentration in this organ, and impaired sperm motility without altering daily sperm production, providing relevant data for studying the role of estrogens in the function of the epididymis. In addition, regulation of the amount of cholesterol in the sperm plasma membrane during maturation is determinant for sperm motility [86]. Our data

revealed no variations in circulating and intratesticular testosterone levels in the animals exposed to DBP, however serum and intratesticular levels of estradiol were higher in these animals, as well as total and non-HDL cholesterol and triglyceride levels, which may be improperly modulating the process of sperm maturation.

Regarding the reproductive alterations caused by the corn oil, we verified that gestational exposure to this plant oil increased the rate of seminiferous tubules presenting premature detachment of germ cell. Reame *et al.* [87] suggest, in their study of obesity induction in Wistar rats fed a high-fat diet, that the increase in the number of tubules with immature germ cell detachment was due to the reduction in serum testosterone levels. As already reported, these levels were unchanged in the animals exposed to corn oil, but we observed higher serum estradiol levels. In this group, a higher testicular expression of ER α was also observed, even without presenting higher intratesticular estradiol levels. It is known that spermatogenesis is dependent on steroid hormones, and alterations in testosterone and estradiol levels, especially high estrogen levels, result in impairments to male fertility [85-88]. The animals exposed to corn oil alone also presented a reduction in the sperm reserve and an increase in the rate of sperm without progressive movement. Moreover, the sperm transit time through the epididymis was reduced in this group. These results demonstrate that gestational exposure to corn oil also compromised the sperm quantity and quality and caused alterations in testicular histology and ER α content. Since these animals were found to have high levels of non-HDL cholesterol, the mechanisms involved in these reproductive disorders are probably related to the high levels of circulating cholesterol and estradiol.

Effects on oxidative stress markers

Some effects of environmental contaminants are caused by the generation of reactive oxygen species (ROS) in both intra- and extracellular spaces of cells, leading to cell death and tissue injury [89,90]. Oxidative stress is known to be a major factor regulating the vitality and functionality of mammalian spermatozoa *in vitro* [91]. Sperm plasma membrane, being rich in polyunsaturated fatty acids, is highly susceptible to ROS attack and, consequently, to peroxidation of lipid bilayers [92]. Zhou *et al.* [92] revealed a dose-dependent epididymal toxicity of DBP, demonstrating that exposure to graded doses of DBP disrupts the epididymal structure and function by impacting the antioxidant enzyme activity (GPx and SOD) and increasing lipid peroxidation, thereby causing oxidative stress in the epididymis of the rats exposed to this phthalate (500 mg/kg/day) for two weeks in adulthood. However, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation were unchanged at 100

mg/kg/day of DBP [33]. The marker most frequently used to indicate the level of lipid peroxidation or oxidized biomolecules is malondialdehyde (MDA) [93,94], which can be determined by many different techniques [95]. MDA can interfere in protein biosynthesis by forming adducts with DNA, RNA and protein [96]. Our data indicated that there was no change in CAT, GPx and SOD activities, and the levels of oxidized biomolecules were, unexpectedly, lower in the epididymis of the animals exposed to DBP during gestation. These results suggested that *in utero* exposure to 100 mg/kg/day of DBP was not a high enough dose to impact the mechanisms involved in oxidative stress regulation in this organ. Thus, it is probable that the sperm motility damage observed in this study was not caused by these mechanisms.

Data regarding the oxidative stress markers in the testis did not reveal any alterations in the antioxidant enzyme and TBARS levels of the animals in the Ph group. On the other hand, blood CAT and SOD activities were higher both in animals exposed to DBP and in animals exposed to corn oil, while plasmatic TBARS levels increased only in those gerbils exposed to DBP. These data show that gestational exposure to 100 mg/kg/day of DBP augmented oxidative stress in the blood, even with the increase of the antioxidant response observed. The results confirm the importance of blood evaluation, which acts in the protection of lesions in the organs and also reflects the systemic condition of the organism.

A particularly relevant finding of this study concerns the use of corn oil as a vehicle. As verified throughout the study, most of the effects of gestational exposure to DBP are observed when compared to the control group. Corn oil is one of the major diluent vehicles of liposoluble substances to be administered in animal models orally [4,11,16,32,33,76]. Our results indicate that daily intake of corn oil by pregnant females can cause metabolic alterations in the offspring. In addition, it can result in damage to steroidogenesis, altering the profile of sexual steroids, and compromise semen quantity and quality. As mentioned above, changes in sperm parameters were not due to the reduction in DSP, but probably as a result of problems in epididymal function. These data indicate that the use of this agent as a vehicle for the administration of oral substances is not adequate in studies on the reproductive system or metabolic parameters. This is a cause for concern, which needs a lot of attention and better investigation, since the real effects of the drug tested may be being camouflaged by corn oil.

5 Conclusion

In conclusion, maternal intake of corn oil, a widely used diluent vehicle, led to alterations in the lipid metabolism and circulating estradiol levels, increasing testicular ER α

expression and reducing sperm quantity and quality of the gerbil in adulthood. Our results also indicate that gestational exposure to DBP causes perturbations in the lipid metabolism and in the intratesticular synthesis of estradiol of the gerbil, with resulting damage to the sperm parameters. These findings provide important data about DBP exposure in other mammalian species, and point to an important issue regarding the use of corn oil as a diluent vehicle.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest

Acknowledgements: The authors are gratefully to Mr Luiz Roberto Faleiros Júnior for the technical assistance, and to Prof Peter James Harris for the English-language revision of this paper.

Funding: This work was supported by São Paulo State Research Foundation - FAPESP [Grant to Rejane Maira Góes: 2013/16368-7, and doctoral fellowship to Ana Carolina Negrin: 2014/04146-2] and by National Counsel of Technological and Scientific Development - CNPq [Grant to Rejane Maira Góes: 308367/2014-6].

6 References

- [1] World Health Organization - WHO. *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/. (accessed 8 February 2018).
- [2] Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB. 2004. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia* 36(6): 337-345. doi: 10.1111/j.1439-0272.2004.00641.x.
- [3] Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN. 2007. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod Toxicol* 23(3): 290-296. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.12.010.
- [4] Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR *et al.* 2010. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl* 33: 279-287. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.01005.x.

- [5] Stel J, Legler J. 2015. The role of epigenetics in the latent effects of early life exposure to obesogenic endocrine disrupting chemicals. *Endocrinology* 156(10): 3466-3472. doi: 10.1210/en.2015-1434.
- [6] Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, Needham LL, Pirkle JL, Sampson EJ *et al.* 2000. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* 108 (10): 970-982.
- [7] Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PMD. 2000. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci* 55(1): 143–151. doi: 10.1093/toxsci/55.1.143.
- [8] Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. 1996. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* 26(4): 365-481. doi: 10.3109/10408449609048302.
- [9] Thomas JA, Thomas MJ. 1984. Biological effects of di-(2-ethyl-hexyl) phthalate and other phthalic acid esters. *Crit Rev Toxicol* 13: 283–317. doi: 10.3109/10408448409023761.
- [10] Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, Foster PM. 1999. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 156(2): 81–95. doi: 10.1006/taap.1999.8643.
- [11] Carruthers CM, Foster PMD. 2005. Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate. *Birth Defects Res B* 74(3): 277–285. doi: 10.1002/bdrb.20050.
- [12] Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Pinheiro PFF, Domeniconi RF, Felisbino SL *et al.* 2010. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J Toxicol Environ Health* 73: 972-984. doi: 10.1080/15287391003751760.
- [13] Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE. 1997. Reproductive toxicity of di-n-butyl phthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspec* 105(1): 102–107. doi: 10.1289/ehp.97105102.
- [14] Zhang Y, Jiang X, Chen B. 2004. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague- Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate *in utero* and during lactation and determination of its NOAEL. *Reprod Toxicol* 18(5): 669-76. doi: 10.1016/j.reprotox.2004.04.009.
- [15] Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE. 2000. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal

- testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 58(2): 339-349. doi: 10.1093/toxsci/58.2.339.
- [16] Giribabu N, Sainath SB, Reddy PS. 2012. Prenatal di-n-butyl phthalate exposure alters reproductive functions at adulthood in male rats. *Environ Toxicol* 29(5): 534-544. doi: 10.1002/tox.21779.
- [17] Ema M. 2002. Antiandrogenic effects of dibutyl phthalate and its metabolite, monobutyl phthalate, in rats. *Congenit Anom* 42(4): 297-308. doi: 10.1111/j.1741-4520.2002.tb00896.x.
- [18] Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspec* 103(6): 582-587. doi: 10.2307/3432434.
- [19] Filipiak E, Walczak-Jedrzejowska R, Krupinski M, Oszukowsha E, Marchlewska K, Dlugonski J *et al.* 2011. Di(n-butyl) phthalate has no effect on the rat prepubertal testis despite its estrogenic activity *in vitro*. *Folia Histochem Cytobiol* 49(4): 685-689. doi: 10.5603/FHC.2011.0092.
- [20] Gaido KW, Hensley JB, Wallace DG, Borghoff S, Johnson KJ, Hall SJ, Boekelheide K. 2007. Fetal mouse phthalate exposure shows that gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 97(2): 491-503. doi: 10.1093/toxsci/kfm049.
- [21] Lehraiki A, Racine C, Krust A, Habert R, Levacher C. 2009. Phthalates impair germ cell number in the mouse fetal testis by an androgen- and estrogen-independent mechanism. *Toxicol Sci* 111(2): 372-382. doi: 10.1093/toxsci/kfp153.
- [22] Muczynsky V, Cravedi JP, Lehraiki A, Moisin D, Lecureuil C, Messiaen S *et al.* 2012. Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: *In vitro* and *in vivo* approaches. *Toxicol Appl Pharmacol* 261(1): 97-104. doi: 10.1016/j.taap.2012.03.016.
- [23] Robinson DG. 1974. The anatomy of the Mongolian gerbil. *Publishe's Foreword, USA*.
- [24] de Jesus MM, Negrin AC, Taboga SR, Pinto-Fochi ME, Góes RM. 2015. Histopathological alterations in the prostates of Mongolian gerbils exposed to a high-fat diet and di-n-butyl phthalate individually or in combination. *Reprod Toxicol* 52: 26-39. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.02.005.
- [25] Antoniassi JQ, Fochi RA, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2017. Corticosterone influences gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostatic morphophysiology and alters its proliferation and apoptosis rates. *Int J Exp Pathol* 98(3): 134-146. doi: 10.1111/iep.12232.
- [26] Colleta SJ, Antoniassi JQ, Zanatelli M, Santos FC, Góes RM, Vilamaior PS, Taboga SR. 2017. Acute exposure to bisphenol A and cadmium causes changes in the morphology of

gerbil ventral prostates and promotes alterations in androgen-dependent proliferation and cell death. *Environ Toxicol* 32(1): 48-61. doi: 10.1002/tox.22211.

[27] Perez AP, Biancardi MF, Caires CR, Falleiros LR Jr, Góes RM, Santos FC, Taboga SR. 2017. Pubertal exposure to ethinylestradiol promotes different effects on the morphology of the prostate of the male and female gerbil during aging. *Environ Toxicol* 32(2): 477-489. doi: 10.1002/tox.22252.

[28] Facina CH, Campos SGP, Gonçalves BF, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR. 2018. Long-term oral exposure to safe dose of bisphenol A in association with high-fat diet stimulate the prostatic lesions in a rodent model for prostate cancer. *Prostate* 78(2): 152-163. doi: 10.1002/pros.23458.

[29] Grün F, Blumberg B. 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147: 50–55. doi: 10.1210/en.2005-1129.

[30] Lubrano C, Genovesi G, Specchia P, Costantini D, Mariani S, Petrangeli E *et al.* 2013. Obesity and metabolic comorbidities: environmental diseases? *Oxid Med Cell Longev* 640673. doi: 10.1155/2013/640673.

[31] Ying HZ, Yu C, Wang Z, Yu B, Zang JN, Liu Y. 2012. Characterization and mechanisms of lipid metabolism in high-fat diet induced hyperlipidemia in Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Afr J Biotechnol* 11(97): 16347-16352. doi: 10.5897/AJB12.336.

[32] Goyal HO, Braden TD, Mansour M, Williams CS, Kamaleldin A, Srisvastava KK. 2001. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol Reprod* 64(3): 927–934. doi: 10.1095/biolreprod64.3.927.

[33] Zhou D, Wang H, Zhang J. 2011. Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative stress in epididymis of adult rats. *Toxicol Ind Health* 27(1): 65-71. doi: 10.1177/0748233710381895.

[34] Rodrigues JN, Gioiella LA, Anton C. 2003. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Res Int* 36: 149-159. doi: 10.1016/S0963-9969(02)00130-8.

[35] Ostlund RE Jr, Racette SB, Okeke A, Stenson WF. 2002. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 75(6): 1000-4.

[36] Marston JH, Chang MC. 1965. The breeding, management and reproductive physiology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Care* 15: 34-48.

- [37] Pinto-Fochi ME, Negrin AC, Scarano WR, Taboga SR, Góes RM. 2016. Sperm parameters and sexual maturation of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Reprod Fertil Dev* 28(6): 815–823. doi: 10.1071/RD14074 .
- [38] Norris ML, Adams CE. 1981. Mating post-partum and length of gestation in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim* 15(2): 189-191. doi: 10.1258/002367781780958883.
- [39] Taylor BA, Phillips SJ. 1996. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 34(3): 389-398. doi: 10.1006/geno.1996.0302.
- [40] Fan X, Liu EY, Hoffman VP, Potts AJ, Sharma B, Henderson DC. 2011. Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio: a surrogate to predict insulin resistance and low-density lipoprotein cholesterol particle size in nondiabetic patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 72(6): 806-812. doi: 10.4088/JCP.09m05107yel.
- [41] Segatelli TM, França LR, Pinheiro PFF, Almeida CCD, Martinez M, Martinez FE. 2004. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Androl* 25(6): 872-880. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb03156.x.
- [42] Robb GW, Amann RP, Killian GJ. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54(1): 103-117. doi: 10.1530/jrf.0.0540103.
- [43] Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 23(1): 106-112. doi: 10.1016/j.reprotox.2006.09.002.
- [44] Berndtson WE. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 44: 818-33.
- [45] Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 60-61: 471–80. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00108-1.
- [46] Amann RP, Kavanaugh JF, Griel LC Jr, Voglmayr JK. 1976. Sperm production of holstein bulls determined from testicular spermatid reserves, after cannulation of rete testis or vas deferens, and by daily ejaculation. *J Dairy Sci* 57(1): 93-99. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(74)84836-8.
- [47] Perobelli JE, Martinez MF, Franchi CAS, Fernandez CDB, Camargo JV, Kempinas WG. 2010. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A* 73(13-14): 991-1002. doi: 10.1080/15287391003751802.

- [48] Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [49] Pinto-Fochi ME, Pytlowanciv EZ, Reame V, Rafacho A, Ribeiro DL, Taboga SR, Góes RM. 2016. A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. *Reproduction* 152(6): 795–808. doi: 10.1530/REP-16-0072.
- [50] Beutler E. 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Yale Journal of Biology and Medicine, Grune and Straton; New York.
- [51] Sies H, Koch OR, Martino E, Boveris A. 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett* 103(2): 287-290. doi: 10.1016/0014-5793(79)81346-0.
- [52] Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H *et al.* 2015. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med* 78: 233-235. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504.
- [53] Uchiyama M, Mihara M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86(1): 271-278. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1.
- [54] Li C, Guo H, Dai F, Huo X, Li Z, Zhang S *et al.* 2018. SREBP-2 expression pattern contributes to susceptibility of Mongolian gerbils to hypercholesterolemia. *Mol Med Rep* 17(2): 3288-3296. doi: 10.3892/mmr.2017.8195.
- [55] Ramjiganesh T, Roy S, Freake HC, McIntyre JC, Fernandez ML. 2002. Corn fiber oil lowers plasma cholesterol by altering hepatic cholesterol metabolism and up-regulating LDL receptors in guinea pigs. *J Nutr* 132(3): 335-40. doi: 10.1093/jn/132.3.335.
- [56] Maiki KC, Lawless AL, Kelley KM, Kaden VN, Geiger CJ, Dicklin MR. 2015. Corn oil improves the plasma lipoprotein lipid profile compared with extra-virgin olive oil consumption in men and women with elevated cholesterol: results from a randomized controlled feeding trial. *J Clin Lipidol* 9(1): 49-57. doi: 10.1016/j.jacl.2014.10.006.
- [57] Poveda E, Ayala P, Rodriguez M, Ordóñez E, Baracaldo C, Delgado W, and Guerra M. 2005. Efecto del suplemento de aceites vegetales sobre el perfil lipídico em ratas Wistar. *Biomedica* 25(1): 101-109. doi: 10.7705/issn.0120-4157.
- [58] Schaiff WT, Knapp FF Jr, Barak Y, Biron-Shental T, Nelson DM, Sadovsky Y. 2007. Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor gamma alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice. *Endocrinology* 148(8): 3625-34. doi: 10.1210/en.2007-0211.

- [59] Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. 2014. Maternal obesity, inflammation and developmental programming. *BioMed Res Int* 2014: 418975. doi: 10.1155/2014/418975.
- [60] Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MB. 2010. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 203(5): 495.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2010.06.042.
- [61] Chinetti G, Fruchat JC, Staels B. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 49: 497-505. doi: 10.1007/s000110050622.
- [62] Newbold RR. 2010. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones* 9: 206-217. doi: 10.1.1.609.694 .
- [63] Pereira-Fernandes A, Demaegdt H, Vandermeiren K, Hectors TLM, Jorens PG, Blust R *et al.* 2013. Evaluation of a screening system for obesogenic compounds: screening of endocrine disrupting compounds and evaluating of the PPAR dependency of the effects. *PLoS ONE* 8(10): e77481. doi: 10.1371/journal.pone.0077481.
- [64] Lehmann KP1, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW. 2004. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 81(1): 60-8. doi: 10.1093/toxsci/kfh169.
- [65] Lourenço AC, Gomes C, Boareto AC, Mueller RP, Nihi F, Andrade LF *et al.* 2014. Influence of oily vehicles on fetal testis and lipid profile of rats exposed to di-butyl phthalate. *Hum Exp Toxicol* 33(1): 54-63. doi: 10.1177/0960327112474847.
- [66] Mahood IK, Scott HM, Brown R, Hallmark N, Walker M, Sharpe RM. 2007. *In utero* exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environ Health Perspect* 115(1):55-61. doi: 10.1289/ehp.9366.
- [67] Brodie AM. 1985. Aromatase inhibition and its pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol* 34: 3213-3219.
- [68] Pearlman WH. 1957. [16-3H] Progesterone metabolism in advanced pregnancy and in oophorectomized-hysterectomized women. *Biochem J* 67: 1.
- [69] Tait JF. 1963. Review: The use of isotopic steroids for the measurement of production rates *in vivo*. *J Clin Endocrinol* 23: 1285.
- [70] Corton JC, Lampinkas PJ. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci* 83(1): 4-17. doi: 10.1093/toxsci/kfi011.

- [71] Ryu JY, Lee BM, Kacew S, Kim HS. 2007. Identification of differentially expressed genes in the testis of Sprague-Dawley rats treated with di(n-butyl) phthalate. *Toxicol* 234: 103-122. doi: 10.1016/j.tox.2007.02.003.
- [72] Strandgaard C, Miller MG. 1998. Germ cell apoptosis in rat testis after administration of 1,3-dinitrobenzene. *Reprod Toxicol* 12 (2): 97-103.
- [73] Richburg JH, Nañes A. 2003. Fas- or FasL-deficient mice display an increased sensitivity to nitrobenzene-induced testicular germ cell apoptosis. *Toxicol Lett* 139(1): 1-10. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00419-8.
- [74] Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B *et al.* 2007. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21(5): 1014–1027. doi: 10.1210/me.2006-0277.
- [75] Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C. 1996. Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of the germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment. *Int J Androl* 19(4): 237-47. doi: 10.1111/j.1365-2605.1996.tb00468.x.
- [76] Moore RW, Rudy TA, Lin T, Ko K, Peterson RE. 2001. Abnormalities of sexual development in male rats with *in utero* and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Persp* 109(3): 229-237. doi: 10.1289/ehp.01109229.
- [77] Fisher JS. 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 127: 305–315. doi: 10.1530/rep.1.00025
- [78] Moody S, Goh H, Bielanowicz A, Rippom P, Loveland KL, Itman C. 2013. Prepuberal mouse testis growth and maturation and androgen production are acutely sensitive to di-n-butyl phthalate. *Endocrinology* 154: 3460-3475. doi: 10.1210/en.2012-2227.
- [79] Brooks DE. 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 36(3): 205-221.
- [80] Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 35(1): 1-10. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.03.005.
- [81] Orgebin-Crist MC, Tichenor PL. 1973. Effect of testosterone on sperm maturation *in vitro*. *Nature* 245: 328-329. doi: 10.1038/245328a0.
- [82] Cornwall GA. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15(2): 213-227. doi: 10.1093/humupd/dmn055.

- [83] Raymond AS, Elder B, Ensslin M, Shur BD. 2010. Loss of SED1/MFG-E8 results in altered luminal physiology in the epididymis. *Mol Reprod Dev* 77(6): 550-563. doi: 10.1002/mrd.21189.
- [84] Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci* 90(23): 11162-11166. doi: 10.1073/pnas.90.23.11162.
- [85] Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FR, Bouraima-Lelong H, Delalande C. 2011. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci* 89(15-16): 584-587. doi: 10.1016/j.lfs.2011.06.004.
- [86] Leahy T, Gadella B.M. 2015. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J Androl* 17: 561-567. doi: 10.4103/1008-682X.153309.
- [87] 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 spermatoc efficiency of Wistar rats at adulthood: correlations with metabolic status. *Biol Reprod* 91(6): 151, 1-10. doi: 10.1095/biolreprod.114.121962.
- [88] Li X, Rahman N. 2008. Impact of androgen/estrogen ratio: lessons learned from the aromatase over-expression mice. *Gen Comp Endocrinol* 159(1): 1–9. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.07.025.
- [89] Arif A, Ahmad Khan H. 2010. Environmental toxins and Parkinson's disease: putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicol Ind Health* 26(2): 121-8. doi: 10.1177/0748233710362382.
- [90] Aly HA, Domènech O, Abdel-Naim AB. 2009. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food Chemical Toxicol* 47(8): 1733-8. doi: 10.1016/j.fct.2009.03.019.
- [91] Aitken RJ, Curry BJ. 2011. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* 14: 367–381.1. doi: 10.1089/ars.2010.3186.
- [92] Zhou D, Wang H, Zhang J, Gao X, Zhao W, Zheng Y. 2010. Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative damage in testes of adult rats. *Syst Biol Reprod Med* 56(6): 413-419. doi: 10.3109/19396368.2010.509902.
- [93] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11(1): 81-128. doi: 10.1016/0891-5849(91)90192-6 .

- [94] Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schimtt G, Garcia SC *et al.* 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quím Nova* 32: 169–174. doi: 10.1590/S0100-40422009000100032.
- [95] Spirlandeli AL, Deminice R, Jordao AA. 2014. Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: effects of acute exercise. *Int J Sports Med* 35(1):14-18. doi: 10.1055/s-0033-1345132.
- [96] Doreswamy K, Shrilatha B, Rajeshkumas T, Muralidhara. 2004. Nickel-induced oxidative stress in testes of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. *J Androl* 25: 996–1003. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb03173.x.

Tables and Figures

Table 1. Description of the antibodies and protocols used in the immunoblotting.

	Primary antibody	Dilution	Secondary antibody	Dilution
Anti-PPAR γ	Abcam (MA, USA) - 209350	1:400	Anti-rabbit	1:4,000
Anti-LXR α	Abcam (MA, USA) - 106464	1:200	Anti-rabbit	1:10,000
Anti-AR	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) - sc-816	1:300	Anti-rabbit	1:3,000
Anti-ER α	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) - sc-8005	1:200	Anti-mouse	1:7,000
Anti- β -actin	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) - sc-47778	1:1000	Anti-mouse	1:10,000

Table 2. Biometric data of the animals from the Control (C), Oil (O) and Phthalate (Ph) groups.

n=12 per group	Experimental groups		
	C	O	Ph
Body weight at 5 th weeks old (g)*	27.8 ± 0.7	24.0 ± 1.4	24.6 ± 1.1
Body weight at 16 th weeks old (g) [#]	70.6 ± 1.0	67.6 ± 1.1	68.8 ± 1.5
Adiposity index (%)*	2.89 ± 0.2	2.48 ± 0.2	2.81 ± 0.2
Testicular weight (mg)*	537.5 ± 12.1	513.9 ± 8.0	524.8 ± 9.7
Gonadosomatic index (%)*	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01	0.76 ± 0.01
Epididimal weight (mg) [#]	199.2 ± 4.1	186.0 ± 4.0	194.2 ± 4.5

Values expressed as median ± SEM.

*ANOVA followed by Tukey's test.

[#]Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test.

Table 3. Testicular and epididymal sperm counts, and sperm transit time through the epididymis of gerbils from the Control (C), Oil (O) and Phthalate (Ph) groups.

n=12 per group	Experimental groups		
	C	O	Ph
Sperm number in the testis ($\times 10^6$)	77.4 $\pm$ 4.1	73.3 $\pm$ 3.7	66.1 $\pm$ 2.4
Sperm number per gram of testis ($\times 10^6$)	146.0 $\pm$ 6.8	145.8 $\pm$ 7.0	130.9 $\pm$ 4.5
DSP ($\times 10^6$)	13.3 $\pm$ 0.7	12.6 $\pm$ 0.6	11.4 $\pm$ 0.3
DSP per gram ($\times 10^6$) ^A	25.1 $\pm$ 1.2	25.1 $\pm$ 1.2	22.5 $\pm$ 0.8
Sperm number in the caput/corpus of the epididymis ($\times 10^6$)	13.8 $\pm$ 0.8	12.0 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 0.5 ^a
Sperm number per gram of caput/corpus of the epididymis ($\times 10^6$)	194.1 $\pm$ 8.8	181.4 $\pm$ 8.9	149.6 $\pm$ 6.2 ^{a,b}
Sperm number in the cauda of the epididymis ($\times 10^6$)	166.3 $\pm$ 7.8	130.6 $\pm$ 5.9 ^c	130.4 $\pm$ 6.7 ^a
Sperm number per gram of cauda of the epididymis ($\times 10^6$)	1266 $\pm$ 42.2	1077 $\pm$ 36.3 ^c	1061 $\pm$ 32.7 ^a
Sperm reserve in the epididymis ($\times 10^6$) ^B	332.6 $\pm$ 15.6	261.3 $\pm$ 11.8 ^c	260.7 $\pm$ 13.3 ^a
Sperm transit time in the epididymis (days)			
Caput/corpus	1.05 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.06
Cauda	12.62 $\pm$ 0.46	10.48 $\pm$ 0.43 ^c	11.46 $\pm$ 0.46
Total	13.67 $\pm$ 1.72	11.70 $\pm$ 1.36 ^c	12.36 $\pm$ 1.67

Values expressed as mean $\pm$ SEM.

The superscripts a, b indicate statistical difference among the groups: a $p < 0.05$ versus C; b $p < 0.05$ versus O (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

^A Spermatogenic efficiency.

^B Value per cauda of the epididymis multiplied by 2.

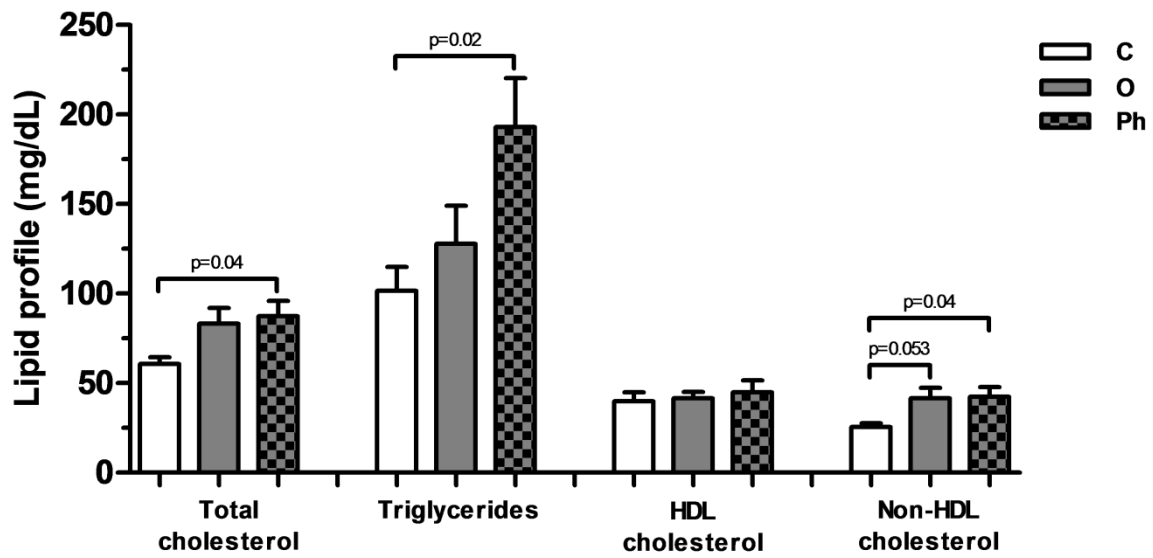


Figure 1. Lipid profile of the gerbils from the Control (C), Oil (O) and Phthalate (Ph) groups. n= 10 animals per group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Values $p < 0.05$ were considered significant (ANOVA test followed by Tukey's test).

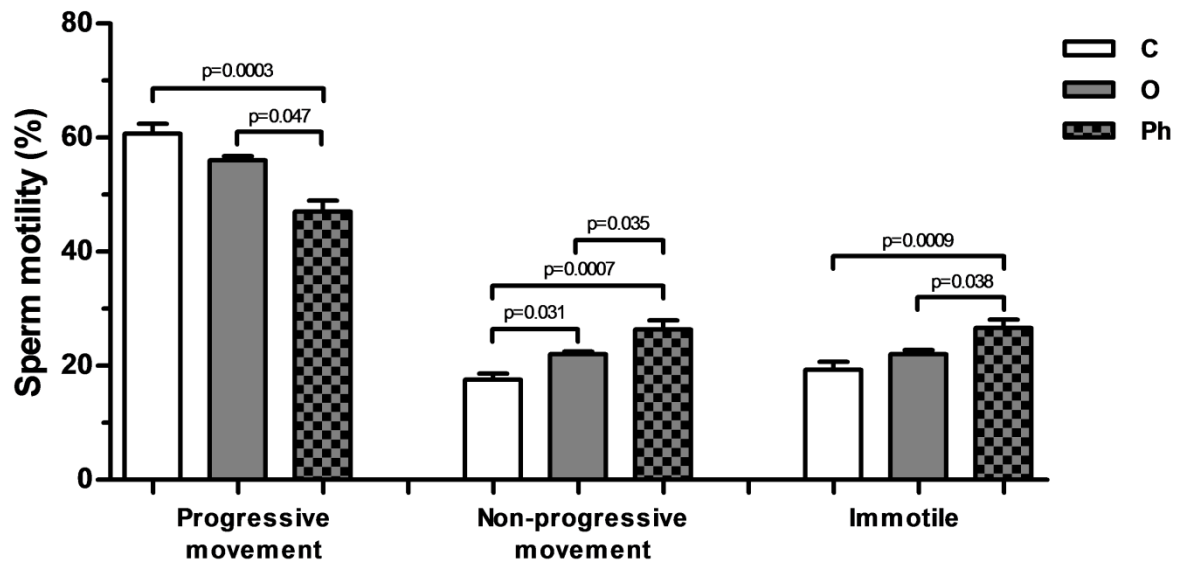


Figure 2. Sperm motility of the animals from the Control (C), Oil (O) and Phthalate (Ph) groups. Sperm were analyzed according to the movement type: progressive movement, non-progressive movement and immotile. $n=10$ animals per group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Values $p<0.05$ were considered significant (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

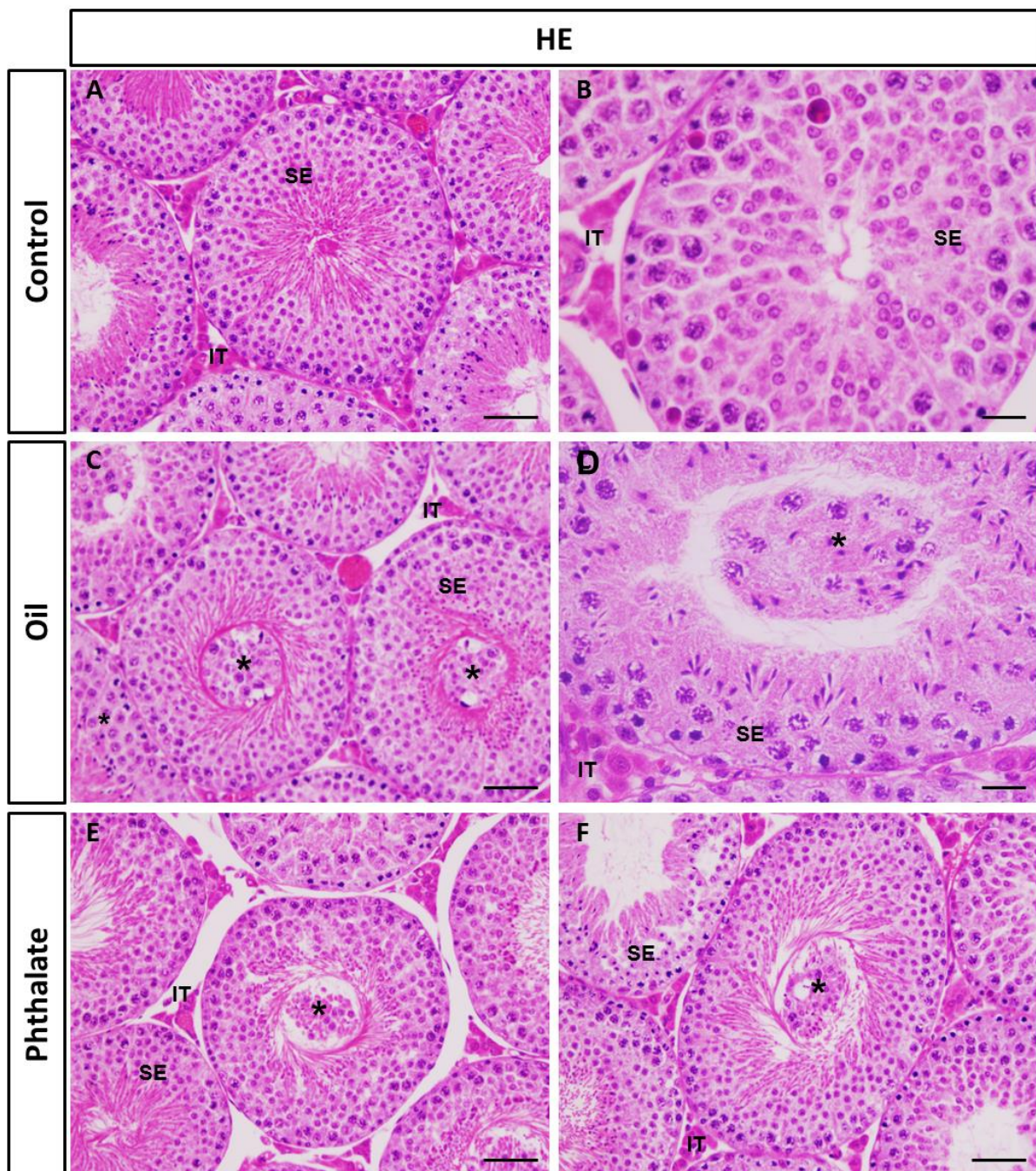


Figure 3. Testicular histological sections from the Control, Oil, and Phthalate groups stained with Hematoxylin-Eosin (HE). **A** and **B** represent testicular sections with normal appearance. **C**, **D**, **E** and **F** present sections containing seminiferous tubules with premature detachment of germ cells (*). Two histological sections of two distinct fragments per animal were evaluated in five animals per group. IT: interstitial tissue; SE: seminiferous epithelium. Bars: 50µm (**A**, **C**, **E** and **F**) and 20µm (**B** and **D**).

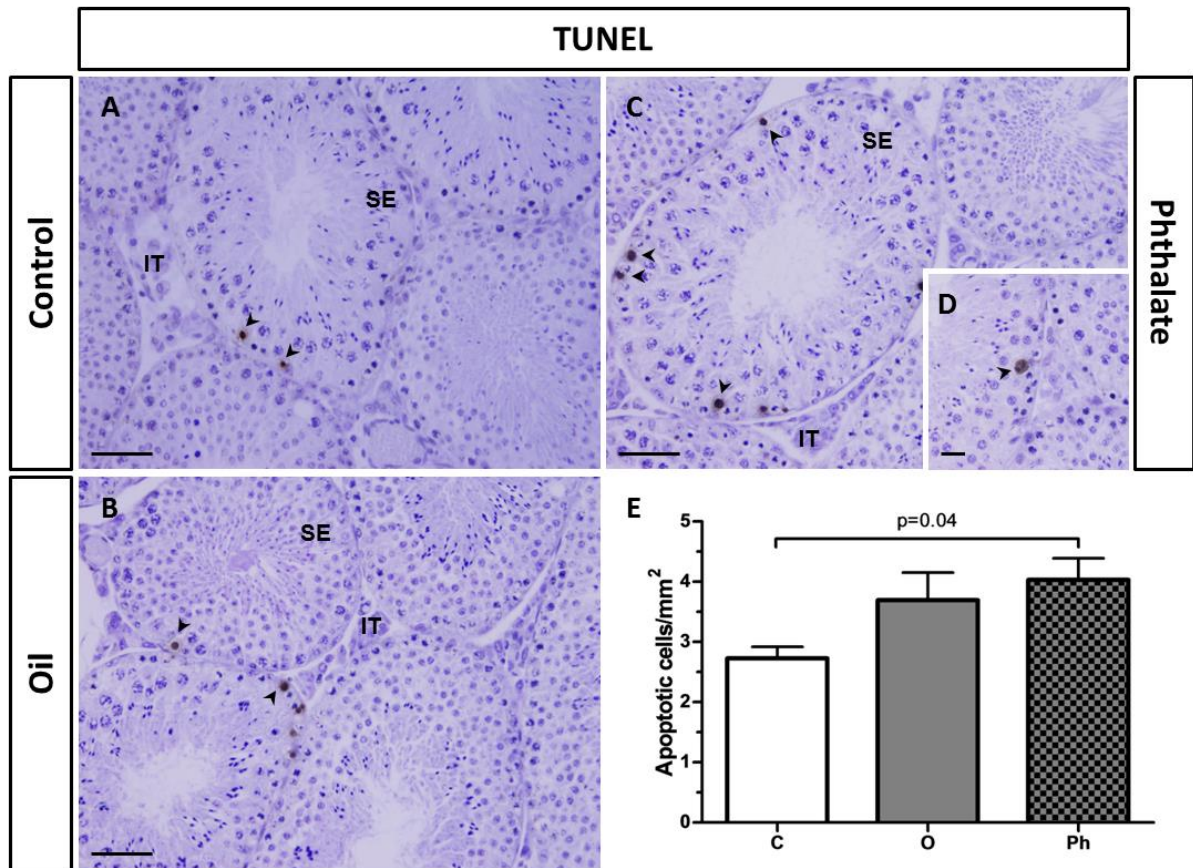


Figure 4. Histological sections of gerbil testes submitted to TUNEL reaction to detect apoptotic cells in the Control (C; **A**), Oil (O; **B**), and Phthalate (Ph; **C** and **D**) groups. Arrowheads indicate cells in apoptosis. SE: seminiferous epithelium; IT: interstitial tissue. Bars: 50µm (**A**, **B**, and **C**) and 20µm (**D**). **E.** Relative density of apoptotic cells in the C, O and Ph groups. Five histological sections of five distinct animals per group were evaluated. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Values $p < 0.05$ were considered significant (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

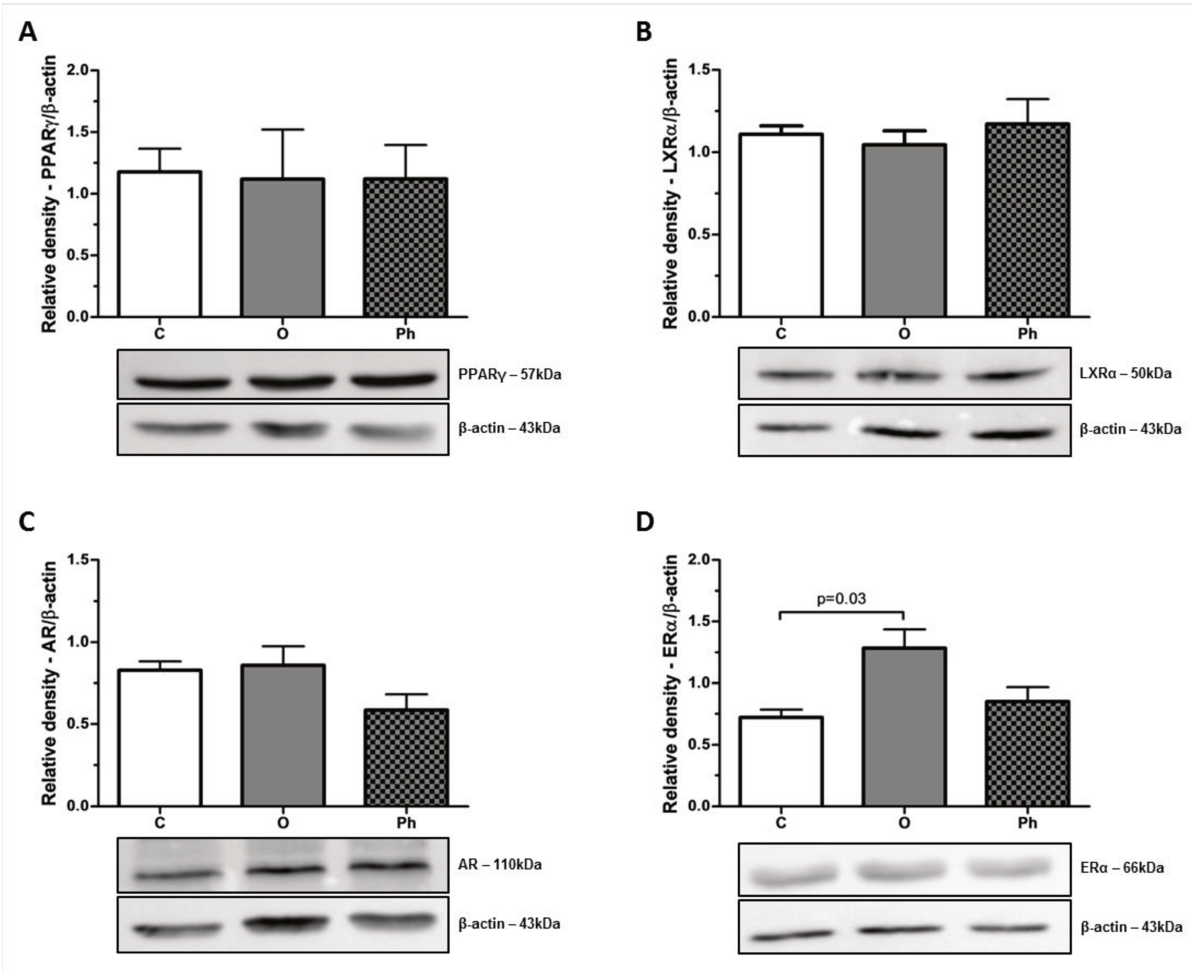


Figure 5. Determination of the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ ; **A**), liver X receptor α (LXR α ; **B**), androgen receptor (AR; **C**) and estrogen receptor α (ER α ; **D**) in the testis of gerbils from the Control (C), Oil (O) and Phthalate (Ph) groups, normalized by β -actin, which was used as a positive control. n= 4 animals per group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Values $p < 0.05$ were considered significant (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

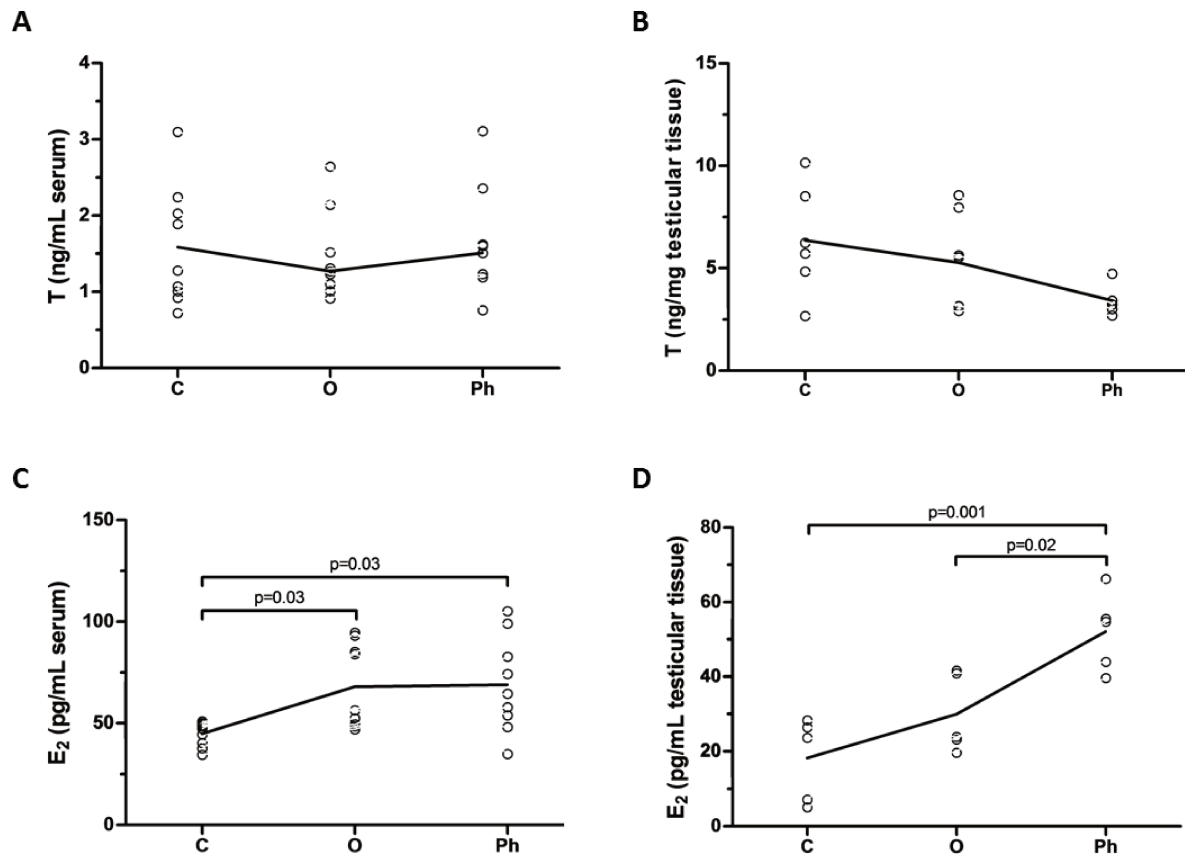


Figure 6. Hormone profile of the animals from the Control (C), Oil (O) and Phthalate (Ph) groups. **A** and **B**. Serum and intratesticular testosterone (T) levels, respectively. **C** and **D**. Serum and intratesticular estradiol (E₂) levels, respectively. Serum and intratesticular dosages were performed in 10 and 7 animals per group, respectively. Individual values (circles) and mean value (line) are represented. Values $p < 0.05$ were considered significant (**A**. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test; **B**, **C** and **D**. ANOVA test followed by Tukey's test).

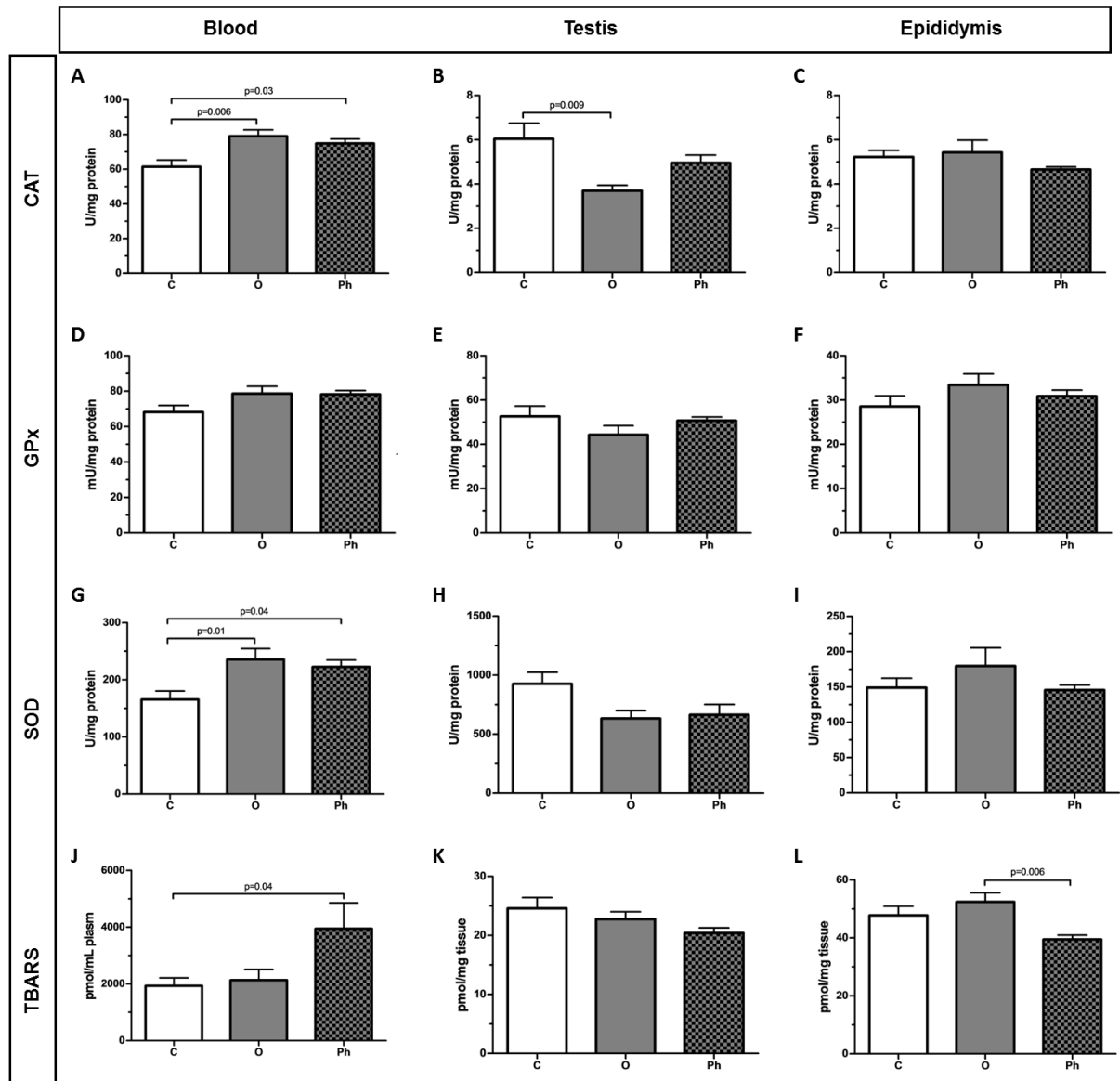


Figure 7. Oxidative stress markers in blood samples and testicular and epidididymal fragments of gerbils from the Control (C), Oil (O) and Phthalate (Ph) groups. Antioxidant activity of the Catalase (CAT; **A**, **B** and **C**), Glutathione peroxidase (GPx; **D**, **E** and **F**) and Superoxide dismutase (SOD; **G**, **H** and **I**) enzymes was determined. Oxidized biomolecule levels were determined by thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay (**J**, **K** and **L**). $n=7$ animals per group. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Values $p<0.05$ were considered significant (**A**, **B**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J** and **L**. ANOVA test followed by Tukey's test; **B** and **K**. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

III.2 MANUSCRITO 2

A dieta rica em banha altera a esteroidogênese e compromete a motilidade espermática do gerbilo da Mongólia

Ana Carolina Negrin¹, Mariana Marcielo de Jesus¹, Danilo Grünig Humberto da Silva³, Sebastião Roberto Taboga², Maria Etelvina Pinto-Fochi^{2,4}, Rejane Maira Góes^{1,2*}

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

²Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴Faculdade de Medicina, União das Faculdades dos Grandes Lagos - UNILAGO, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente: Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. Telefone: 17 32212391, fax 17 32212390.

E-mail: acnegrin@gmail.com (AC Negrin), marianamarcielo@gmail.com (MM de Jesus), dangrunig@gmail.com (DGH Silva), taboga@ibilce.unesp.br (SR Taboga), mep.fochi@yahoo.com.br (ME Pinto-Fochi), remagoes@ibilce.unesp.br (RM Góes).

Abreviações: AR, receptor de andrógeno; CAT, catalase; DSP, produção diária de espermatozoides; E₂, estradiol; ER α , receptor de estrógeno α ; EROs, espécies reativas de oxigênio; GPx, glutathione peroxidase; HDL, *high-density lipoprotein*; IGS, índice gonadossomático; IMC, índice de massa corpórea; LXR α , receptor X do fígado α ; PPAR γ , receptor de ativação da proliferação de peroxissomos γ ; SOD, superóxido dismutase; T, testosterona; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Resumo

Estudos epidemiológicos indicam uma relação entre sobrepeso e obesidade e infertilidade masculina. Contudo é bastante difícil distinguir os efeitos causados pelo aumento da adiposidade daqueles causados por um componente lipídico particular. Assim, este estudo avaliou as consequências do consumo de dieta enriquecida com banha de porco do desmame até a idade adulta para a função testicular e os parâmetros reprodutivos do gerbilo e suas relações com as alterações metabólicas. Gerbilos machos (28 dias pós-natal, n=12 animais por grupo) foram alimentados com dieta padrão (C) ou dieta rica em lipídios saturados, contendo 31% de banha (D), por 12 semanas. O consumo de dieta rica em lipídios saturados não afetou as contagens espermáticas do gerbilo (produção diária de espermatozoides, reserva espermática e tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo), mas desequilibrou os hormônios sexuais intratesticulares e prejudicou a motilidade dos espermatozoides. Essas alterações foram acompanhadas do aumento no conteúdo testicular dos receptores nucleares ER α e LXR α , bem como do aumento nos níveis séricos de colesterol total e colesterol não-HDL. Nossos dados indicam que o consumo de dieta enriquecida com banha induz a obesidade no gerbilo, causando perturbações metabólicas e alterações funcionais no testículo, que culminam em comprometimento da motilidade espermática e, possivelmente, da capacidade reprodutiva.

Palavras chave: Banha, lipídios saturados, alterações metabólicas, esteroidogênese, motilidade espermática.

1 Introdução

Nas últimas décadas, a interação entre síndrome metabólica e fertilidade tem recebido crescente atenção devido ao rápido aumento na prevalência da obesidade e sobrepeso em todo o mundo (Pasquali *et al.*, 2007; WHO, 2011). O índice de massa corpórea (IMC), aceito e adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é um dos principais métodos de avaliação do grau de obesidade de um indivíduo, sendo os valores entre 25 e 29,9 indicativos de sobrepeso e valores iguais ou acima de 30, de obesidade. O acúmulo de tecido adiposo pode ser atribuído a diversos fatores, como ao sedentarismo e aos pobres hábitos alimentares da população, marcados pela ingestão de dietas ricas em calorias e gorduras e pobre em vegetais e fibras (Stubbs e Lee, 2004).

Dados clínicos têm sugerido uma relação entre IMC e infertilidade masculina (Hammoud *et al.*, 2006; MacDonald *et al.*, 2010). Diversos estudos têm demonstrado que o aumento no IMC está relacionado com a pobre qualidade do sêmen (Magnusdottir *et al.*, 2005), a diminuição da concentração (Jensen *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2010) e da motilidade espermática (Hammoud *et al.*, 2006) e ao aumento no índice de fragmentação do DNA (Kort *et al.*, 2006; Chavarro *et al.*, 2010). O acúmulo de tecido adiposo decorrente da obesidade também pode alterar o padrão de síntese, metabolismo e ação de diversos hormônios (Tymchuk *et al.*, 1998; Lordelo *et al.*, 2007), incluindo os esteroides sexuais (Pasquali, 2006; Hammoud *et al.*, 2008). No entanto, nos estudos clínicos é complexo e bastante difícil diferenciar os efeitos da obesidade daqueles causados pelos lipídios em si.

Estudos experimentais fazem uso de dietas enriquecidas com diferentes componentes lipídicos como modelo de indução de obesidade (Pauli *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2011; Reame *et al.*, 2014; Pinto-Fochi *et al.*, 2016). Fernandez *et al.* (2011) demonstraram que ratos alimentados com dieta rica em lipídios insaturados por 15 semanas apresentavam altos índices de adiposidade e peso corporal e, ainda, altos níveis séricos de estradiol, apesar de os níveis de testosterona não terem sido afetados. A dieta também demonstrou ser prejudicial para os parâmetros espermáticos, uma vez que diminuiu a produção e a motilidade dos espermatozoides (Fernandez *et al.*, 2011). A capacidade reprodutiva de ratos que ingeriram a mesma dieta enriquecida com lipídios insaturados também foi afetada no estudo de Reame *et al.* (2014), que observaram redução na produção diária de espermatozoides. Os autores revelaram que esta redução foi acompanhada de menores níveis circulantes de testosterona e maiores níveis de leptina nos animais, que inclusive apresentavam-se resistentes à insulina. Os estudos que avaliam os efeitos dos lipídios saturados para os parâmetros espermáticos são mais escassos na literatura. No

entanto, Rato *et al.* (2013) verificaram que ratos que ingeriram por um mês emulsão energética contendo 20% de banha de porco como fonte lipídica, sabidamente rica em ácidos graxos saturados, apresentaram redução nos níveis séricos e intratesticulares de testosterona, redução na porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais e aumento na taxa de motilidade espermática. Este estudo demonstrou que as alterações observadas eram resultado de modulação no metabolismo testicular, uma vez que o conteúdo intratesticular de glicose e de enzimas chave do metabolismo glicolítico foi aumentado (Rato *et al.*, 2013).

Estes dados demonstram que apesar das diferentes fontes de lipídios alterarem a síntese de esteroides sexuais e os parâmetros espermáticos dos modelos animais estudados, os mecanismos pelos quais estas desordens ocorrem podem diferir dependendo do tipo de componente lipídico. Dessa forma, este estudo objetivou investigar as consequências do consumo de dieta enriquecida com banha de porco, do desmame até a idade adulta, para a função testicular e os parâmetros reprodutivos do gerbilo da Mongólia e suas relações com as alterações metabólicas.

2 Material e Métodos

2.1 Animais e delineamento experimental

Os gerbilos da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) machos utilizados nesse estudo foram fornecidos pelo Biotério do Grupo de Pesquisa em Biologia da Reprodução do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), campus de São José do Rio Preto – SP. Eles foram mantidos no mesmo, em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C. Os animais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e os procedimentos de experimentação, apreciados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto (CEUA) (protocolo nº 093/2014). Ao desmame (28 dias pós-natal), foram aleatoriamente divididos em dois grupos (n=12 animais por grupo) e alimentados com ração padrão para roedores (grupo Controle - C) ou com ração rica em lipídios saturados (grupo Dieta - D) até a idade adulta (16 semanas de vida), quando foram submetidos à eutanásia. Ambas as dietas foram adquiridas de Prag Soluções Comércio e Serviços (Jaú, SP, Brasil) e suas composições estão indicadas na Tabela 1. A dieta rica em lipídios saturados continha 31 % de banha de porco. Esta foi padronizada por Reeves (1997) e tem sido utilizada em outros estudos (Pauli *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2009; Ropelle *et al.*, 2009).

A eutanásia foi realizada entre 7h30 e 11h, com o uso de inalação de CO₂, seguido de decapitação para coleta de sangue. Os testículos e epidídimos foram isolados e pesados e, posteriormente, foi determinado o índice gonadossomático [IGS = (peso testicular/peso corporal) x 100].

2.2 Avaliação dos parâmetros metabólicos

O ganho de peso corporal e o consumo diário de ração dos animais foram acompanhados semanalmente. O índice de adiposidade foi estimado de acordo com os procedimentos utilizados para o camundongo (Taylor e Phillips, 1996), através da soma dos depósitos de gordura visceral, retroperitoneal e epididimal dividido pelo peso corporal x 100. A glicemia foi dosada ao término do experimento pelo sistema de fitas Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Suíça), a partir de gotas de sangue retiradas da região cervical.

O perfil lipídico foi determinado por testes enzimáticos realizados em amostras de sangue centrifugadas a 1.200 g por 20 minutos e armazenadas a -80 °C até o momento das análises. Foram avaliados os níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL (*high-density lipoprotein*), colesterol não-HDL e triglicérides (In vitro Diagnóstica Ltda, Brasil). Cada amostra foi analisada em triplicata em espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A razão triglicérides/HDL foi calculada como marcador de resistência à insulina (Fan *et al.*, 2011).

2.3 Dosagens hormonais

As dosagens hormonais séricas foram realizadas em amostras de sangue centrifugadas a 1.200 g por 20 minutos e congeladas a -80 °C até o momento das análises. Os níveis séricos de testosterona (T) e estradiol (E₂) foram avaliados em duplicata através de kits específicos de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (Testosterone EIA Kit, No. 582701, e Estradiol EIA Kit, No. 582251, Cayman Chemical Company, MI, EUA).

As concentrações intratesticulares de T e E₂ foram determinadas após processamento do testículo para extração de esteroides, de acordo com Pinto-Fochi *et al.* (2016). Os níveis T e E₂ intratesticulares também foram dosadas por kits específicos de ELISA (Testosterone Test System, código 3775-300, Monobind Inc., CA, EUA, e Estradiol EIA Kit, No. 582251, Cayman Chemical Company, MI, EUA).

As leituras foram realizadas em leitor SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, CA, EUA).

2.4 Estimativa do índice de apoptose

Após a dissecação, o testículo foi fixado em Bouin por 12h. Os fragmentos testiculares foram, então, lavados por diversas vezes em etanol 70% e processados para inclusão em Paraplast (Merck, Alemanha) em processador TP1020 (Leica Microsystems Brasil, China). As células apoptóticas testiculares foram detectadas através da reação de TUNEL, ensaio baseado na fragmentação de DNA associado à morte celular, segundo as instruções do kit (ApopTag Plus in situ, Apoptosis Detection Kit, Millipore, 57101, CA, EUA). Foram analisados cinco cortes histológicos, de cinco animais distintos, por grupo experimental. A densidade relativa de células apoptóticas foi determinada pela razão entre o número de células apoptóticas, obtido após a varredura de todo o corte histológico, e a área do corte correspondente. As imagens foram capturadas com câmera Pike F-505C VC50 (Allied Vision Technologies, Alemanha) acoplada ao scanner de lâminas Olympus VS120 (Olympus Corporation, Japão).

2.5 Determinação do conteúdo de proteínas testiculares por Western blotting

O conteúdo do receptor de andrógeno (AR), do receptor de estrógeno α (ER α), do receptor de ativação da proliferação de peroxissomos γ (PPAR γ) e do receptor X do fígado α (LXR α) foram quantificados por Western blotting. Fragmentos testiculares foram homogeneizados in tampão RIPA (Sigma, MO, EUA) contendo coquetel de inibidores de proteases (Sigma, MO, EUA) e Triton X100 para extração de proteínas. O homogeneizado foi centrifugado a 18.000 g por 20 minutos a 4 °C e as proteínas do sobrenadante foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Alíquotas com 30 μ g de proteínas foram tratadas com solução tampão (Laemli Sample Buffer, Bio-Rad, CA, EUA) e β -mercaptoetanol a 93 °C por 5 minutos. As proteínas foram, então, submetidas a SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Itália). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em tampão TBST (Tris-HCl 10mM, pH 7.4, NaCl 150mM e Tween-20 0,2%) por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubação overnight a 4 °C com anticorpo primário rabbit anti-AR (1:300, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), mouse anti-ER α (1:200, sc-8005, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), rabbit anti-PPAR γ (1:100, ab209350, Abcam, MA, EUA) ou rabbit anti-LXR α (1:200, ab1064464, Abcam, MA, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST por três ciclos de 10 minutos cada, incubadas por 1 hora a 4 °C com anticorpo secundário HRP específico e lavadas, novamente, com tampão por três ciclos de 10 minutos. Como controle interno, cada

membrana foi recuperada da ligação com o primeiro anticorpo e incubada com mouse anti- β -actina (1:1000, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). As membranas foram reveladas em fotodocumentador G:BOX Chemi XRQ (Syngene Synoptics Ltd, UK) e a densidade das bandas, analisadas no programa de densitometria Image J 1.34 (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, MD, EUA).

2.6 Avaliação dos parâmetros espermáticos

A estimativa da motilidade espermática foi realizada imediatamente após a eutanásia, utilizando a cauda do epidídimo. Os espermatozoides foram obtidos através de perfurações feitas com a ajuda de uma agulha em 1,0 mL de meio HTF modificado (Fluido Tubal Humano, Irvine Scientific, CA, EUA) a 34 °C. As contagens foram realizadas em câmara de Makler (Sefi-Medical, Israel) aquecida a 34 °C e carregada com 10 μ L de solução. A motilidade foi avaliada por estimativa visual (100 espermatozoides por animal, em duplicata) em microscópio de contraste de fase (Olympus BX60, Olympus Corporation, Japão) em aumento de 200x. Os espermatozoides foram classificados como imóveis, móveis sem progressão do movimento e móveis com progressão do movimento (Perobelli *et al.*, 2010, com modificação).

As espermátides resistentes à homogeneização (estágios 13, 14 e 15 da espermiogênese) (Segatelli *et al.*, 2004) e os espermatozoides presentes na cabeça/corpo e na cauda do epidídimo foram estimados como descrito por Robb *et al.* (1978), com modificações de acordo com Fernandes *et al.* (2007). Para determinar a produção diária de espermatozoides (DSP), o número de espermátides por testículo foi dividido em 5,81, que é o número de dias em que as espermátides resistentes à homogeneização estão presentes no epitélio germinativo do gerbilo (Segatelli *et al.*, 2004). A reserva espermática foi obtida pelo número de espermatozoides na cauda do epidídimo multiplicado por dois. O tempo de trânsito dos espermatozoides através da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo foi obtido dividindo o número de espermatozoides presentes em cada uma dessas regiões pela DSP (Amann *et al.*, 1976).

2.7 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes e de biomoléculas oxidadas.

Fragmentos de testículo e epidídimo foram pesados e armazenados a -80 °C. antes de iniciar as análises, os fragmentos foram, então, homogeneizados em tampão Tris-HCl 0,2 mM, pH 7,5 (1:4 p/v) contendo 1mM de EDTA, 1mM de DTT, 0,5M de sacarose e 0,15M de KCl, e centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 3 °C. Em seguida, o sobrenadante foi

novamente centrifugado a 50.000 g por 60 minutos a 1 °C. O novo sobrenadante foi coletado, aliquotado e estocado a -80 °C e, no momento das análises, utilizado para determinar a atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT; Beutler, 1975), Glutathione peroxidase (GPx; Sies *et al.*, 1979) e Superóxido dismutase (SOD). A atividade da SOD foi determinada com o uso do Kit de Ensaio para SOD, de acordo com instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, No. 19160, MO, EUA). O conteúdo total de proteínas nas amostras foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As atividades de CAT e GPx foram determinadas em espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), enquanto que a atividade da SOD, em leitor de microplacas Victor TM X3 (Perkin ElmerR, MA, EUA). As análises supracitadas foram aplicadas também ao hemolisado obtido por meio de amostras de sangue coletadas, imediatamente após a eutanásia, em tubos de polietileno contendo heparina.

Como marcador de oxidação, foram mensurados os níveis de adutos coloridos produzidos pela reação de biomoléculas oxidadas com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Forman *et al.*, 2015) em amostras plasma e fragmentos de testículo e epidídimo. As amostras de plasma foram obtidas após centrifugação do hemolisado (850 g, 10 min). Os fragmentos de testículo e epidídimo foram pesados e homogeneizados em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8), 1: 3 p/v. O homogeneizado recebeu a adição de 300 µL de TBA, foi incubado a 90 ° C por 40 minutos e, em seguida, incubado em gelo para parada da reação. Posteriormente, 600 µL de n-butanol foram adicionados ao homogeneizado, o qual foi centrifugado a 2.500 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação de biomoléculas oxidadas. Os produtos foram detectados em espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), de acordo com Uchiyama e Mihara (1978).

2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). Primeiramente, os dados foram verificados quanto à normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados que possuíam distribuição paramétrica foram submetidos ao teste t de Student. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste Mann-Whitney. Foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 Resultados

3.1 Perfil metabólico

O consumo diário médio de ração rica em lipídios saturados pelos gerbilos foi significativamente menor que o consumo de dieta padrão (Tab. 2). No entanto, quando verificado o consumo diário de calorias, não houve diferença entre os grupos (Tab. 2). Apesar disso, os animais do grupo D apresentaram um aumento de ~7% no peso corporal e de ~9% no ganho de peso, ao longo das 12 semanas de tratamento (Tab. 2). Também apresentaram aumentos no peso dos depósitos de gordura visceral (~86%) e retroperitoneal (~48%) (Tab. 2), que culminaram num aumento de cerca de 24% no índice de adiposidade ($p=0,058$) (Tab. 2). Além disso, a dieta rica em lipídios saturados elevou os níveis de colesterol total (~63%) e de colesterol não-HDL (~108%) no sangue (Tab. 3). Não houve diferenças entre os níveis de glicose no sangue e na razão triglicérides/HDL, demonstrando não haver indícios de resistência à insulina (Tab. 3).

3.2 Perfil hormonal

O consumo de lipídios saturados do desmame até a idade adulta não alterou os níveis séricos de T e E_2 (Fig. 1A e 2B, respectivamente). No entanto, os níveis intratesticulares dos esteroides sexuais foram alterados, com redução de cerca de 46% na T e aumento de aproximadamente 83% na concentração de E_2 ($p=0,052$) (Fig. 1C e D).

3.3 Aspectos reprodutivos

Não foram verificadas alterações no peso testicular e no IGS dos animais do grupo D (Tab.2). A análise histológica não indicou alterações no testículo dos animais que consumiram a dieta contendo os lipídios saturados, mas a densidade relativa de células apoptóticas aumentou aproximadamente 33% (Fig. 2). Não foram verificadas alterações na expressão testicular dos receptores nucleares AR e PPAR γ (Fig. 3A e B, respectivamente), mas houve um aumento de ~83% na expressão de ER α ($p=0,057$; Fig. 3C) e de ~63% na de LXR α (Fig. 3D). As contagens espermáticas no testículo e também a DSP não variaram no grupo D (Tab.5).

O peso epididimal foi cerca de 7% maior no grupo D (Tab. 2), mas não foram observadas variações na reserva espermática nem no tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo dos animais entre os grupos (Tab.5).

O consumo de lipídios saturados do desmame até a idade adulta comprometeu a motilidade dos espermatozoides, uma vez que diminuiu ~20% a taxa dos espermatozoides com progressão do movimento e aumentou ~47% a taxa dos com movimento não progressivo e ~32% a dos imóveis (Fig. 4).

3.4 Marcadores de estresse oxidativo

Com relação às enzimas antioxidantes, não houve variação na atividade de CAT e GPx nos três tecidos analisados dos diferentes grupos (Tab. 6). No entanto, a atividade da SOD foi ~34% maior no sangue, ~27% maior no epidídimo e ~42% menor no testículo dos animais do grupo D (Tab. 6). O nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não alterou no plasma e no testículo dos animais do grupo D, demonstrando que a ingestão de lipídios saturados não alterou a oxidação de biomoléculas nestes tecidos (Tab. 6). No entanto, o nível de TBARS foi ~46% menor no epidídimo deste grupo (Tab 6).

4 Discussão

Os dados do presente estudo demonstram que o consumo de dieta rica em lipídios saturados por 12 semanas, a partir do desmame, não afeta as contagens espermáticas do gerbilo, mas desequilibra os hormônios sexuais intratesticulares e prejudica a motilidade dos espermatozoides. Essas alterações foram acompanhadas de *upregulation* da expressão testicular dos receptores nucleares ER α e LXR α , bem como do aumento nos níveis séricos de colesterol total e de colesterol não-HDL.

Dietas com excesso de lipídios têm se mostrado adequadas para a indução de obesidade em roedores (Pauli *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2008; Ropelle *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2011; Reame *et al.*, 2014; Pinto-Fochi *et al.*, 2016), o que também foi constatado no presente estudo com o uso de dieta enriquecida com banha de porco. Além disso, o padrão de obesidade aqui observado, com aumento do peso corporal, do peso dos depósitos de gordura visceral e retroperitoneal e do índice de adiposidade, pode ser caracterizada como obesidade central. Escobar *et al.* (2009) também observaram significativo aumento de peso de ratos Wistar tratados com o mesmo tipo de dieta em período da vida semelhante ao usado neste estudo (10 semanas a partir do desmame). Recentemente, de Jesus *et al.* (2015) trataram gerbilos machos com dieta rica em lipídios insaturados, por 10 semanas, também na fase de maturação sexual, e não verificaram alterações na adiposidade e no peso dos animais. Em conjunto esses dados demonstram que a natureza dos lipídios é um fator preponderante na indução de obesidade do gerbilo da Mongólia e, ao que parece, os lipídios saturados tem maior efeito obesogênico para esses roedores. Também é importante ressaltar que os animais apresentaram-se obesos apesar do menor consumo diário de ração (~77%) e da equivalente ingestão diária de calorias, reforçando que se trata do efeito dos lipídios saturados e não do maior aporte calórico.

É conhecido que obesidade visceral e altos níveis de colesterol, especialmente o colesterol ruim, aumentam os riscos de doenças coronárias (Hooper *et al.*, 2011, Maneschi *et al.*, 2012), sendo estes fatores característicos da chamada Síndrome Metabólica (Maneschi *et al.*, 2012). Ainda quanto às alterações metabólicas verificadas no presente estudo, a ração enriquecida com lipídios saturados não alterou o índice glicêmico nem foi observada indicação de resistência à insulina, pela relação triglicerídeos/HDL. No entanto, os níveis de colesterol total e colesterol ruim (não-HDL) aumentaram drasticamente nos animais que consumiram a dieta hiperlipídica. Assim, o excesso de lipídios saturados, além de induzir a obesidade, causou hipercolesterolemia nos animais.

Estudos epidemiológicos demonstram que o acúmulo de tecido adiposo está associado a distúrbios no ambiente hormonal, que podem prejudicar o aparelho reprodutivo, uma vez que diminui os níveis séricos de testosterona total e livre e aumenta os níveis séricos de estradiol (Giagulli *et al.*, 1994; MacDonald *et al.*, 2010; Mah e Wittert, 2010). Diversos estudos experimentais também têm demonstrado que a obesidade aliada ao consumo de dieta hiperlipídica causa declínio nos níveis circulantes de testosterona (Fernandez *et al.*, 2011; Reame *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Macrini *et al.*, 2016; Pinto-Fochi *et al.*, 2016). Os gerbilos que consumiram a dieta rica em lipídios saturados, apesar do acúmulo acentuado de tecido adiposo, não apresentaram alterações nos níveis séricos de testosterona e estradiol. Entretanto, foram observadas alterações na esteroidogênese testicular visto que a concentração intratesticular de testosterona reduziu, enquanto que a de estradiol aumentou. A enzima aromatase catalisa a conversão irreversível de substratos androgênicos (testosterona e androstenediona) em estrógenos (estradiol e estrona) (Brodie, 1985). É possível que a ingestão de lipídios saturados do desmame até a idade adulta tenha afetado a expressão desta enzima, aumentando assim a conversão da testosterona testicular e, consequentemente, os níveis de estradiol (Lambard *et al.*, 2005; Haverfield *et al.*, 2011; Lardone *et al.*, 2017). Estudo recém-publicado de Lardone *et al.* (2017) demonstrou que células de Leydig de pacientes inférteis com sinais de disfunção esteroidogênica superexpressam a aromatase, levando a um aumento nos níveis intratesticulares de estradiol. Análises do conteúdo de aromatase no testículo dos gerbilos se fazem necessárias para afirmar se houve uma superexpressão desta enzima, mas nós não obtivemos sucesso para essa espécie de roedor com os anticorpos anti-aromatase disponíveis comercialmente. Os estrógenos são reconhecidamente importantes para a espermatogênese, no entanto altos níveis de estradiol são prejudiciais para o potencial reprodutivo masculino (Akingbemi, 2005; Roth *et al.*, 2008). Estrógenos testiculares interagem com ERs para mediar a transcrição de genes específicos. O

gene ER α é altamente expresso em testículos adultos pela maioria das células testiculares, inclusive células germinativas (Carreau *et al.*, 2011). No presente estudo observamos um aumento no conteúdo testicular de ER α , que pode ser devido à desregulação causada pelos maiores níveis de estradiol encontrados nos testículos destes animais.

Mesmo sem afetar a produção espermática, no presente estudo foi constatado que o consumo de dieta rica em lipídios saturados aumentou em cerca de 33% a densidade de células apoptóticas testiculares. A apoptose é um processo de morte celular programado de suma importância na regulação da espermatogênese (Sinha Hikim e Swerdloff, 1999). Estudos mostram que baixas concentrações intratesticulares de testosterona estão relacionadas a aumentos significativos nas taxas de morte celular nos testículos de ratos (Sinha Hikim *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001). Como mencionado, os níveis intratesticulares de testosterona foram menores nos animais que consumiram a dieta hiperlipídica, o que pode ter contribuído para as maiores taxas de morte celular verificadas no grupo D.

PPARs são receptores nucleares que controlam o acúmulo de gordura no tecido adiposo, através da ativação de fatores de transcrição ligados à regulação do metabolismo de lipídios (Issemann e Green, 1990; Lehrke e Lazar, 2005). Além disso, a *upregulation* da expressão de PPAR γ é frequente em uma variedade de tumores malignos (Escobar *et al.*, 2009). A expressão de PPAR γ tem sido demonstrada em várias linhagens de células tumorais humanas de mama, próstata e testículo (Hase *et al.*, 2002; Segawa *et al.*, 2002). Estudo de Escobar *et al.* (2009) demonstrou que ratos alimentados com dieta rica em lipídios saturados por 10 semanas apresentam maior expressão prostática dos receptores AR e PPAR γ . Os gerbilos alimentados com excesso de lipídios saturados não apresentaram variação na expressão de PPAR γ e AR nos testículos. Por outro lado, apresentaram, além de maior conteúdo de ER α , maior conteúdo testicular de LXR α . LXR α é um receptor nuclear regulador da homeostase de colesterol e lipídios também em nível testicular (Muczinski *et al.*, 2012) e está presente nas células de Leydig, participando da regulação de enzimas chave no processo de esteroidogênese, como a StAR e a 3 β -HSD (Rondanino *et al.*, 2014). Volle *et al.* (2007) demonstrou em seu estudo que camundongos *knockout* para o gene LXR α apresentam redução nos níveis intratesticulares de testosterona. Esses achados, entretanto, são discordantes com os resultados aqui apresentados, que demonstram que os animais alimentados com banha apresentaram baixa concentração intratesticular de testosterona e, ao mesmo tempo, alta expressão de LXR α .

Estudos têm demonstrado que a obesidade está associada à infertilidade masculina. Além disso, dados recentes apontam que o aumento nos níveis de colesterol no

sangue também pode estar associado à pobre qualidade do sêmen e problemas de fertilidade em homens (Jensen *et al.*, 2013). Reame *et al.* (2014) verificaram que ratos Wistar tratados com ração rica em lipídios insaturados do desmame até a idade adulta apresentavam aumento nos níveis de triglicérides, de colesterol total, de colesterol HDL e de colesterol não-HDL, os quais foram associados à queda na DSP, sugerindo um comprometimento da função reprodutiva dos animais. O número de espermátides presentes nos testículos e a DSP são importantes indicadores do potencial de fertilidade (Ashby *et al.*, 2003). No presente estudo foi observado que o consumo da dieta enriquecida com lipídios saturados não resultou em prejuízos para a DSP. Estes dados diferem de dados clínicos que apontam que o aumento da adiposidade está associado à oligozoospermia (Jensen *et al.*, 2004; Hammoud *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2013). Entretanto, corroboram os resultados obtidos por Bakos *et al.* (2011) e Fernandez *et al.* (2011), os quais não observaram alterações na concentração e na produção de espermatozoides dos animais tratados com dieta rica em lipídios insaturados, apesar da obesidade verificada nos animais.

Neste estudo, não foram observadas diferenças na reserva espermática e no tempo de trânsito dos espermatozoides através do epidídimo entre os grupos, apesar do aumento no peso epididimal verificado nesses animais. Por outro lado, houve comprometimento da motilidade dos espermatozoides. Dados semelhantes foram observados nos estudos já citados de Bakos *et al.* (2011) e Fernandez *et al.* (2011), onde os animais tratados com dieta hiperlipídica apresentaram redução na taxa de espermatozoides móveis. A motilidade espermática é um dos mais importantes parâmetros espermáticos e usado para avaliação da qualidade do sêmen (Brooks, 1983; Sullivan *et al.*, 2005). Na literatura são encontrados diversos trabalhos clínicos que relacionam o aumento de peso corpóreo com menores taxas de espermatozoides móveis (Kort *et al.*, 2006; Hofny *et al.*, 2010; Fariello *et al.*, 2012). Conforme destacado em uma recente revisão, a regulação da quantidade de colesterol na membrana plasmática dos espermatozoides é determinante para a motilidade espermática (Leahy e Gadella, 2015). Tanto o efluxo quanto a redistribuição do colesterol são essenciais para o processo de maturação e capacitação espermática e, consequentemente, para a eficácia da fertilização (Leahy e Gadella, 2015). No entanto, os mecanismos pelos quais o transporte e a transferência do colesterol a aceptores externos acontecem ainda permanecem desconhecidos. Bakos *et al.* (2011) observaram que níveis mais elevados de colesterol e triglicérides nos camundongos alimentados por nove semanas com dieta rica em lipídios poderiam estar relacionados ao aumento de danos no DNA dos espermatozoides e à redução da sua capacidade de ligação ao ovócito II. Além disso, sabe-se que a aquisição da motilidade

dos espermatozoides é dependente da presença de andrógenos (Orgebin-Crist e Tichenor, 1973) e que altos níveis de estrógenos são prejudiciais para a função epididimária (Goyal *et al.*, 2001). Como já mencionado, os gerbilos alimentados com a dieta enriquecida com banha apresentaram, além de hipercolesterolemia, altos níveis de E₂ intratesticular. Logo, as alterações mencionadas podem ter culminado em comprometimento da motilidade espermática.

Evidências também indicam uma correlação negativa entre motilidade espermática e estresse oxidativo (Agarwal *et al.*, 2003; Blumer *et al.*, 2008), uma vez que o excesso na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode levar ao aumento dos danos no DNA, comprometendo a integridade cromatínica e ocasionando a diminuição da atividade mitocondrial (Zhou *et al.*, 2011; Fariello *et al.*, 2012; Aitken *et al.*, 2016). No presente estudo, foram observadas alterações na atividade antioxidante da SOD, que se apresentou mais acentuada no sangue e no epidídimo e reduzida no testículo. Apesar disso, os níveis de biomoléculas oxidadas não foram alterados no plasma nem no testículo e, surpreendentemente, foi reduzido no epidídimo dos animais alimentados com a dieta rica em banha ao longo da vida. Estes dados demonstram que o tratamento com esta dieta não causou danos oxidativos, sistêmico ou nos órgãos reprodutivos avaliados. Portanto, os prejuízos para a motilidade espermática não foram causados por excesso de EROs.

É conhecido que a obesidade eleva nos níveis de leptina, hormônio relacionado com a homeostase energética (Blüher e Mantzoros, 2007; Wang *et al.*, 2008). Sabe-se também que níveis adequados de leptina estão relacionados com o funcionamento normal do aparelho reprodutor (Barash *et al.*, 1996). Receptores de leptina estão presentes no tecido testicular e na membrana plasmática dos espermatozoides, podendo afetar diretamente as células germinativas via sistema endócrino, independentemente de alterações no eixo hipotálamo-pituitária-gônada (Jope *et al.*, 2003). Estudo realizado por Hofny *et al.* (2010) demonstrou que homens obesos inférteis apresentavam altos níveis de leptina no sangue, e que estes níveis estavam diretamente relacionados com a pobre qualidade do sêmen e a baixa motilidade espermática. Apesar dos mecanismos através dos quais a leptina contribui para a função espermatogênica serem pouco conhecidos, Guo *et al.* (2014) sugerem que altos níveis de leptina reduzam a motilidade espermática por afetarem o funcionamento das células de Leydig e de Sertoli, acarretando em redução nos níveis de testosterona e de inibina B, respectivamente, e culminando em problemas para a capacitação espermática (Banks *et al.*, 1999; Tena-Sempere *et al.*, 2001). No entanto, é possível sugerir que o comprometimento da motilidade observada no presente estudo resulte em prejuízos para a fertilidade dos gerbilos

(Ghanayen *et al.*, 2010; Bakos *et al.*, 2011), uma vez que alterações nos padrões de motilidade podem levar à ineficiência da penetração dos espermatozoides no muco cervical (Aitken *et al.*, 1985).

5 Conclusão

Nossos dados indicam que o consumo de dieta rica em lipídios saturados do desmame até a idade adulta induz a obesidade nos gerbilos da Mongólia, causando perturbações metabólicas, como a hipercolesterolemia, e alterações funcionais no testículo, em especial no aumento do estrógeno intratesticular, que culminam em comprometimento da motilidade dos espermatozoides.

6 Referências

- Agarwal A, Daleh RA, Bedaiwy MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79: 829–43. doi: 10.1016/s0015-0282(02)04948-8
- Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharazloo P. 2016. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 28: 1-10.
- Aitken RJ, Sutton M, Waner P, Richardson DW. 1985. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamsters oocytes. *J Reprod Fertil* 73(2): 441-449.
- Akingbemi BT. Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 51.
- Amann RP, Kavanaugh JF, Griel LCJr, Voglmayr JK. 1976. Sperm production of holstein bulls determined from testicular spermatid reserves, after cannulation of rete testis or vas deferens, and by daily ejaculation. *J Dairy Sci* 57(1): 93-99. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(74)84836-8
- Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J. 2003. The effects on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisfenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci* 74(1): 129-138.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. 2011. The effects of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 34: 402-410.
- Banks WA, McLay RN, Kastin AJ, Sarmiento U, Scully S. 1999. Passage of leptin across the blood-testis barrier. *Am J Physiol* 276: E1099-1104.

- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL *et al.* 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137: 3144–3147.
- Beutler E. 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Yale Journal of Biology and Medicine, Grune and Stratton; New York.
- Blüher S, Mantzoros CS. 2007. Leptin in reproduction: Current opinion in endocrinology. *Diabetes Obes* 14: 458–64.
- Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. 2008. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril* 90(5): 1716-1722. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.007
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brodie AM. 1985. Aromatase inhibition and its pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol* 34: 3213-3219.
- Brooks DE. 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 36(3): 205-221. doi: 10.1071/BI9830205
- Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FR, Bouraima-Lelong H, Delalande C. 2011. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci* 89(15-16): 584-587. doi: 10.1016/j.lfs.2011.06.004.
- Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. 2010. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 93(7): 2222-2231.
- de Jesus MM, Negrin AC, Taboga SR, Pinto-Fochi ME, Góes RM. 2015. Histopathological alterations in the prostates of Mongolian gerbils exposed to a high-fat diet and di-n-butyl phthalate individually or in combination. *Reprod Toxicol* 52: 26-39. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.02.005
- Escobar ELO, Gomes-Marconder MCC, Carvalho HF. 2009. Dietary fatty acid quality affects AR and PPAR γ levels and prostate growth. *Prostate* 69: 548-558.
- Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M. 2007. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nutr Food Res* 51: 1279-1292.
- Fan X, Liu EY, Hoffman VP, Potts AJ, Sharma B, Henderson DC. 2011. Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio: a surrogate to predict insulin resistance and low-density lipoprotein cholesterol particle size in nondiabetic patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 72(6): 806-812. doi: 10.4088/JCP.09m05107yel

- Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Farietta R. 2012. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int* 110: 863-867.
- Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 23(1): 106-112. doi:10.1016/j.reprotox.2006.09.002.
- Fernandez CBD, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF *et al.* 2011. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 32. doi: 10.1186/1477-7827-9-32.
- Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H *et al.* 2015. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. *Free Rad Biol Med* 78: 233-235. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504
- Ghanayen BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. 2010. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod* 82: 96-104.
- Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A. 1994. Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 997-1000.
- Goyal HO, Braden TD, Mansour M, Willians CS, Kamaleldin A, Srisvastava KK. 2001. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. *Biol Reprod* 64(3): 927-934. doi: 10.1095/biolreprod64.3.927
- Guo J, Zhao Y, Huang W, Hu W, Gu J, Chen C *et al.* 2014. Sperm motility inversely correlates with seminal leptin levels in idiopathic asthenozoospermia. *Int J Clin Exp Med* 7 (10): 3550-3555.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrel DT. 2006. Obesity and male reproductive potential. *Journal of Andrology*, 27(5): 619-626.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. 2008. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 90: 897-904.
- Hase T, Yoshimura R, Mitsuhashi M, Segawa Y, Kawashimoto Y, Wada S *et al.* 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology* 60(3): 542-547. doi: 10.1016/S0090-4295(02)01747-8

- Haverfield JT, Ham S, Brown KA, Simpson ER, Meachem SJ. 2011. Teasing out the role of aromatase in the healthy and diseased testis. *Spermatogenesis* 1(3): 240-249.
- Hofny ERM, Ali MEA, Abdel-Hafez HZ, Kamal EE, Mohamed EE, El-Azeen HGA, Mostafa T. 2010. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril* 94(2): 581-584.
- Hooper L, Summerbell CD, Thompson R, Sills D, Roberts FG, Moore HJ, Davey SG. 2011. Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002137.
- Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645–650.
- Jensen TK, Anderson A, Jorgensen N, Andersen A, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. 2004. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 82(4): 863-870.
- Jensen TK, Heitmann BL, Jensen MB, Halldorsson TI, Anderson AM, Skakkebaek NE *et al.* 2013. High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population. *Am J Clin Nutr* 97: 411-418.
- Joep T, Lammert A, Kratzsch J, Paasch U, Glander HJ. 2003. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl* 26: 335–41.
- Kim J, Ghosh SR, Well ACP, Zirkin BR. 2001. Caspase-3 and Caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142(9): 3809–3816.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roubenush WE. 2006. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 27: 450-452.
- Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S, Carreau S. 2005. Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95(1-5): 63-9.
- Lardone MC, Argandoña F, Flórez M, Parada-Bustamante A, Ebensperger M, Palma C *et al.* 2017. Overexpression of CYP19A1 aromatase in Leydig cells is associated with steroidogenic dysfunction in subjects with Sertoli cell-only syndrome. *Andrology* 5(1): 41-48.
- Leahy T, Gadella B.M. 2015. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J Androl* 17: 561-567. doi: 10.4103/1008-682X.153309
- Lehrke M, Lazar MA. 2005. The many faces of PPAR γ . *Cell* 16: 993-999.

- Longcope C, Baker R, Johnston CC Jr. 1986. Androgen and estrogen metabolism: relationship to obesity. *Metabolism* 35: 235–237.
- Lordelo RA, Mancini MC, Cercato C, Halpern A. 2007. Eixos hormonais na obesidade: causa ou efeito? *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(1): 34-41.
- 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.
- Macrini DJ, Bonamin LV, Teodorov E, Kirsten TB, Coelho CP, Motta PD *et al.* 2016. Overweight male juvenile rats exhibit decreases in sexual behavior and serum testosterone levels and an increase in TNF- α levels in adulthood. *Psychology and Neuroscience* 9(2): 188-197.
- Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. 2005. Persistente organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 10: 208-215.
- Mah PM, Wittert GA. 2010. Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol* 316: 180-186.
- Maneschi E, Morelli A, Filippi S, Cellai I, Comeglio P, Mazzanti B *et al.* 2012. Testosterone treatment improves metabolic syndrome-induced adipose tissue derangements. *J Endocrinol* 215(3): 347-62. doi: 10.1530/JOE-12-0333
- Muczynsky V, Cravedi JP, Lehraiki A, Moisin D, Lecureuil C, Messiaen S *et al.* 2012. Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: *In vitro* and *in vivo* approaches. *Toxicol Appl Pharmacol* 261(1): 97-104. doi: 10.1016/j.taap.2012.03.016
- Orgebin-Crist MC, Tichenor PL. 1973. Effect of testosterone on sperm maturation *in vitro*. *Nature* 245: 328-329. doi: 10.1038/245328a0
- Pasquali R, Patton L, Gambineri A. 2007. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14: 482-487.
- Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PQ. 2008. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril* 90: 346-351.
- Perobelli JE, Martinez MF, Franchi CAS, Fernandez CDB, Camargo JV, Kempinas WG. 2010. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health A*, 73(13-14): 991-1002. doi: 10.1080/15287391003751802.
- Pinto-Fochi ME, Pytlowanciv EZ, Reame V, Rafacho A, Ribeiro DL, Taboga SR, Góes RM. 2016. A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. *Reproduction* 152(6): 795–808. doi: 10.1530/REP-16-0072

- Rato L, Alves MG, Dias TR, Lopes G, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. 2013. High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters. *Andrology* 1(3): 495-504. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00071
- 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, 1-10.
- Reeves PG. 1997. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127: 838S–841S.
- Robb GW, Amann RP, Killian GJ. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54(1): 103-117. doi: 10.1530/jrf.0.0540103
- Rondanino C, Ouchchane L, Chauffour C, Marceau G, Déchelotte P, Sion B *et al.* 2014. Levels of liver X receptor in testicular biopsies of patients with azoospermia. *Fertil Steril* 102(2): 361-371. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.033
- Ropelle ER, Pauli JR, Prada P, Cintra DE, Rocha GZ, Moraes JC *et al.* 2009. Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. *J Physiol* 587.10: 2341-2351. doi: 10.1113/jphysiol.2009.170050
- Roth MY, Amory JK, Page ST. 2008. Treatment of male infertility secondary to morbid obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4: 415–419.
- Segatelli TM, França LR, Pinheiro PFF, Almeida CCD, Martinez M, Martinez FE. 2004. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Androl* 25(6): 872-880. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb03156.x
- Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, Nakatani T, Wada S, Kawahito Y *et al.* 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate* 51:108–116.
- Sies H, Koch OR, Martino E, Boveris A. 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett* 103(2): 287-290. doi: 10.1016/0014-5793(79)81346-0
- Sinha Hikim APS, Swerdloff RS. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4: 38–47.

- Sinha Hikim APS, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 136: 2770–2775.
- Stubbs CO, Lee AL. 2004. The obesity epidemic: both energy intake and physical activity contribute. *Med J Aust* 181: 489–91.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 35(1):1-10. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.03.005
- Taylor BA, Phillips SJ. 1996. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 34(3): 389-398. doi: 10.1006/geno.1996.0302
- Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, González LC, Diéguez C *et al.* 2001. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol* 170: 413-423.
- Tymchuk CN, Tessler SB, Aronson WJ, Barnard RJ. 1998. Effects of diet and exercise on insulin, sex hormone-binding globulin, and prostate-specific antigen. *Nutr Cancer* 31: 127-31.
- Uchiyama M, Mihara M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86(1): 271-278. doi: 10.1016/0003-2697(78)90342-1
- Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Dechelotte P, Sion B *et al.* 2007. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21: 1014–1027.
- Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. 2008. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 216: 3–13.
- WHO - World Health Organization. *Obesity*. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 20 jul. 2011.
- WHO - World Health Organization: Part I: The problem of overweight and obesity. World Health Organization. *Obesity: preventing and managing the global epidemic* Geneva: WHO Technical Report Series; 2000, 894.
- Zhao J, Zhai L, Liu Z, Wu S, Xu L. 2014. Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 190945..

Zhou D, Wang H, Zhang J. 2011. Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative stress in epididymis of adult rats. *Toxicol Ind Health* 27(1): 65-71. doi: 10.1177/0748233710381895

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Composição das dietas padrão e hiperlipídica.

Ingredientes	Dieta Padrão (g)	Kcal/kg	Dieta Hiperlipídica (g)	Kcal/kg
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido de milho	397,5	397,5	115,5	462
Amido de milho dextrinizado	132	132	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de milho	70	630	40	360
Fibras	50	-	50	-
Mix de minerais AIN-93	35	-	35	-
Mix de vitaminas AIN-93	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Bitartarato de colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

AIN, Instituto Americano de Nutrição.

Tabela 2. Consumo de dieta e dados biométricos dos animais dos grupos Controle (C) e Dieta (D).

n=12 por grupo	Grupos experimentais	
	C	D
Consumo de ração (g/dia)	4,13 ± 0,13	3,19 ± 0,11***
Consumo de calorias (kcal/dia)	16,33 ± 0,53	17,08 ± 0,58
Peso corporal final (g)	70,6 ± 1,0	75,6 ± 1,8*
Ganho de peso corporal (g)	42,8 ± 0,8	46,8 ± 1,4*
Índice de adiposidade (%)	2,89 ± 0,2	3,57 ± 0,3 [#]
Depósitos de gordura		
Visceral	128,6 ± 14,9	239,5 ± 41,7*
Retroperitoneal	745,1 ± 80,1	1101 ± 99,9*
Epididimal	1165 ± 59,1	1390 ± 124,7
Peso testicular (mg)	537,5 ± 12,1	558,2 ± 11,6
Índice gonadossomático (%)	0,76 ± 0,01	0,74 ± 0,01
Peso epididimal (mg)	199,2 ± 4,1	212,5 ± 3,2*

Valores expressos como média ± SEM.

* indica diferença estatística em relação ao grupo controle: * p<0,05; *** p<0,001. [#] indica que p=0,058.

Tabela 3. Níveis glicêmicos e perfil lipídico dos animais dos grupos Controle (C) e Dieta (D).

n=10 por grupo	Grupos experimentais	
	C	D
Glicose (mg/dL)	81,2 ± 3,5	86,5 ± 3,7
Perfil lipídico (mg/dL)		
Colesterol total	60,8 ± 3,6	99,0 ± 4,8***
Colesterol HDL	39,8 ± 5,1	45,9 ± 5,2
Colesterol não-HDL	25,5 ± 2,0	53,1 ± 4,4***
Triglicérides	101,6 ± 13,3	152,2 ± 28,5
Triglicérides/HDL	3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,5

Valores expressos como média ± SEM.

* indica diferença estatística em relação ao grupo controle: ***p<0,001.

Tabela 4. Contagem espermática no testículo e no epidídimo dos gerbilos dos grupos Controle (C) e Dieta (D).

n=12 por grupo	Grupos experimentais	
	C	D
Número de espermátides no testículo ($\times 10^6$)	77,4 $\pm$ 4,1	81,2 $\pm$ 2,6
DSP ($\times 10^6$)	13,3 $\pm$ 0,7	14,0 $\pm$ 0,4
Número de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo ($\times 10^6$)	13,8 $\pm$ 0,8	12,9 $\pm$ 0,6
Número de espermatozoides na cauda do epidídimo ($\times 10^6$)	166,3 $\pm$ 7,8	169,1 $\pm$ 6,9
Reserva espermática ($\times 10^6$)	332,6 $\pm$ 15,6	338,2 $\pm$ 13,7
Tempo de trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo (dias)		
Cabeça/corpo	1,05 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 0,04
Cauda	12,6 $\pm$ 0,46	12,7 $\pm$ 0,4
Total	13,7 $\pm$ 0,5	13,7 $\pm$ 0,5

Valores expressos como média $\pm$ SEM.

Tabela 5. Atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx) e Superóxido dismutase (SOD) e níveis de biomoléculas oxidadas, obtidas através do ensaio de TBARS, realizada no sangue, no testículo e no epidídimo dos gerbilos dos grupos Controle (C) e Dieta (D).

n=7 por grupo	<i>Sangue</i>		<i>Testículo</i>		<i>Epidídimo</i>	
	C	D	C	D	C	D
CAT (U/mg de proteína)	61,44 ± 3,88	70,44 ± 5,50	6,04 ± 0,71	6,05 ± 0,65	5,22 ± 0,30	4,80 ± 0,15
GPx (mU/mg de proteína)	68,24 ± 3,76	64,34 ± 5,66	52,66 ± 4,66	61,53 ± 6,74	28,55 ± 2,40	17,64 ± 0,59
SOD (U/mg de proteína)	165,6 ± 14,73	221,7 ± 9,07**	926,7 ± 97,1	532,4 ± 106,2*	148,9 ± 13,5	189,7 ± 9,28*
TBARS (pmol/mL de plasma ou pmol/mg de tecido)	1934 ± 277	1761 ± 257	24,59 ± 1,83	22,81 ± 2,37	47,78 ± 3,14	25,89 ± 2,87***

Valores expressos como média ± SEM.

* indica diferença estatística entre os grupos: *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

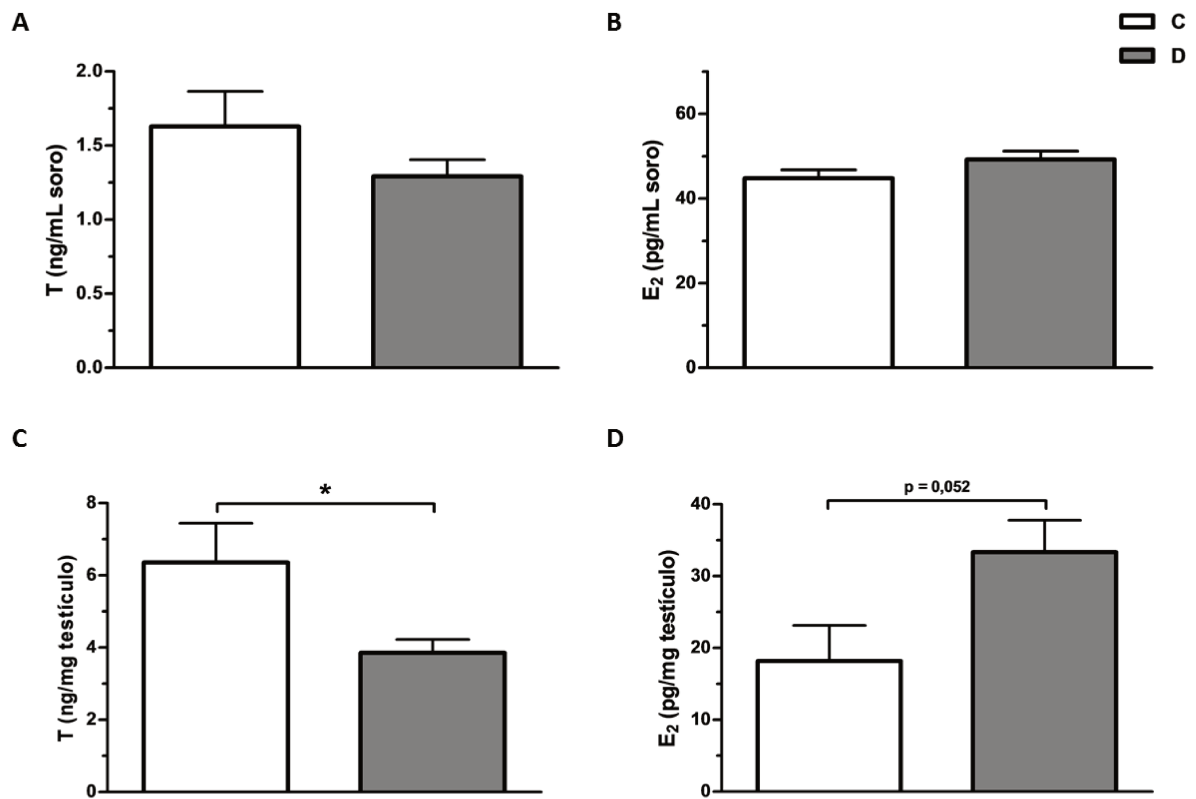


Figura 1. Perfil hormonal dos gerbilos dos grupos Controle (C) e Dieta (D). **A e B.** Níveis séricos de testosterona (T) e estradiol (E₂), respectivamente. **C e D.** Níveis intratesticulares de T e E₂, respectivamente. As dosagens séricas e intratesticulares foram realizadas em 10 e 7 animais por grupo, respectivamente. Valores expressos como média $\pm$ SEM. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

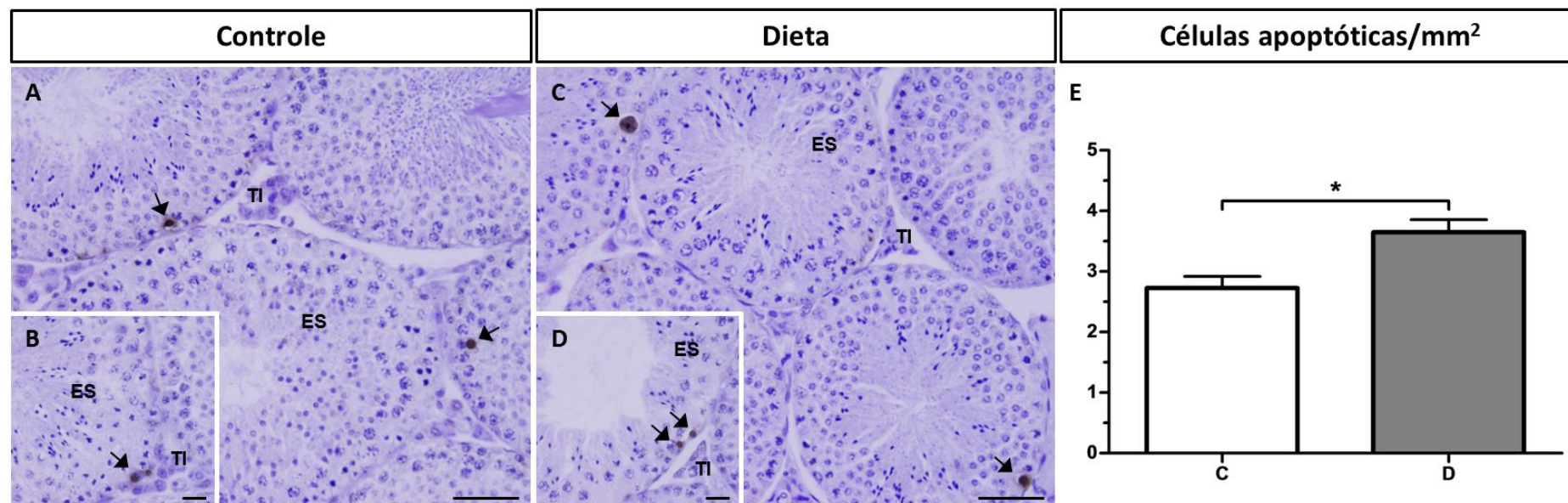


Figura 2. Seções histológicas de testículos de gerbilos submetidos à reação de TUNEL para detecção de células apoptóticas nos grupos Controle (C; **A** e **B**) e Dieta (D; **C** e **D**). As setas indicam células em apoptose. Foram analisados cinco corco de cinco animais distintos por grupo experimental. ES: epitélio seminífero; TI: tecido intersticial. Barras: 50µm (**A** e **C**) e 20µm (**B** e **D**). **E.** Densidade relativa de células apoptóticas nos grupos C e D. Valores expressos como média $\pm$ SEM. * indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

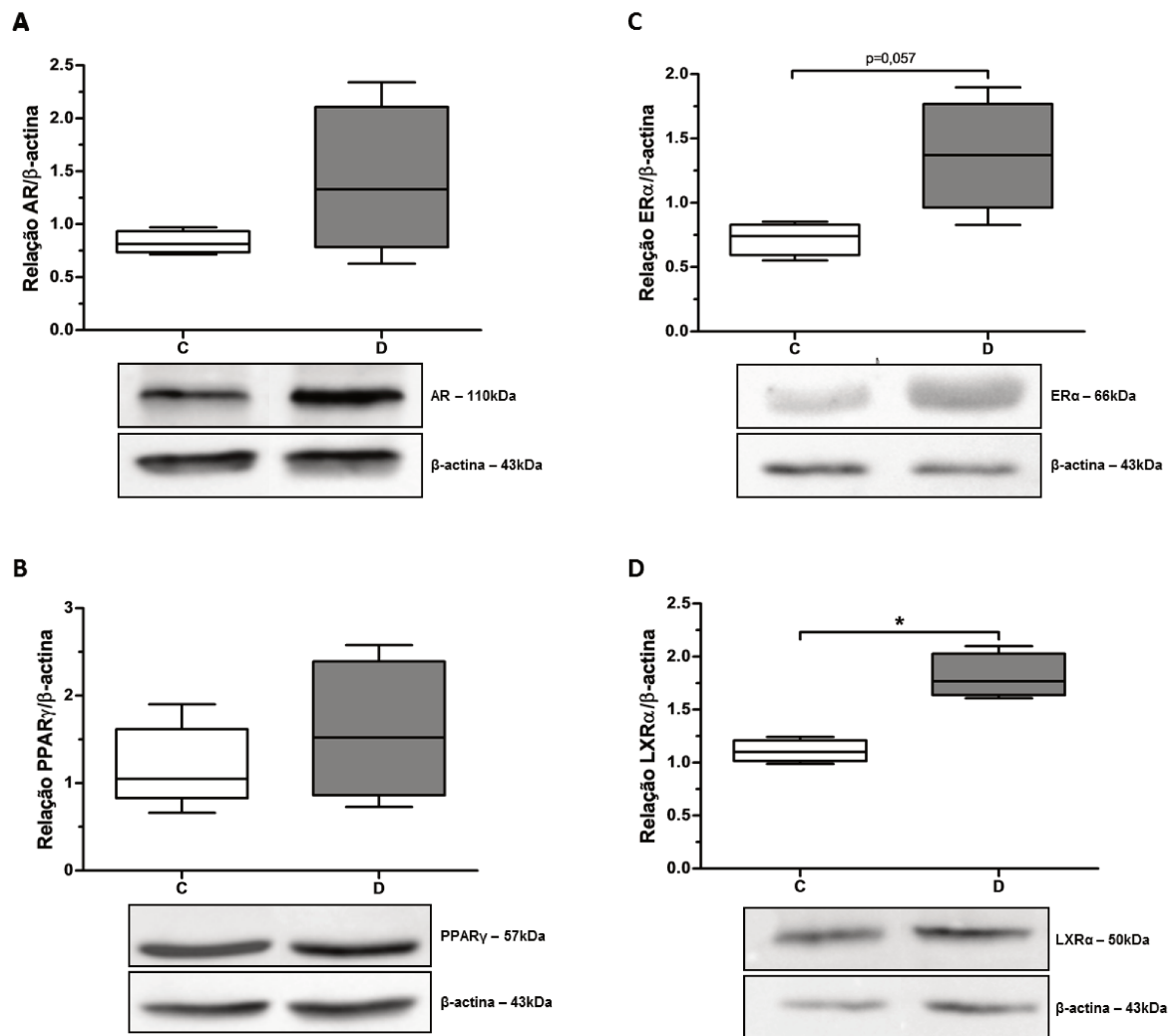


Figura 3. Determinação da expressão de receptor de andrógeno (AR; **A**), receptor ativado de proliferação de peroxissomos γ (PPAR γ ; **B**), receptor de estrógeno α (ER α ; **C**) e receptor X do fígado α (LXR α ; **D**) nos testículos dos gerbilos dos grupos Controle (C) e Dieta (D), normalizados pela expressão de β -actina, a qual foi usada como controle positivo. n= 4 animais por grupo. * indica diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

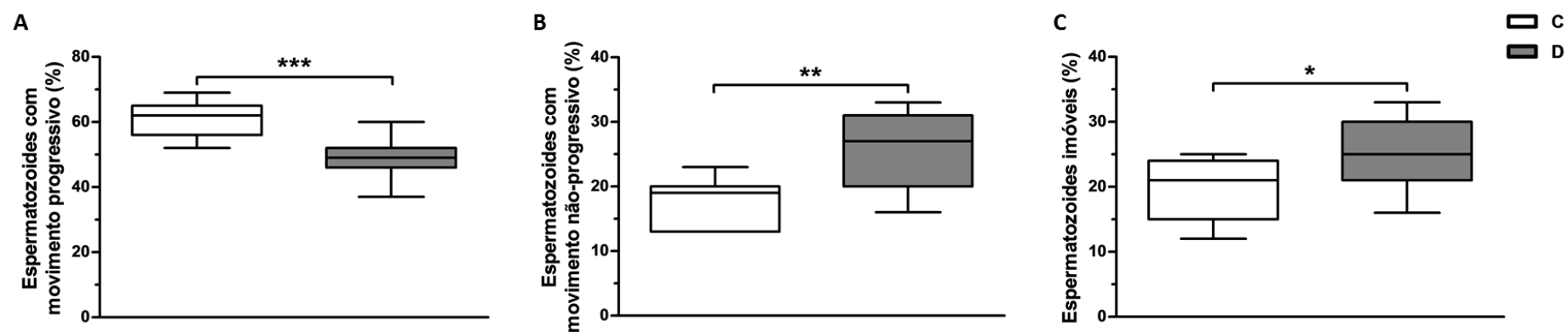


Figura 4. Motilidade dos espermatozoides dos gerbilos dos grupos Controle (C) e Dieta (D). Os espermatozoides classificados de acordo com o tipo de movimento apresentado: movimento progressivo, movimento não progressivo e imóvel. n= 10 animais por grupo. * indica diferença estatística entre os grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

IV CONCLUSÕES

- A exposição gestacional ao desregulador endócrino di-n-butil ftalato causa perturbações no metabolismo lipídico e na síntese de estradiol do gerbilo, resultando em danos para a reserva e a motilidade espermática.
- A ingestão materna de óleo de milho leva a alterações no metabolismo lipídico e nos níveis circulantes de estradiol, além de causar alterações nos parâmetros espermáticos do gerbilos na idade adulta.
- O óleo de milho não é um bom diluidor de substâncias lipossolúveis para ser utilizado em estudos acerca da toxicologia reprodutiva para o gerbilo, uma vez que, *per se*, causa perturbações funcionais no testículo e interfere na resposta reprodutiva do DBP.
- O consumo de dieta enriquecida com lipídios saturados provenientes da banha de porco causa alterações metabólicas, como obesidade e hipercolesterolemia, altera a esteroidogênese testicular e compromete a motilidade espermática do gerbilo da Mongólia.

V REFERÊNCIAS

- Ahima RS, Flier JS. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327-332.
- Aitken RJ, Clarkson JS. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81: 459-469.
- Aitken RJ, Sutton M, Waner P, Richarson DW. 1985. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamsters oocytes. *J Reprod Fertil* 73(2): 441-449.
- Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR. 1987. *Cell death in spermatogenesis*. Perspectives on mammalian cell death. CS Potten. Oxford University Press, London, 229-258.
- Anderson WA, Castle L, Scotter MJ, Massey RC, Sringall C. 2001. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit Contam* 18: 1068-1074.
- Andrade AJM, Grande SW, Talsness CE, Gerickea C, Grote K, Golombiewski A *et al.* 2006. A dose response study following *in utero* and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology* 228: 85-97.
- Antoniassi JQ, Fochi RA, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR. Corticosterone influences gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostatic morphophysiology and alters its proliferation and apoptosis rates. *Int J Exp Pathol* 98(3): 134-146. doi: 10.1111/iep.12232.
- Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J. 2003. The effects on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisfenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci* 74(1): 129-138.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. 2011. The effects of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 34: 402-410.
- Bao AM, Man XM, Guo XJ, Dong HB, Wang FQ, Sun H *et al.* 2011. Effects of di-n-butyl phthalate on male rat reproduction following pubertal exposure. *Asian J Androl* 13: 702-709.
- Bauche F, Fouchard MH, Jegou B. 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* 349: 392-396.
- Beu CC, Orsi AM, Domeniconi RF. 2009. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. *Anat Histol Embryol* 38(1): 49-57.

- Bila DM, Dezotti M. 2007. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Quim Nova* 30(3): 651-666.
- Björndahl L. 2010. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl* 12: 33-35.
- Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, Needham LL, Pirkle JL, Sampson EJ *et al.* 2000. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* 108: 979-982.
- Boulogne B, Olaso R, Levacher C, Durand P, Habert R. 1999. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. *Int J Androl* 22: 356-365.
- Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137: 354-66.
- Brodie AM. 1985. Aromatase inhibition and its pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol* 34: 3213-3219.
- Brooks DE. 1983. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci* 36(3): 205-221.
- Broughton DE, Moley KH. 2017. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertil Steril* 107(4): 840-847. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.017.
- Brown AE. 1999. *Pesticides and the endocrine system*. College Park: Department of Entomology, University of Maryland. Pesticide Information Leaflet Series, 34.
- Calafat AM, Brock JW, Silva MJ, Gray LE Jr, Reidy JA, Barr DB, Needham LL. 2006. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. *Toxicology* 217: 2-30.
- Cao G, Liang Y, Jiang XC, Eacho PI. 2002. Liver X receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Drug News Perspect* 17: 35-41.
- Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FR, Bouraima-Lelong H, Delalande C. 2011. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci* 89(15-16): 584-587. doi: 10.1016/j.lfs.2011.06.004.
- Carruthers CM, Foster PMD. 2005. Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate. *Birth Defects Res B* 74: 277-285.
- Christensen AK. 1975. *Leydig cells*. In: Greep RO, Astwood EB (eds) *Handbook of Physiology*. American Physiological Society, Washington DC, 5(7): 57-94.

- Christiansen S, Boerg J, Axelstad M, Dalgaard M, Vinggaard AM, Metzdorff SB, Hass U. 2010. Low-dose perinatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats. *Reprod Toxicol* 30: 313-321.
- Chung WS, Sohn JH, Park YY. 1999. Is obesity an underlying factor in erectile dysfunction? *Eur Urol* 36: 68-70.
- Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. 1998. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update* 4: 73-82.
- Coetzee K, Kruger TF, Menkveld R, Swanson RJ, Lombard CJ, Acosta AA. 1989 The usefulness of the sperm penetration assay in fertility prediction. *Arch Androl* 23: 207-212.
- Corton JC, Lampinskas PJ. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci* 83(1): 4-17.
- Creasy DM. 2001. Pathogenesis of male reproductive toxicity. *Toxicol Pathol* 29(1): 64-76.
- de Jesus MM, Negrin AC, Taboga SR, Pinto-Fochi ME, Góes RM. 2015. Histopathological alterations in the prostates of Mongolian gerbils exposed to a high-fat diet and di-n-butyl phthalate individually or in combination. *Reprod Toxicol* 52: 26-39.
- Delbès G, Duquenne C, Szenker J, Taccon J, Habert R, Levacher C. 2007. Developmental changes in testicular sensitivity to estrogens throughout fetal and neonatal life. *Toxicol Sci* 99: 234-243.
- Desai M, Beall M, Ross MG. 2013. Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis. *Curr Diab Rep* 13(1): 27-33. doi: 10.1007/s11892-012-0344-x.
- Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. 2010. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol* 7(3): 153-61. doi: 10.1038/nrurol.2010.6
- Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Brock JW, Ryan L, Chen Z *et al.* 2004. The relationship between environmental exposure to phthalates and computeraided sperm analysis motion parameters. *J Androl* 25: 293-302.
- Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z *et al.* 2003. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14: 269-277.
- Dym M, Fawcett DW. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3: 308-326.
- Escobar ELO, Gomes-Marconder MCC, Carvalho HF. 2009. Dietary fatty acid quality affects AR and PPAR γ levels and prostate growth. *Prostate* 69: 548-558.
- Escrich E, Moral R, Grau L, Costa I, Solanas M. 2007. Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. *Mol Nutr Food Res* 51: 1279-1292.

- Esposito K, Giugliano F, Di Palo C, Giugliano G, Marfella R, D'Andrea F *et al.* 2004. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 291: 2978-2984.
- Evans RM, Barish GD, Wang Y. 2004. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 10(4): 355–361.
- Fernandez CBD, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF *et al.* 2011. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 32. doi: 10.1186/1477-7827-9-32.
- Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM. 2003. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using *in-utero* exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reprod* 18: 1383–1394.
- Fisher JS. 2004. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* 127: 305-315.
- Foster PM, Cattley RC, Mylchreest E. 2000. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food Chem Toxicol* 38(1 Suppl): S97-9.
- Foster PMD. 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following *in utero* exposure to phthalate esters. *Int J Androl* 29: 140-147.
- Fraczek M, Kurpysz M. 2007. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl* 28: 325–333.
- Frederiksen H, Aksglaede L, Sorensen K, Skakkebaek NE, Juul A, Andersson AM. 2011. Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake. *Environ Res* 111: 656-663.
- Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. 2003. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl* 5: 231–242.
- Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A. 1994. Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 997–1000.
- Giribabu N, Sainath SB, Reddy PS. 2012. Prenatal di-n-butyl phthalate exposure alters reproductive functions at adulthood in male rats. *Environ Toxicol* 29(5): 534-544. doi: 10.1002/tox.21779
- Gray TJB, Gangolli SD. 1986. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect* 65: 229-235.
- Gray TJ, Rowland IR, Foster PM, Gangolli SD. 1982. Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol Lett* 11: 141–147.

- Grun F, Blumberg B. 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147: 50–55. doi: 10.1210/en.2005-1129
- Guh DP, Zhang W, Banskack N, Amarsi Z, Birmingham L, Anis AH. 2009. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 9:88.
- Guo F, Jen KLC. 1995. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 57(4), 681-686.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C *et al.* 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345: 1388-1393.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrel DT. 2006. Obesity and male reproductive potential. *J Androl* 27(5): 619-626.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. 2008. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 90: 897-904.
- Hatch EE, Nelson JW, Stahlhut RW, Webster TF. 2010. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiologic studies. *Int J Androl* 33(2): 324–332.
- Hauser R, Calafat AM. 2005. Phthalates and human health. *Occup Environ Med* 62: 806–818.
- Hauser R. 2006. The environment and male fertility: recent research on emerging chemicals and semen quality. *Semin Reprod Med* 24: 156–167.
- Hazra R, Jimenez M, Desai R, Handelsman DJ, Allan CM. 2013. Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function and population size. *Endocrinology* 154(9): 3410-3422.
- Heng K, Anand-Ivell R, Teerds K, Ivell R. 2012. The endocrine disruptors dibutyl phthalate (DBP) and diethylstilbestrol (DES) influence Leydig cell regeneration following ethane dimethane sulphonate treatment of adult male rats. *Int J Androl* 35: 353-363.
- Hess RA, Zhou Q, Nie R. 2002. *The role of estrogens in the endocrine and paracrine regulation of the efferent ductules, epididymis and vas deferens the epididymis*. Edited by: Robaire B and Hinton B T. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 317-338.
- Higuchi TT, Palmer JS, Gray LE Jr, Veeramachaneni DN. 2003. Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following *in utero*, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci* 72(2): 301-13.
- Hill JO, Lin D, Yakubu F, and Peters JC. 1992. Development of dietary obesity in rats: Influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes* 16, 321-333.

- Hooper L, Summerbell CD, Thompson R, Sills D, Roberts FG, Moore HJ, Davey Smith G. 2011. Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD002137.
- Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, Lambright CR, Rider CV, Blystone CR *et al.* 2008. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague-Dawley rat in a cumulative, dose-additive manner. *Toxicol Sci* 105(1): 153-165.
- Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. 2009. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int* 35: 14-20.
- Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. 1996. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* 26(4): 365-481.
- IPCS. 2002. *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. <http://ehp.niehs.nih.gov/who/preface.pdf>.Eds
- Jen KLC. 1980. The effect of high fat diet on the behavioral patterns of male rats. *Physiol Behav* 25, 373-381.
- Jensen TK, Heitmann BL, Jensen MB, Halldorsson TI, Anderson AM, Skakkebaek NE *et al.* 2013. High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population. *Am J Clin Nutr* 97: 411-418.
- Jones R, Mann T, Shering P. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 3: 531-537.
- Juana L, Bárbara VG, Martín MT, Agustín C, Guillermo RB, Guadalupe O. 2010. Neither testosterone levels nor aggression decrease when the male Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) displays paternal behavior. *Horm Behav* 57(3): 271-275.
- Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster PMD *et al.* 2002. Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 16: 529-653.
- Kavlock RJ, Daston GR, Derosa C, Fenner-Crisp P, Gray E, Kaattari S *et al.* 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored Workshop. *Environ Health Perspec* 104(4): 715-740.
- Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-2556.

- Kim J, Ghosh SR, Well ACP, Zirkin BR. 2001. Caspase-3 and Caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology* 142(9): 3809–3816.
- Kirschner MA, Schneider G, Ertel NH, Worton E. 1982. Obesity, androgens, estrogens, and cancer risk. *Cancer Res* 42: 3281-3285.
- Kleymenova E, Swanson C, Boekelheide K, Gaido KW. 2005. Exposure *in utero* to di(n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biol Reprod* 73: 482–490.
- Kluwe WM. 1982. Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. *Environ Health Perspect* 45: 3-10.
- Koch HM, Becker K, Wittassek M, Seiwert M, Angerer J, Kolossa-Gehring M. 2007. Di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate – urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German environmental survey on children. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 17: 378-387.
- Koch HM, Drexler H, Angerer J. 2003. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health* 206: 77–83.
- Kondo F, Ikai Y, Hayashi R, Okumura M, Takatori S, Nakazawa H *et al.* 2010. Determination of five phthalate monoesters in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* 85: 92-96.
- 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.
- Kris-Etherton PM, Innis S, Ammerican DA. 2007. Dietitians of Canada. Position of the american dietetic association and dietitians of Canada: dietary fatty acids. *J Am Diet Assoc* 107: 1599–611.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138: 863–870.
- Lake BG, Brantom PG, Gangolli SD, Butterworth KR, Grasso P. 1976. Studies on the effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the ferret. *Toxicology* 6: 341–356.
- Latini G. 2005. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta* 361(1-2): 20-29.
- Leblond CP, Clermont Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfuric acid' technique. *Am J Anat* 90: 167–206.

- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 67: 142–147.
- Li X, Jiang L, Cheng L, Chen H. 2014. Dibutyl phthalate-induced neurotoxicity in the brain of immature and mature rat offspring. *Brain Dev* 36(8): 653-660.
- Lordelo RA, Mancini MC, Cercato C, Halpern A. 2007. Eixos hormonais na obesidade: causa ou efeito? *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(1): 34-41.
- Loureiro IR. 2002. *A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara*. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Lubrano C, Genovesi G, Specchia P, Costantini D, Mariani S, Petrangeli E *et al.* 2013. Obesity and metabolic comorbidities: environmental diseases? *Oxid Med Cell Longev* 640673. doi: 10.1155/2013/640673.
- Lubrano C. 2008. Obesità e inquinamento. *Sicurezza Sanitaria* 98: 38–45.
- Lubrano C. 2009. Interferenti endocrini e obesità . *Geni e comportamenti. Scienza e arte della vita*, F. Bottaccioli, Ed., 219–226. Red Edizioni, Milan, Italy.
- Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M *et al.* 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 114: 270-276.
- Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. 2013. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *Plos One* 8(1).
- Matsumoto T, Takeyama K, Sato T, Kato S. 2005. Study of androgen receptor functions by genetic models. *J Biochem* 138(2):105–110.
- Meistrich ML. 1984. Stage specific sensitivity of spermatogonia to different chemotherapeutic drugs. *Biomed Pharmacother* 38: 137-142.
- Mendi-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65: 660–671.
- Menkveld R, Holleboom CA, Rhemrev JP. 2011. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl* 13: 59–68.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. 1990. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 5(5): 586-92.

- Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG, Habert R. 2007. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *PNAS* 104, 3615-3620.
- Moore RW, Rudy TA, Lin T, Ko K, Peterson RE. 2001. Abnormalities of sexual development in male rats with *in utero* and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 109(3): 229-237.
- Mortensen GK, Main KM, Andersson AM, Leffers H, Skakkebaek NE. 2005. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal Bioanal Chem* 382: 1084-1092.
- Muczynsky V, Cravedi JP, Lehraiki A, Moisin D, Lecureuil C, Messiaen S *et al.* 2012. Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on human and mouse fetal testis: *In vitro* and *in vivo* approaches. *Toxicol Appl Pharmacol* 261(1): 97-104.
- Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, Foster PM. 1999. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 156(2): 81-95.
- Negrin AC. 2014. *Efeitos combinados da exposição ao di-n-butil ftalato e à dieta hiperlipídica sobre a estrutura e função testicular de gerbilos adultos*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.
- Newbold RR. 2010. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones* 9: 206-217. doi: 10.1.1.609.694
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 22(3): 289-318.
- Olujini OO, Fatoki OS, Odendaal JP, Okonkwo JO. 2010. Endocrine disrupting chemicals (phenol and phthalates) in the South African environment: a need for more monitoring. *Water SA* 36: 671-682.
- Orgebin-Crist MC, Tichenor PL. 1973. Effect of testosterone on sperm maturation *in vitro*. *Nature* 245: 328-329.
- Orth JM. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203: 485-492.
- Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE. 2000. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 58(2): 339-349.
- Pasquali R, Patton L, Gambineri A. 2007. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14: 482-487.

- Pasquali R. 2006. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas* 54, 363-371.
- Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PQ. 2008. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril* 90: 346-351.
- Perez APS, Biancardi MF, Góes RM, Santos FA, Taboga SR. 2011. Exposure to ethinylestradiol during prenatal development and postnatal supplementation with testosterone causes morphophysiological alterations in the prostate of male and female adult gerbils. *Int J Exp Path* 92: 121-130.
- Pinheiro PFF, Almeida CCD, Segatelli TM, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2003. Structure of the pelvic and penile urethra – relationship with the ducts of the sex accessory glands of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Anat* 202: 431-444.
- Pinto ME, Botta LS, Taboga SR, Góes RM. 2010a. Neonatal gonocyte differentiation in Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of transitional cell stage. *Anat Rec* 293(2): 310-419.
- Pinto ME, Egydio FM, Taboga SR, Mendis-Handagama SMLC, Góes RM. 2010b. Differentiation of Leydig cells in the Mongolian gerbil. *Microsc Res Tech* 73(2): 119-127.
- Pinto-Fochi ME, Negrin AC, Scarano WR, Taboga SR, Góes RM. 2016a. Sperm parameters and sexual maturation of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Reprod, Fertil Dev* 28: 815–823.
- Pinto-Fochi ME, Pytlowanciv EZ, Reame V, Rafacho A, Ribeiro DL, Taboga SR, Góes RM. 2016b. A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. *Reproduction* 152(6): 795–808. doi: 10.1530/REP-16-0072
- Rabbani SI, Devi K, Khanam S. 2010. Pioglitazone, a PPAR-gamma ligand inhibited the nicotinamide-streptozotocin induced sperm abnormalities in type-2 diabetic Wistar rats. *Pak J Pharm Sci* 23: 326–331.
- Rato L, Alves MG, Dias TR, Lopes G, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. 2013. High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters. *Andrology* 1(3): 495-504. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00071
- Razolli M, Papa R, Valsecchi P, Nonnismarzano F. 2003. AFLP to assess genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Hered* 94, 507-511.
- 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, 1-10.
- Robinson DG. 1974. The anatomy of the Mongolian gerbil. *Publisher's Foreword, USA*.
- Rudel RA, Perovich LJ. 2009. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmos. Environ* 43: 170–181.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *J Androl* 16(1): 83.
- Russell LD. 1993. *Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells*. In: Russell LD, Griswold MD. (eds) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL, pp 1–38.
- Ryu JY, Lee BM, Kacew S, Kim HS. 2007. Identification of differentially expressed genes in the testis of Sprague-Dawley rats treated with di(n-butyl) phthalate. *Toxicology* 234: 103-122.
- Saltzman W, Thinda S, Higgins AL, Matsumoto WR, Ahmed S, Mcgeehan L, Kolb EM. 2009. Effects of siblings on reproductive maturation and infanticidal behavior in cooperatively breeding Mongolian gerbils. *Dev Psychobiol* 51: 60-72.
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, de Campos SG, Júnio LA, Felisbino SL *et al*. 2009. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: Proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology* 262: 215-223.
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Pinheiro PFF, Domeniconi RF, Felisbino SL *et al*. 2010. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) *in utero* and during lactation. *J. Toxicol Environ Health A* 73(13-14): 972-984.
- Schwentker V. 1963. The gerbil – a new laboratory animal. *Veterinarian* 6: 5-9.
- Segatelli TM, Almeida CC, Pinheiro PF, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2000. Ultrastructural study of acrosome formation in Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell* 32: 508-507.
- Segatelli TM, Almeida CCD, Pinheiro PFF, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2002. Kinetics of spermatogenesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell* 34(1): 7-13.
- Segatelli TM, França LR, Pinheiro PFF, Almeida CCD, Martinez M, Martinez FE. 2004. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Androl* 25(6): 872-880.

- Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar M. 1994. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil* 101(1): 193-198.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. 2003. Proliferations and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125: 769-784.
- Sharpe RM. 1994. *Regulation of spermatogenesis*. In The Physiology of Eds E Knobil and JD Neill. Raven Press, New York Reproduction, 1363–1434
- Sharpe RM. 2001. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol Lett* 120: 221–232.
- Sharpe RM. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Phil Trans R Soc B* 365: 1697-1712.
- Shea KM. 2003. Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics* 111: 1467-1474.
- Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. 2011. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem* 44(4): 319-24. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.11.009
- Silva MJ, Reidy JA, Herbert AR, Preau Jr. JL, Needham LL, Calafat AM. 2004. Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull Environ Contam Toxicol* 72: 1226-1231.
- Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 136: 2770–2775.
- Sinha Hikim APS, Swerdloff RS. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4: 38–47.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis* 35(1):1-10.
- Swan SH. 2008. Environmental phthalate exposures in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res* 108(2), 177-184. doi: 10.1016/j.envres.2008.08.007
- Tanaka A, Matsumoto A, Yamaha T. 1978. Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. *Toxicology* 9: 109-123.
- Tang-Péronard JL, Andersen HR, Jensen TK, Heitmann BL. 2011. Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: a review. *Obes Rev* 12: 622-36.

- Thomas JA, Thomas MJ. 1984. Biological effects of di-(2-ethyl-hexyl) phthalate and other phthalic acid esters. *Crit Rev Toxicol* 13: 283-317.
- Thomas K, Sung DY, Chen X, Thompson W, Chen YE, McCarrey J *et al.* 2011. Developmental patterns of PPAR and RXR gene expression during spermatogenesis. *Front Biosci* 3: 1209-1220.
- Thomas K, Sung DY, Chen X, Thompson W, Chen YE, McCarrey J *et al.* 2011. Developmental patterns of PPAR and RXR gene expression during spermatogenesis. *Front Biosci (Elite Ed)* 3: 1209–1220.
- Tymchuk CN, Tessler SB, Aronson WJ, Barnard RJ. 1998. Effects of diet and exercise on insulin, sex hormone-binding globulin, and prostate-specific antigen. *Nutr Cancer* 31: 127-31.
- US, EPA. 1997. *Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis*. U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington DC.
- US, EPA. 2006. *Toxicological Review of Dibutyl Phthalate (di-n-Butyl Phthalate)*. U.S. Environmental protection Agency, CAS No. 84-74-2.
- Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. 2001. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 7: 495–500.
- Vigueras-Villasenor RM, Moreno-Mendoza NA, Reyes-Torres G, Molina-Ortiz D, León MC, Rojas-Castañeda JC. 2006. The effect of estrogen on testicular gonocyte maturation. *Reprod Toxicol* 22: 513–520.
- Waissmann W. 2002. Health surveillance and endocrine disruptors. *Cad Saúde Pública* 18(2): 511-517.
- Wilson JD. 1978. Sexual differentiation. *Annu Rev Physiol* 40: 279-306.
- Wittassek M, Angerer J, Kolossa-Gehring M, Schäfer SD, Klockenbusch W, Dobler L *et al.* Fetal exposure to phthalates - a pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 212(5): 492-498.
- World health organization. *Obesity*. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 20 jul. 2011.
- Yenuqu S, Hamil KG, French FS, Hall FH. 2006. Antimicrobial actions of human and macaque sperm associated antigen 11 isoforms: influence of the N-terminal peptide. *Mol Cell Biochem* 284: 25-37.

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA. 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* 23:870–881.

VI ANEXOS



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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto/disciplina de pesquisa intitulado "**Interferências da exposição *in utero* ao di-n-butil ftalato e do consumo excessivo de lipídios saturados sobre os parâmetros reprodutivos e a histologia prostática do gerbilo**" (protocolo nº. 093/2014 - 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 13 de maio de 2014.

CERTIFICATE

Certify that the project / research discipline entitled "Interference of in utero exposure to di-n-butyl phthalate and excessive saturated fat intake on reproductive parameters and prostate histology gerbil" (protocol no. 093/2014 - CEUA), under the responsibility of Professora Doutora Rejane Maira Góes, 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 May 13, 2014.

São José do Rio Preto, 13 de maio de 2014.

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Vice-Presidente da CEUA

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congresso sujeitos a arbitragem, que constam de minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado intitulada **"INTERFERÊNCIAS DA EXPOSIÇÃO IN UTERO AO DI-N-BUTIL FTALATO E DO CONSUMO EXCESSIVO DE LIPÍDIOS SATURADOS PARA OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DO GERBILO"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 21 de maio de 2018.

Assinatura: Ana Carolina Negrin

Nome do(a) autor(a): **Ana Carolina Negrin**

RG n.º: 42606510-4

Assinatura: Rejane Maira Góes

Nome do(a) orientador(a): **Rejane Maira Góes**

RG n.º: 17404810