



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

NÚCLEO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO HUMANA E ANIMAL

CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

Leonardo Toshio Oshio

**Avaliação dos efeitos da dieta hipercalórica paterna sobre o metabolismo e a
fertilidade de gerações F1 e F2 de ratos Wistar**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Maria Peters

JUIZ DE FORA

MINAS GERAIS – BRASIL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

NÚCLEO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO HUMANA E ANIMAL

CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

Leonardo Toshio Oshio

Avaliação dos efeitos da dieta hipercalórica paterna sobre o metabolismo e a fertilidade de gerações F1 e F2 de ratos Wistar

Tese apresentada à banca avaliadora do Programa de Pós-graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Peters

JUIZ DE FORA

MINAS GERAIS – BRASIL

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oshio, Leonardo Toshio.

Avaliação dos efeitos da dieta hipercalórica paterna sobre o metabolismo e a fertilidade de gerações F1 e F2 de ratos Wistar / Leonardo Toshio Oshio. – 2019.

134 f.

Orientadora: Vera Maria Peters

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Infertilidade Masculina. 2. Epigenética. 3. Dieta Hipercalórica. 4. Ratos Wistar. 5. Testículo. I. Peters, Vera Maria, orient. II. Título.

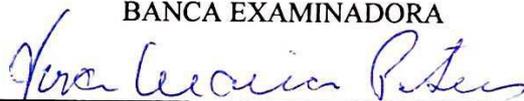
LEONARDO TOSHIO OSHIO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETA HIPERCALÓRICA PATERNA SOBRE O METABOLISMO E A FERTILIDADE DE GERAÇÕES F1 E F2 DE RATOS WISTAR

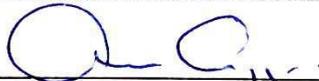
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde - Área de Concentração: Saúde Brasileira

Aprovada em: 11/07/2019

BANCA EXAMINADORA



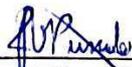
Prof. Dra. Vera Maria Peters – Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dra. Ana Eliza Andreazzi
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Juliano Vogas Peixoto
Universidade Federal de Lavras



Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta
Universidade Federal de Viçosa

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a todos que ousam lutar pelos seus sonhos e anseios, e para aqueles que defendem veementemente, o que lhes é mais caro.

AGRADECIMENTOS

As singelas linhas que aqui escrevo não conseguem dimensionar toda a ajuda que eu tive para terminar este trabalho de doutorado. Foram muitas as pessoas que me auxiliaram nesta jornada. Caso eu não mencione algum nome, peço desculpas, embora o esquecimento não tenha sido intencional.

O projeto foi financiado pelas Redes Mineiras de Bioterismo e Toxicologia da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e, sem as quais, também não teria sido possível a sua realização. O mesmo apoio foi fornecido pela Pós-graduação em Saúde e da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Prof^{as} Dr^{as} Vera Maria Peters, Martha de Oliveira Guerra e Ana Eliza Andreazzi, sem as quais, este trabalho não teria sido concluído. As palavras têm um poder incentivador e, quando proferidas de nossos orientadores, nos impulsionam a terminá-lo. Obrigado!

Também gostaria de agradecer ao Centro de Biologia da Reprodução, que não só me forneceu a estrutura, como os insumos necessários, os animais e o corpo técnico que me auxiliaram nas etapas práticas do trabalho. Minha gratidão a Elizabete Oliveira, Julieta Barra, Paulo Matola, Sr. José Carlos, Lílian, Lorena Ribeiro, Samara Rodrigues, Djenanne Granato, Raquel Leite, Mariana Fonseca, Evelise, Luiz Carlos Franco, Pedro Bellei, Jessica Bezerra, Bruno Pereira, Ana Paula Lélis, Flávia Monteiro, Andressa Ferreira e a todos que compõem o centro.

Não poderia deixar de agradecer a companhia e amizade dos meus colegas e amigos de pós-graduação sem os quais, a rotina teria sido mais difícil: Gabriel Lade, Priscila Arbex, Daniela Carvalho, Tamiris Schaeffer, Marcella Terra, Leandro Véspoli, Paulo Suassuna e Álvaro Dutra.

Agradeço, em especial, os meus amigos que atuaram diretamente no projeto e nas análises: Mariana Bolotari, Vinícius Moreira Gonçalves Costa, Jéssica Ferraz Lopes e Jackson Pereira de Sá. Eles se tornaram verdadeiros irmãos. Grato a todos!

Ao Centro Universitário Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), meu local de trabalho, que me proporcionou conciliar o doutorado com as aulas que ministro. Também agradeço os meus alunos que me ensinaram, nestes quatro anos, em como ser um professor melhor e a buscar sempre a excelência na área acadêmica.

Aos meus amigos-irmãos que me motivaram sempre: Fábio Oliveira, Paloma Sayegh, Daniela Pavanelli, Cleide Soares, Hussen Machado, Juliana Munique, Felipe Martins, Vania Tsuchiya, Renata Nehme e Gabriela Polli. Não devo esquecer o meu antigo local de trabalho, a Clínica Veterinária São Francisco, em especial ao Dr. Ricardo Palhares Zschaber de Araújo, que foi a pessoa que me confiou e me apresentou ao CBR e à Prof^a Vera há 11 anos.

Meus agradecimentos especiais à minha família: *Katian*, *Totian*, minha irmã Simony e meu cunhado Gustavo, que compreenderam minhas ausências em muitos momentos e me apoiaram incondicionalmente em minhas decisões.

Por fim, gostaria de agradecer, do fundo do coração, a todos os animais que passaram pelas minhas mãos, seja de qual maneira eles tenham entrado em minha vida. Não só como os meus animais de estimação, mas como os meus pacientes e os meus animais de pesquisa. Ensinaamentos mudos, sem dúvida, porém os mais sinceros. Destes, em especial, devo citar o *Kenzo*, que ficou do meu lado e me ajudou a escrever uma dissertação, uma tese e alguns artigos...

A todos, o meu **どうもありがとうございます** (muito obrigado)!

“Uma viagem de mil milhas começa com um passo”

Lao Tsé

RESUMO

O aumento de ingestão de gorduras e carboidratos, que se baseia a dieta ocidental, é uma importante modificação do estilo de vida que fornece aporte hipercalórico aos indivíduos. Associada ao balanço energético positivo, pode causar obesidade e trazer consequências à fertilidade masculina. Além dos impactos negativos na geração parental submetida, a transmissão epigenética pode predispor as gerações descendentes às doenças crônicas como a própria obesidade, diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer e até desordens comportamentais e reprodutivas. No presente estudo, buscou-se avaliar a influência de uma dieta hipercalórica rica em gordura e carboidratos simples (sacarose) fornecida a ratos dos 25-90 dias de vida) sobre parâmetros reprodutivos e metabólicos nas gerações masculinas F0, F1 e F2. A dieta hipercalórica foi eficiente em promover o quadro de dislipidemia, maior coeficiente de eficiência energética, que foi refletido no aumento de adiposidade e menor peso relativo de órgãos como fígado, baço e adrenais e maior peso médio dos rins da geração F0. Também ocasionou alterações no sistema reprodutor masculino, com redução do peso médio e do parênquima dos testículos e menor altura do epitélio dos túbulos seminíferos. Os ratos descendentes das gerações F1 e F2, cujos pais foram expostos à dieta hipercalórica apresentaram precocidade do início do desenvolvimento puberal. Houve alterações histométricas testiculares com redução da altura do epitélio seminífero e aumento da densidade volumétrica e volume do compartimento testicular intertubular e redução da densidade volumétrica do compartimento testicular tubular nos ratos do grupo da geração F1 descendente dos ratos expostos à dieta hipercalórica. Também ocorreram alterações histométricas na densidade volumétrica e volume testiculares intertubulares,

especificamente da matriz extracelular, espaço linfático e das células de Leydig das gerações descendentes expostas F1 e F2. Ainda são necessários estudos mais profundos, porém tem-se que, como conclusão, o modelo experimental utilizado para a dieta hipercalórica alterou parâmetros reprodutivos e metabólicos dos animais de geração F0, com efeito nos animais de gerações F1 e F2 de ratos Wistar.

Palavras-chave: dieta hipercalórica, infertilidade masculina, ratos, testículos, epigenética.

ABSTRACT

The increased intake of fat and carbohydrates that is based on the Western diet is an important lifestyle modification that provides hypercaloric input to individuals. Associated with positive energy balance, it can cause obesity and bring consequences to male fertility. In addition to negative impacts on parental generation, epigenetic transmission may predispose descended generations to chronic diseases such as obesity, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, cancer, and even behavioral and reproductive disorders. In the present study, it was sought to evaluate the influence of a high calorie diet rich in fat and simple carbohydrates (sucrose) supplied to rats from weaning to adulthood (25-90 days of life) on reproductive and metabolic parameters in the male generations F0, F1 and F2. The hypercaloric diet was efficient in promoting dyslipidemia, a higher energy efficiency coefficient, which was reflected in the increase in adiposity and lower relative weight of organs such as liver, spleen and adrenal glands and higher mean weight of the kidneys of the F0 generation. It also caused alterations in the male reproductive system, with reduction of the mean weight and the parenchyma weight of the testicles and lower height of the epithelium of the seminiferous tubules. The offspring of the F1 and F2 generations, whose parents were exposed to the hypercaloric diet, showed early pubertal development. There were histometric testicular alterations with reduction of the height of the seminiferous epithelium and increase of the volume density and volume of the intertubular testicular compartment and reduction of the volume density of the testicular tubular compartment in the rats of the F1 generation group of the rats exposed to the hypercaloric diet. There were also histometric changes in volume density and intertubular testicular volume, specifically the

extracellular matrix, lymphatic space and Leydig cells of the F1 and F2 offspring generations. Further studies are necessary, however, it is concluded that the experimental model used for the hypercaloric diet altered the reproductive and metabolic parameters of the F0 generation animals, with effect on the F1 and F2 generations of Wistar rats.

Keywords: hypercaloric diet, male infertility, rats, testes, epigenetics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT – aporte calórico total

AdipoR2 – receptores para adiponectina do tipo 2

AE – altura do epitélio seminífero

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

BPA – bisfenol policlorinado

CBR – Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora

CEE – coeficiente de eficiência energética

CIAEP – Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa

CNA – comprimento nasoanal

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COT – colesterol total

CT – comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo

CTG – comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo

DBPC – 1,2-dibromo-3-cloropropano

DDT – dicloro-difenil-tricloroetano

DL – diâmetro do lúmen do túbulo seminífero

DNA – ácido desoxirribonucleico

DT – diâmetro do túbulo seminífero

DTI – densidade volumétrica do compartimento testicular intertubular

DTT – densidade volumétrica do compartimento testicular tubular

ER- α – receptor alfa-estrogênico

ER- β – receptor beta-estrogênico

F0 – geração parental

F1 – primeira geração descendente da geração parental

F2 – segunda geração descendente da geração parental

FSH – hormônio folículo estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

HDL – lipoproteína de alta densidade - colesterol HDL

HFHS – dieta do tipo “*High-Fat-High-Sugar*” – Rica em gordura e açúcar

HHG – eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal

ICH – *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use* - Conferência internacional sobre harmonização de requisitos técnicos para registro de produtos farmacêuticos para uso humano

IL-1 – interleucina 1

IL-1 β – interleucina 1 Beta

IL-6 – Interleucina 6

IMC – índice de massa corpórea

INF- γ – interferon gama

ITS – índice tubulossomático

LDL – lipoproteína de baixa densidade – colesterol LDL

LEY – densidade volumétrica das células de Leydig

LH – hormônio luteinizante

LIN – densidade volumétrica do espaço linfático

MAC – densidade volumétrica dos macrófagos

MAT – densidade volumétrica da matriz extracelular

OECD – *Organisation for economic and cooperation development* - Organização para Cooperação de Desenvolvimento Econômico

PCF – peso corporal final

PCI – peso corporal inicial

RNA – ácido ribonucleico

SDT – síndrome da disgenesia testicular

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TOTG – teste oral de tolerância à glicose

TTI – teste de tolerância à insulina

VLEY – volume das células de Leydig

VLIN – volume do espaço linfático

VMAC – volume dos macrófagos

VMAT – volume da matriz extracelular

VSA – densidade volumétrica dos vasos sanguíneos

VTI – volume do compartimento testiculares intertubular

VTT – volume do compartimento testiculares tubular

VVSA – volume dos vasos sanguíneos

LISTA DE SÍMBOLOS

♂ – Animais do sexo masculino

♀ – Animais do sexo feminino

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Revisão de literatura	21
2.1. A redução da fertilidade masculina em nível mundial e o aumento de incidência de desordens reprodutivas em homens	21
2.2. A Síndrome da Disgenesia Testicular (SDT).....	23
2.3. As causas e possíveis agentes lesivos ao sistema reprodutor masculino	25
2.3.1. Substâncias químicas ambientais.....	25
2.3.2. Metais pesados.....	26
2.3.3. Medicamentos.....	27
2.3.4. Fitoterápicos	28
2.3.5. Agentes físicos.....	29
2.3.6. Modificações do estilo de vida	31
2.4. O aumento da ingestão de alimentos com alto teor de calorias e infertilidade masculina.....	32
2.4.1. A modificação do padrão alimentar humano.....	32
2.4.2. A relação do consumo de dieta hipercalórica e infertilidade masculina	34
2.5. O aumento da incidência de sobrepeso e obesidade em decorrência do balanço energético positivo	37
2.6. A relação do acúmulo de gordura corpórea e infertilidade masculina.....	39
2.7. Os mecanismos patofisiológicos relacionados ao sobrepeso/obesidade e à infertilidade masculina.....	40
2.7.1. A influência da obesidade na dinâmica hormonal.....	40
2.7.2. O quadro inflamatório crônico ocasionado pela obesidade e danos no sistema reprodutor masculino	44
2.7.3. As modificações genéticas ocasionadas pela obesidade	46
2.8. Epigenética, transmissão de influências ambientais às gerações descendentes e a relação com a fertilidade masculina	47
2.9. Influências do sobrepeso/obesidade paterna e transmissão transgeracional de desordens metabólicas e reprodutivas.....	50
3. Hipótese	54
4. Objetivos	55
4.1. Geral	55
4.2. Específicos.....	55
5. Material e Métodos.....	56
5.1. Animais	57
5.1.1. Composição das Gerações F0, F1 e F2 de ratos Wistar	57
5.2. Rações utilizadas para determinação das dietas padrão e hipercalórica.....	60
5.3. Avaliações de peso corporal, consumo alimentar e aporte calórico.....	62
5.4. Determinação do Coeficiente de Eficiência Energética (CEE)	63
5.5. Avaliação de idade pré-puberal dos animais.....	63
5.6. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	64
5.7. Teste de tolerância à insulina (TTI).....	65
5.8. Eutanásia	66
5.9. Determinação do comprimento nasoanal (CNA) e estimativa de acúmulo de tecido adiposo	66
5.10. Avaliação da lipidemia e avaliações bioquímicas séricas	67
5.11. Contagem dos espermatozoides.....	67
5.12. Avaliação de morfologia espermática	68

5.13. Peso dos órgãos	69
5.14. Análise histométrica testicular.....	70
5.14.1. Densidade volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular testiculares.....	71
5.14.2. Volume dos compartimentos testiculares tubular e intertubular e índice tubulossomático.....	73
5.14.3. Diâmetros do túbulo seminífero e do lúmen tubular e altura do epitélio seminífero.....	74
5.14.4. Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo	75
5.14.5. Densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular.....	76
5.15. Análise estatística	78
6. Resultados e discussão.....	79
7. Comentários Gerais	80
8. Conclusão	82
9. Produções científicas advindas do projeto apresentadas em congressos e seminários	83
10. Referências	84
ANEXO 1.....	96
ANEXO 2.....	97
APÊNDICE	98

1. Introdução

A redução da fertilidade masculina mundial tem sido descrita desde 1974 por Nelson e Bunge. Em 1992, Carlsen e colaboradores apontaram que houvera redução de 50% da contagem de espermatozoides em um estudo de metanálise no período de 50 anos (1940-1990), e que se manifestou principalmente com a diminuição da concentração de espermatozoides. Contudo, a redução da fertilidade humana masculina faz parte de um complexo maior, denominado de Síndrome da Disgenesia Testicular (SDT), que engloba desde sinais de infertilidade em casos mais leves, malformações dos órgãos genitais como as hipospádias e o criptorquidismo, e aumento de frequência de tumores testiculares nos casos mais graves (NORDKAP *et al.*, 2012).

As causas que podem levar à perda da fertilidade masculina apresentam diversas origens, e estão relacionadas com a exposição às substâncias químicas, dentre elas os derivados plásticos como bisfenóis policlorinados ou BPA (SAKAUE *et al.*, 2001), parabenos (HOBERTMAN *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2009) e ftalatos (HU *et al.*, 2009; MARTINO-ANDRADE; CHAHOUD, 2010); pesticidas organoclorados como o DDT ou dicloro-difenil-tricloroetano (VICTOR-COSTA *et al.*, 2010), alquilfenóis, como o endosulfan e atrazina (VIDAEFF; SEVER, 2005); metais pesados como o cádmio (RANGANATHAN *et al.*, 2018), cobre (KHUSHBOO *et al.*, 2018) e chumbo (EL-MAGD *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018); medicamentos diversos como drogas hormonais e quimioterápicas (SCHRADER *et al.*, 2001); antidepressivos, anti-hipertensivos, antiepilépticos, antiandrogênicos e antiretrovirais (BREZINA; YUNUS; ZHAO, 2012; SEMET *et al.*, 2017), e, além destes, os fitoterápicos também demonstraram essa capacidade (PANDEY *et al.*, 2011).

Mais recentemente, as modificações do estilo de vida, pela qual a sociedade tem passado, demonstram evidências de que podem colaborar para a redução da fertilidade masculina. Dentre essas, podem ser citados o aquecimento testicular promovidos pelo uso de saunas, banhos demorados, vestuário e risco ocupacional (JUNG; SCHUPPE, 2007; AHMAD *et al.*, 2012; DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL; ONG, 2015). Também se incluem os hábitos de tabagismo (KÜNZLE *et al.*, 2003; DAI; WANG; QIAO, 2015; KOVAC; KHANNA; LIPSHULTZ, 2015) e etilismo (SANSONE *et al.*, 2018). As demais modificações incluíram a ingestão de dieta hipercalórica (DANIELEWICZ; PRZYBYLOWICZ; PRZYBYLOWICZ, 2018) e a própria retenção de tecido adiposo, que leva a quadros de sobrepeso e obesidade e que podem atuar de forma direta ou indireta sobre a fertilidade masculina de forma negativa (JENSEN *et al.*, 2004; KORT *et al.*; 2006; MARTINI *et al.*, 2010; SHAYEB *et al.*, 2011).

Além de ocasionarem alterações na geração exposta, as influências ambientais podem ocasionar propensão das gerações descendentes às doenças crônicas como a obesidade, diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer e até desordens comportamentais (WEI; SCHATTEN; SUN, 2015). Nesse sentido, a transmissão transgeracional mediada pela modulação da expressão genética por mecanismos epigenéticos das células germinativas, as quais transmitem estas marcas para as gerações subsequentes na ausência das exposições ambientais (GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2014), poderia explicar a propensão a estas doenças, mesmo que na ausência de herdabilidade genética, e perdurar por várias gerações.

A importância do papel dos mecanismos epigenéticos para a infertilidade está relacionada com o fato de que diversos insultos ambientais podem induzi-los

(GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2014). De forma experimental, Dunn e Bale (2011) descreveram que dieta materna rica em gordura pode ocasionar sobrepeso, diabetes e resistência à insulina em camundongos machos descendentes, e haver transmissão para a segunda geração que também se mostrou resistente à insulina, porém sem obesidade. Nos casos descritos, as mães gestantes expostas apresentaram alterações epigenéticas na prole masculina em desenvolvimento.

Há evidência emergente de que a obesidade impacta negativamente na reprodução masculina não somente reduzindo a qualidade do sêmen analisado, mas também alterando a estrutura molecular das células germinativas nos testículos e no espermatozoide maduro (PALMER *et al.*, 2012). Contudo, se a prole masculina, cujos pais (componente paternal) foram expostos à condição de disfunção metabólica, pode desenvolver alterações epigenéticas, e se as mesmas podem ser transmitidas às futuras gerações, ainda permanece incerto (FULLSTON *et al.*, 2013). Há, ainda, uma lacuna a ser preenchida sobre a possibilidade da existência de modificação do padrão de expressão gênica do DNA espermático, ou programação dos gametas ser mediada por influências ambientais, como exposição às dietas hipercalóricas e o risco de obesidade. Sendo assim, a influência do fator paternal no fenótipo da geração descendente poderia explicar a incidência crescente dos quadros de infertilidade e distúrbios metabólicos que acometem a população na atualidade.

2. Revisão de literatura

2.1. A redução da fertilidade masculina em nível mundial e o aumento de incidência de desordens reprodutivas em homens

A infertilidade pode ser definida como uma incapacidade de concepção por um casal em um período de dois anos ou mais (POONGOTHAI; GOPENATH; MANONAYAKI, 2009) e compromete 15% dos casais que mantêm intercurso sem uso de métodos contraceptivos (JAROW *et al.*, 2006). Em 2010, este dado representou 48,5 milhões de casais em todo o mundo (MASCARENHAS *et al.*, 2012). Em homens, as causas mais comuns estão relacionadas às alterações espermáticas como oligospermia, astenozoospermia, teratozoospermia e azoospermia, que representam 20-25% dos casos (POONGOTHAI; GOPENATH; MANONAYAKI, 2009). Os índices mundiais de infertilidade masculina se encontram entre 2,5-12%, e os considerados mais altos, 8-12% pertencem à Europa Central e Oriental. Contudo, há locais em que estes dados são ainda desconhecidos, como na América Latina (AGARWAL *et al.*, 2015).

Lee (1986) classificou as possíveis causas de infertilidade masculina em quatro tipos, sendo relacionadas à sua localização no sistema reprodutor masculino: pré-testiculares, quando envolvem alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular; testiculares, quando as causas estão relacionadas ao funcionamento gonadal e da espermatogênese; e pós-testiculares, quando estão envolvidas causas obstrutivas das vias espermáticas. Além destas, os autores descreveram também as causas desconhecidas ou idiopáticas.

Os fatores etiológicos de infertilidade masculina incluem as alterações genéticas como as desordens cromossômicas tais quais as microdeleções do cromossomo Y; mutações no DNA mitocondrial espermático; desordens monogênicas e, também, multifatoriais, estas últimas associadas às influências ambientais com consequente mutações em múltiplos genes. Além disso, há as alterações não genéticas como os distúrbios hormonais; hipogonadismo hipogonadotrófico; disfunção erétil e cirurgias inguinais ou escrotais prévias (POONGOTHAI; GOPENATH; MANONAYAKI, 2009).

A redução da fertilidade masculina humana foi descrita pela primeira vez por Nelson e Bunge (1974) que demonstraram menores índices de concentração, células normais e vitalidade espermáticas de homens que seriam submetidos à cirurgia eletiva de vasectomia quando comparados com os dados descritos na literatura. Em 1992, Carlsen e colaboradores apontaram que houvera redução de 50% da contagem de espermatozoides em um estudo metanalítico no período de 50 anos (1940-1990), o qual foi reiterado pelos trabalhos de Swan; Elkin; Fenster (1997 e 2000). Centola *et al.* (2016) também verificaram redução anual de 4% na concentração e 2% na motilidade de espermatozoides de homens jovens, no período de 2003 a 2013 nos Estados Unidos. Outro estudo mais recente, realizado por Sengputa; Dutta; Krajewskak (2017), demonstrou que houve redução de 57% na concentração espermática entre 1980 e 2015 na América do Norte, Europa, Ásia e África. Levine *et al.* (2017) corroboraram os mesmos achados, em que a contagem de espermatozoides humanos decresceu cerca de 50-60% entre os anos de 1973-2011 em países industrializados como os Estados Unidos, Europa e a Nova Zelândia. Este parâmetro também foi relatado com redução na ordem de 73% em

países africanos (SENGUPTA *et al.*, 2017) e 32,5% em países europeus, entre os anos de 1965 e 2015 (SENGUPTA *et al.*, 2018).

Contudo, outros trabalhos divergiram sobre a real existência da redução da fertilidade masculina. Cocuzza e Esteves (2014) questionaram se ocorreu de fato o decréscimo na concentração espermática, uma vez que houve heterogeneidade nos testes de avaliações seminais adotados nestes estudos. Além disso, as diferenças étnicas e geográficas não foram levadas em consideração nos diversos trabalhos retrospectivos, e os pacientes analisados não representaram amostragens fidedignas da população em geral (MERZENICH; ZEEB; BLETTNER, 2010). Jouannet *et al.* (2001) apontaram ainda que são necessários estudos prospectivos e outros parâmetros de função testicular mais específicos para suprirem as deficiências que os artigos de metanálise têm para explicar a redução da fertilidade humana. Portanto, mais trabalhos ainda são necessários para esclarecer as divergências apontadas.

2.2. A Síndrome da Disgenesia Testicular (SDT)

Além da redução da contagem de espermatozoides, o aumento de incidência de alterações reprodutivas masculinas com a presença de criptorquidismo, hipospádias, e até mesmo de tumores testiculares, podem indicar que a fertilidade masculina pode ser afetada não apenas ao se reduzir a concentração de gametas produzidos, mas também pelo aumento de incidência destas alterações. Elas podem ser reunidas em uma síndrome denominada de Síndrome de Disgenesia Testicular ou SDT (NORDKAP *et al.*, 2012). A SDT se correlaciona com alterações em que houve malformações do feto do sexo masculino, com causas genéticas e exposição

a fatores lesivos ao sistema reprodutor masculino, ainda na vida intrauterina (SKAKKEBAEK; RAJPERT-DE MEYTS; MAIN, 2001; WOHLFAHRT-VEJE; MAIN; SKAKKEBAEK, 2009). A síndrome pode variar desde casos mais leves com a contagem reduzida de espermatozoides, até os casos mais severos e raros com a presença de malformações e de tumores testiculares (SKAKKEBAEK *et al.*, 2003). As causas genéticas podem ser associadas às formas mais severas, que também se relacionam com a insensibilidade à produção de andrógenos e mutações no gene SRY, responsável pela diferenciação sexual (CHEMES *et al.*, 2003).

Contudo, as causas da SDT em seres humanos ainda permanecem incertas. O que se sabe é que as malformações testiculares são ocasionadas por exposição a fatores antiandrogênicos no desenvolvimento fetal. Em nível histológico, em indivíduos com SDT, se nota a presença de túbulos seminíferos imaturos, com células de Sertoli indiferenciadas, ou contendo apenas este tipo celular (WOHLFAHRT-VEJE; MAIN; SKAKKEBAEK, 2009). Welsh *et al.* (2008) verificaram a presença de alterações semelhantes, além de redução da distância anogenital, hipospádias, criptorquidismo e redução do comprimento peniano em ratos, cujas mães foram submetidas a produtos antiandrogênicos como a flutamida, na última semana de gestação. Os autores sugerem que influências no desenvolvimento fetal neste período, dito a “*janela de masculinização*”, equivalente ao período da 8-14^{as} semanas de período gestacional humano, poderia ocasionar tais alterações na vida pós-natal.

2.3. As causas e possíveis agentes lesivos ao sistema reprodutor masculino

2.3.1. Substâncias químicas ambientais

Diversas substâncias e agentes físicos apresentam potencial lesivo ao sistema reprodutor masculino. As substâncias químicas que podem interferir na dinâmica hormonal são chamadas de “químicos ambientais desreguladores endócrinos”. Os mesmos podem alterar a biossíntese, secreção, transporte, ligação e metabolismo de hormônios endógenos, incluindo os hormônios sexuais e suas proteínas ligantes (SONG *et al.*, 2016).

Estas substâncias são de origem sintética e foram desenvolvidas para as mais diversas atividades humanas, com consequências negativas sobre o funcionamento do sistema reprodutor masculino: bisfenóis policlorinados ou BPA provenientes de resinas e materiais plásticos (SAKAUE *et al.*, 2001); derivados plásticos contendo parabenos (HOBERTMAN *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2009) e ftalatos (HU *et al.*, 2009; MARTINO-ANDRADE; CHAHOUD, 2010); pesticidas organoclorados como o DDT ou dicloro-difenil-tricloroetano (VICTOR-COSTA *et al.*, 2010); alquilfenóis presentes em herbicidas e detergentes e pesticidas como o endosulfan e atrazina (VIDAEFF; SEVER, 2005). Muitas destas substâncias são consideradas como xenoestrógenos e, se liberadas para o meio ambiente, podem promover as alterações no organismo ao serem ingeridas com os alimentos (DELBES; LEVACHER; HABERT, 2006).

A sensibilidade do sistema reprodutor masculino frente aos contaminantes ambientais pôde ser verificada no caso ocorrido entre trabalhadores rurais da Costa Rica entre as décadas de 1960 e 1980. A exposição de trabalhadores de uma

indústria de pesticidas dos Estados Unidos ao nematicida DBPC ou 1,2-dibromo-3-cloropropano (WHORTON *et al.*, 1977) e de cerca de 1.500 homens ao mesmo composto em plantações de banana, promoveu esterilização por lesões e morte das células germinativas, além de traumas psicológicos (THRUPP, 1991). Portanto, a pesquisa sobre os efeitos dos contaminantes ambientais sobre os diversos sistemas orgânicos ainda é necessária.

2.3.2. Metais pesados

Outras substâncias como os metais pesados, também podem estar relacionadas com efeitos lesivos sobre o sistema reprodutor masculino. Estes, podem ser inalados por meio do hábito do tabagismo e do ar poluído, ingeridos com alimentos e água (KIZILER *et al.*, 2007) e por exposição ocupacional (FIGÀ-TALAMANCA; TRAINA; URBANI, 2001). O estresse oxidativo e dano em nível de membrana plasmática e cromatina dos espermatozoides podem ser os mecanismos básicos promovidos pelo cádmio (RANGANATHAN *et al.*, 2018), cobre (KHUSHBOO *et al.*, 2018) e pelo chumbo (EL-MAGD *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018). Este último, também foi correlacionado com redução dos níveis de testosterona sérica e expressão dos receptores α -estrogênicos (ER- α) em ratos, que poderia explicar outro mecanismo deletérios à fertilidade masculina (EL-MAGD *et al.*, 2017). O cádmio também pode ser responsável por lesões na barreira hematotesticular mesmo em baixas doses (MEDINA *et al.*, 2017).

Outros metais pesados também foram relacionados com lesões no sistema reprodutor masculino e infertilidade: arsênio (MUKHERJEE; MUKHOPADHYAY, 2009; WANG *et al.*, 2016), cromo (BONDE; CHRISTENSEN, 1991; BONDE; ERNST,

1992), mercúrio (PODZIMEK *et al.*, 2005; MOCEVIC *et al.*, 2013), molibdênio (MEEKER *et al.*, 2008) e níquel (DORESWAMY *et al.*, 2004).

2.3.3. Medicamentos

Em um estudo realizado por Ding *et al.* (2017), de 1.368 drogas avaliadas e permitidas para uso clínico pelo órgão estadunidense, FDA – *Food and Drug Administration*, 65 apresentaram potencial para reduzir a fertilidade masculina. As classes de medicamentos mais citadas foram as drogas hormonais, com capacidade de alterar a dinâmica do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, e as drogas antineoplásicas por terem atividade citotóxica. Estas últimas, embora tenham fornecido cura para diversos tipos de tumores, podem promover quadros de oligo e/ou azoospermia transitória ou permanente (SCHRADER *et al.*, 2001).

Além destes, outros medicamentos podem ter influência sobre o sistema reprodutor masculino e causar infertilidade como os pertencentes às classes dos antidepressivos do grupo dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina, como a paroxetina; os anti-hipertensivos, do tipo bloqueadores de canais de cálcio, como exemplo o diltiazem; os bloqueadores alfa-adrenérgicos, para tratamento de síndromes urinárias; os antiepilépticos, como a fenitoína e a carbamazepina; os antiandrogênicos, como a flutamida; e os antiretrovirais. Estes medicamentos podem atuar diretamente na produção dos espermatozoides, ou reduzir a libido (BREZINA; YUNUS; ZHAO, 2012; SEMET *et al.*, 2017).

Há, ainda, a classe dos anabolizantes esteroidais androgênicos, que são derivados da testosterona e são utilizados de forma ilícita para aumento de desempenho de atletas, ganho muscular e melhoria estética. Estes, podem afetar o

sistema reprodutor masculino por reduzir os níveis dos hormônios liberador de gonadotrofinas (GnRH), folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), afetar o processo espermatogênico e causar infertilidade (CHRISTOU *et al.*, 2017). As terapias de reposição hormonal à base de testosterona exógena, nos casos de hipogonadismo, também podem piorar os níveis dos hormônios androgênicos endógenos e piorar as concentrações de espermatozoides (CROSNOE *et al.*, 2013).

Adicionalmente, outras substâncias com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antiparasitária também demonstraram capacidade de reduzir a contagem de espermatozoides (RAYBURN *et al.*, 2018).

2.3.4. Fitoterápicos

Estima-se que 80% da população mundial utilizem medicamentos à base de plantas, uma vez que o uso de fitoterápicos tornou-se uma alternativa frente à dificuldade de acessibilidade à medicação convencional. Os fitoterápicos são ainda considerados como isentos de efeitos colaterais e comercializados sem a segurança necessária (PANDEY *et al.*, 2011). Kostelac; Rechkemmer; Briviba (2003) relataram que fitoestrógenos flavonólicos presentes nos fitoterápicos podem se ligar aos receptores α (ER- α) e β (ER- β) estrogênicos e, dessa maneira, atuar nos diversos sistemas em que esses receptores estão localizados. Segundo Kuiper *et al.* (1998), os fitoestrógenos são um dos compostos xenoestrógenos mais potentes conhecidos e possuem maior afinidade de ligação aos ER- β , mais presentes no sistema reprodutor masculino.

Apesar de serem considerados isentos de efeitos colaterais, diversos autores descreveram possíveis alterações de fitoterápicos usados comumente sobre o

sistema reprodutor masculino, promovendo alterações negativas na qualidade espermática: o extrato de *Vitex negundo* por Das *et al.* (2004) em ratos; o extrato de *Ginkgo biloba* em hamsters (ONDRIZEK *et al.*, 1999a), em humanos (ONDRIZEK *et al.*, 1999b) e em ratos (OSHIO *et al.*, 2015) e *Valeriana officinalis* em ratos (MARQUES *et al.*, 2016). Assinder *et al.* (2007) descreveram que ratos adultos expostos a elevadas concentrações de fitoestrógenos genisteína, gliciteína e daidzeína na dieta, tiveram a espermatogênese prejudicada, a taxa de apoptose de células germinativas aumentada e a contagem de espermatozoides reduzida.

Muitos desses medicamentos são comercializados sem serem submetidos às análises toxicológicas recomendadas (MAR; BENT, 1999). Uma vez que o tratamento de doenças mediante o uso de plantas é muito popular, devido ao baixo custo e fácil disponibilidade, e com o aumento da procura por fitoterápicos, a segurança desses produtos também necessita ser estudada (NESS; SHERMAN; PAN, 1999).

2.3.5. Agentes físicos

2.3.5.1. Radiação ionizante

Os agentes físicos como a radiação podem promover impactos negativos na espermatogênese e causar redução da contagem dos gametas devido aos danos no DNA (KESARI; AGARWAL; HENKEL, 2018). A primeira descrição da sua atividade sobre as células germinativas foi realizada por Prausnitz e Susskind (1962) que relataram degeneração testicular e atrofia de túbulos seminíferos de camundongos expostos à radiação por micro-ondas. A utilização de radiação como forma

terapêutica contra neoplasias, também pode promover impactos negativos à fertilidade humana masculina, e a descoberta de métodos de proteção gonadal contra os seus efeitos, em especial dos pacientes jovens, tem sido almejada em decorrência da incidência dessas doenças nessa faixa etária (RODRIGUEZ-WALLBERG; OKTAY, 2014; VAKALOPOULOS *et al.*, 2015).

A possível influência de radiação sobre a formação dos espermatozoides, e suas consequências sobre as gerações descendentes, motivou a atenção destes sobre o sistema reprodutor masculino (ANDERSON, 2005). O aumento do risco de incidência de neoplasias do tipo leucemias e linfomas em crianças na área de *Seascale*, no Reino Unido, que mantinha uma usina nuclear, foi evidenciado em um estudo realizado por Gardner *et al.* (1990). Este estudo foi utilizado em processos judiciais de dois casos de moradores locais contra os proprietários da usina, e que levantou a questão se os danos espermáticos e no sistema reprodutor ocasionados por fatores ambientais poderia promover efeitos nas gerações descendentes. Neste caso, a exposição dos trabalhadores à radiação e os seus efeitos nos testículos foi colocada como uma possível causa do aumento da incidência das doenças em seus filhos.

2.3.5.2. Radiação não-ionizante

Outras modalidades de radiação não ionizante, associadas com modificação do estilo de vida, também têm sido estudadas como causas de redução de fertilidade masculina, e incluem o uso de telefone móvel, computadores e demais aparelhos eletrônicos que a emitem. Esta radiação poderia levar a danos testiculares por estresse oxidativo (KESARI; AGARWAL; HENKEL, 2018).

2.3.6. Modificações do estilo de vida

Outro fator ambiental físico, que se associa com modificação do estilo de vida, com capacidade de ocasionar alterações na fertilidade e sistema reprodutor masculino, inclui o aquecimento testicular (JUNG; SCHUPPE, 2007; AHMAD *et al.*, 2012; DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL; ONG, 2015). O testículo de mamíferos necessita estar em temperatura cerca de 2-8° C abaixo da temperatura corpórea. O aquecimento gonadal pode estar relacionado com hábitos como banhos demasiadamente quentes; uso frequente de saunas; uso de computadores do tipo *laptops* sobre a área perigonadal; posição corporal durante o sono; longos períodos sentados, como motoristas, e riscos ocupacionais, como trabalhadores de locais aquecidos, como em fornos industriais ou alimentícios (JUNG; SCHUPPE, 2007). As atividades físicas como ciclismo; anormalidades clínicas como a obesidade; criptorquidismo; episódios febris e presença de varicocele também são outras formas relatadas de manutenção de um ambiente testicular mais aquecido e são responsáveis pela redução da contagem de espermatozoides (DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL; ONG, 2015).

Como mecanismo patofisiológico, o calor pode danificar as células germinativas (SHIRAISHI; MATSUYAMA; TAKIHARA, 2012), principalmente os espermatócitos primários nas fases de paquíteno e em diplóteno, e as espermátides arredondadas, com conseqüente redução na produção espermática e contagem de espermatozoides (CARLSEN *et al.*, 2003). O calor causa também, além da apoptose, a autofagia celular; lesão no DNA espermático e modificações de padrão de expressão gênica (DURAIRAJANAYAGAM; AGARWAL; ONG, 2015).

Demais modificações do estilo de vida humano nas últimas décadas também predisuseram à redução da contagem dos espermatozoides. À esta situação incluem os hábitos de tabagismo (KÜNZLE *et al.*, 2003; DAI; WANG; QIAO, 2015; KOVAC; KHANNA; LIPSHULTZ, 2015) e etilismo (SANSONE *et al.*, 2018). O tabagismo submete o organismo a mais de 4.000 diferentes substâncias, dentre as quais a nicotina, alcatrão, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e metais pesados, e se relaciona com redução da concentração e motilidade e anormalidades espermáticas (DAI; WANG; QIAO, 2015). No caso do etilismo, há uma ação direta do álcool etílico na biossíntese da testosterona e alteração sobre o processo espermatogênico e com consequentes parâmetros seminais anormais (SANSONE *et al.*, 2018).

2.4. O aumento da ingestão de alimentos com alto teor de calorias e infertilidade masculina

2.4.1. A modificação do padrão alimentar humano

O padrão dietético humano modificou drasticamente ao longo da evolução. Ao surgimento do gênero *Homo*, há cerca de 2,5 milhões de anos na África, o tipo de alimentação era baseada no comportamento caçador-coletor e se constituía no consumo de frutos, raízes, castanhas, sementes, plantas, além de animais (CARRERA-BASTOS *et al.*, 2011), com menor quantidade de carboidratos ingerida (SPREADBURY, 2012), de densidade calórica e índice glicêmico baixos, além de alto teor de micronutrientes e antioxidantes, denominada de dieta paleolítica (KONNER; BOYD EATON, 2010). Somente com o aumento de consumo de carne

ocorrido há dois milhões de anos (LARSEN, 2003), associado ao uso de mel, que é um dos alimentos mais calóricos disponíveis na natureza (CRITTENDEN, 2011), e de tubérculos e outras plantas cozidos, que os ancestrais humanos puderam ter o desenvolvimento de um cérebro de maior proporção e de alto consumo energético (LANDEN; WRANGHAM, 2005).

A primeira e profunda modificação do padrão alimentar ocorreu há cerca de 12 mil anos com a Revolução da Agricultura e a Domesticação de Animais, em que os alimentos à base de laticínios e grãos, que até então não eram disponíveis, passaram a fazer parte da alimentação. A segunda modificação ocorreu com a Revolução Industrial, há cerca de 250 anos, que propiciou desenvolvimento tecnológico e aquisição de ferrovias e maquinário industrial a vapor que facilitou a colheita e transporte dos grãos. Com isso, a alimentação dos animais domesticados tornou-se mais prática e ágil, tendo impacto na composição de sua carne, com a aquisição de mais gordura (CORDAIN *et al.*, 2005).

A Revolução Industrial também propiciou um alto consumo de óleos vegetais, por ter facilitado os seus processos de produção e aquisição. Ela também promoveu profunda modificação no padrão de consumo de gorduras e de grãos refinados em relação aos últimos 12 mil anos de evolução humana (CARRERA-BASTOS *et al.*, 2011). Além disso, ela influenciou no padrão de consumo de açúcares, pois houve um forte impulso de sua produção, com um vertiginoso aumento de seu consumo, principalmente nos países desenvolvidos nos últimos 200 anos. Além do açúcar, houve incremento significativo da ingestão de sal e de álcool (CORDAIN *et al.*, 2005). A partir do final da década de 1970, houve também aumento do consumo de alimentos adocicados à base de xarope rico em frutose de milho, que tornou estes alimentos mais acessíveis à população. Este aumento de consumo superou em

múltiplas vezes as dietas ancestrais que obtinham este carboidrato por meio da ingestão de frutas (HANOVER; WHITE, 1993).

Portanto, a evolução da dieta humana, propiciou aquisição de produtos lácteos, cereais, açúcares e óleos refinados, sal e carne de animais domesticados com maiores níveis de gordura. Este padrão, associado ao uso de alimentos processados impactou a saúde e bem-estar da população (CORDAIN *et al.*, 2005; CARRERA-BASTOS *et al.*, 2011). A denominada “*alimentação ocidental*” tem semelhança com estes componentes descritos e é consumida na maior parte do mundo. Ela se contrapõe à alimentação tradicional de muitos países, como a dieta de *Okinawa* no Japão e de várias dietas do Mediterrâneo, cujos locais albergam as populações mais saudáveis e longevas do mundo (WILLCOX *et al.*, 2007).

2.4.2. A relação do consumo de dieta hipercalórica e infertilidade masculina

A dieta de uma sociedade está relacionada à patogênese de diversas enfermidades e as diferenças nos hábitos alimentares podem ajudar a explicar a frequência das doenças de uma população para outra. Carrera-Bastos *et al.* (2011) relataram que os hominídeos que viveram na época do período paleolítico, não apresentavam doenças como a obesidade, diabetes do tipo 2, hipertensão arterial, câncer de origem de células epiteliais, doenças autoimunes, doenças cardíacas coronarianas e osteoporose, estas consideradas como “doenças de civilização”.

Contudo, foi verificado que determinados padrões de dieta e os seus componentes podem ser responsáveis pela redução da fertilidade masculina. Um estudo realizado por Salas-Huetos; Bulló; Salas-Salvadó (2017) demonstrou que os alimentos considerados saudáveis, apresentavam correlação positiva com os índices

espermáticos. Os mesmos, eram compostos e ricos em ômega 3, vitaminas e antioxidantes, ao passo que os alimentos ricos em ácidos graxos saturados e *trans*, apresentavam correlação negativa. Em termos de alimentação saudável, se considerou o consumo de alimentos do grupo dos pescados como peixes e mariscos; carne de frango; cereais; frutas; verduras e produtos lácteos com baixo teor de gordura. Não obstante, dietas ricas em carne processada; derivados de soja e batata; laticínios com alto teor de gordura; além de cafeína, álcool, doces e bebidas adoçadas com açúcar foram relacionadas com a redução da qualidade espermática. Outro estudo realizado por Gaskins *et al.* (2012), com 188 homens jovens, demonstrou que os que tinham dieta mais saudável, apresentaram parâmetros espermáticos melhores, como a motilidade. Os autores sugerem que, neste caso, a alimentação promoveu proteção contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio sobre as células germinativas em relação aos indivíduos de alimentação considerada de alta densidade calórica.

A ingestão de dietas ricas em carne processada e alimentos adoçados também demonstrou correlação com o risco de astenozoospermia (ESLAMIAN *et al.*, 2012). Chiu *et al.* (2014) demonstraram correlação negativa da motilidade espermática e a ingestão de bebidas adoçadas. Liu *et al.* (2015) demonstraram correlação negativa em parâmetros de qualidade espermática em 7.282 homens de origem asiática que ingeriram diferentes padrões de alimentação, como as de origem ocidental, que continham alta quantidade de carboidratos, bebidas adoçadas e sal.

Um estudo realizado com 114 homens poloneses demonstrou que características como concentração espermática, motilidade e morfologia foram afetadas negativamente nos grupos que ingeriram a dieta de padrão ocidental

(DANIELEWICZ; PRZYBYLOWICZ; PRZYBYLOWICZ, 2018). Embora os autores tenham encontrado estes dados, não foi demonstrada correlação positiva entre os grupos que ingeriram dieta considerada saudável com a melhoria nestes mesmos parâmetros, em contrapartida aos resultados divulgados nos estudos realizados por Gaskins *et al.* (2012) e Salas-Huetos; Bulló; Salas-Salvadó (2017).

Os mecanismos pelos quais a dieta hipercalórica pode causar danos à fertilidade masculina foram levantados em diversas pesquisas. Rato *et al.* (2013) relataram que a ingestão desse tipo de dieta contempla maior quantidade de ácidos graxos que podem se acumular nas células testiculares e prejudicar o metabolismo lipídico testicular e, assim, desregular os eventos de espermatogênese e síntese de testosterona. O acúmulo desses ácidos graxos e de colesterol também pode prejudicar o funcionamento e a estrutura da membrana plasmática dos espermatozoides e assim, prejudicar o processo de fertilização (FERNANDEZ *et al.*, 2011). Os prejuízos ocasionados pela ingestão de maiores quantidades de colesterol também foram demonstrados por Yamamoto *et al.* (1999) que verificaram redução de função das células de Sertoli e de Leydig, o que refletiu em menor qualidade espermática em coelhos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta.

Outra via que poderia explicar as lesões ocasionadas pela dieta hipercalórica seria pelo acúmulo de lactato intratesticular. A célula de Sertoli se utiliza da via glicolítica para produzir o lactato que é transportado para o fluido seminal e utilizado como fonte energética das células germinativas, pois estas não utilizam diretamente a glicose. Entretanto, em animais que apresentaram o metabolismo glicêmico alterado, mediado pelas dietas, os níveis de lactato testiculares estavam em valores aumentados, que indica maior atividade glicolítica e que pode explicar a maior geração de espécies reativas de oxigênio e danos à produção espermática (RATO *et*

al., 2013). Além disso, a glicose é necessária para a produção de testosterona pelas células de Leydig, e um desequilíbrio no metabolismo glicêmico, que é comum em indivíduos que ingerem dietas com alta densidade energética, podem ter sua produção prejudicada (AMROLIA *et al.*, 1988).

Demais mecanismos envolvidos podem estar relacionados com a microbiota intestinal. Sabe-se que a ingestão de dietas hipercalóricas, principalmente enriquecidas com carboidratos, podem alterar a microbiota intestinal e criar um ambiente pró-inflamatório local e, com conseqüente aumento de absorção de lipopolissacarídeos e promover as alterações espermáticas devido aos seus maiores níveis sanguíneos (SPREADBURY, 2012). Além disso, a ingestão de dietas de alta densidade energética pode aumentar os níveis de grelina, que demonstrou ter a capacidade de agir diretamente sobre o testículo e inibir a proliferação das células de Leydig imaturas (BARREIRO *et al.*, 2004).

Além das modificações do estilo de vida que ocorreram nas últimas décadas, que incluíram alterações nos padrões alimentares da população humana, houve associação com o sedentarismo. Com a ingestão de alimentos de alto valor calórico, associada à falta de exercícios físicos, o balanço energético positivo foi propiciado e culminou como conseqüente acúmulo de tecido adiposo corporal e quadros de sobrepeso e obesidade (CABLER *et al.*, 2010).

2.5. O aumento da incidência de sobrepeso e obesidade em decorrência do balanço energético positivo

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde, o sobrepeso e a obesidade são considerados quando o Índice de Massa Corporal (IMC), é de ≥ 25

kg/m² e ≥ 30 kg/m², respectivamente. Neste mesmo documento, relatou-se que a obesidade tem aumentando no mundo todo e que, no ano de 2014, na população com mais de 18 anos, 39% era considerada com sobrepeso, sendo 38% de homens e 40% de mulheres. A prevalência da obesidade dobrou de 1980-2014, sendo que os dados apontam que 11% dos homens e 15% das mulheres são considerados obesos no mundo. Esta condição é maior nos países desenvolvidos, porém em ascensão nos países em desenvolvimento (WHO, 2014). No Brasil, segundo os dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), de 2018, do Ministério da Saúde verificou-se que 1 em cada 5 (18,9%) são obesos e que mais da metade da população das capitais brasileiras (54,0%) estão com excesso de peso, sendo a taxa maior entre os homens (57,3%).

Segundo Ng *et al.* (2014), houve redução de 3,9% no tempo de vida devido ao quadro de obesidade. Além disso, estima-se que o sobrepeso e a obesidade foram responsáveis por causar, a cada ano, 4,4 milhões de mortes e 134 milhões do índice DALY (*Disability Adjusted Life Years*) que é um marcador que mensura os anos de vida perdidos devido a uma doença, ajustado por quadros de incapacidade física de uma população (FOROUZANFAR *et al.*, 2015).

Dessa maneira, este distúrbio metabólico é considerado como pandemia e é, atualmente, o maior desafio a ser enfrentado pela saúde pública mundial (CABLER *et al.*, 2010). Apesar de localizações pontuais, nenhum país até no presente momento, conseguiu reverter a epidemia da obesidade (ROBERTO *et al.*, 2015), o que reitera a necessidade de estudos extensivos.

Diversas enfermidades estão associadas à obesidade, denominadas de comorbidades, dentre elas o diabetes do tipo 2, hipertensão arterial,

hipercolesterolemia, doenças osteoarticulares e renais, apneia do sono, câncer, depressão e infertilidade tanto de mulheres quanto de homens (CABLER *et al.*, 2010; WHO, 2014; KATIB, 2015). Das desordens promovidas, as reprodutivas estão dentre as mais pesquisadas, pois a incidência destas na população masculina em idade reprodutiva triplicou nos últimos 30 anos e este fenômeno tem ocorrido de forma concomitante à redução da fertilidade em homens (PALMER *et al.*, 2012). O reflexo do sobrepeso e da obesidade sobre a fertilidade masculina pode ser observado porque, segundo Bakos *et al.* (2011a), 79,4% dos homens que procuraram por intervenções de tecnologias de reprodução assistida apresentam sobrepeso e/ou obesidade.

2.6. A relação do acúmulo de gordura corpórea e infertilidade masculina.

A obesidade pode ser definida como um acúmulo anormal de gordura que causa prejuízos à saúde (CABLER *et al.*, 2010). Diversos estudos apontam que há relação inversa entre o acúmulo de tecido adiposo corporal e a qualidade espermática. Tsao *et al.* (2015), em estudo realizado com 7.630 homens demonstraram que a morfologia e concentração espermáticas reduziram conforme o aumento do IMC dos pacientes. Da mesma maneira, Bieniek *et al.* (2016) encontraram alterações espermáticas como redução do volume do ejaculado, concentração, motilidade e morfologia espermáticas, além da redução das concentrações de testosterona e aumento da concentração de estrogênio. Os resultados mais negativos foram encontrados em homens obesos.

Jensen *et al.* (2004), em um estudo realizado com homens dinamarqueses com peso normal e com sobrepeso, demonstraram que no último grupo, 24,4%

apresentaram concentração de espermatozoides reduzida, com taxas inferiores a 20 milhões de espermatozoides/mL. Estudos semelhantes, que demonstraram esperma de pior qualidade em homens com aumento do IMC, foram demonstrados por Kort *et al.* (2006), Martini *et al.* (2010) e Shayeb *et al.* (2011).

Contrariamente ao que foi demonstrado, pesquisadores como Aggerholm *et al.* (2008) e Duits *et al.* (2010) não evidenciaram piora dos parâmetros seminais de homens com maiores níveis de IMC, e as divergências dos resultados com os descritos na literatura ainda necessitam de mais estudos para esclarecer os impactos negativos do acúmulo de tecido adiposo corporal sobre a fertilidade humana.

2.7. Os mecanismos patofisiológicos relacionados ao sobrepeso/obesidade e à infertilidade masculina

2.7.1. A influência da obesidade na dinâmica hormonal

Atualmente, o tecido adiposo não é considerado apenas como um reservatório de gordura, mas como um componente que desempenha papel ativo na dinâmica da homeostase e atua como um órgão endócrino na produção de diversas substâncias, como as adipocinas leptina e adiponectina. O quadro de obesidade visceral pode atuar como o principal desregulador endócrino, e que pode ocasionar quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico (CABLER *et al.*, 2010). Sugere-se que ela possa ocasionar infertilidade masculina de forma multifatorial como redução na concentração de espermatozoides, além de alterações na morfologia e na motilidade dos mesmos; redução da autoestima e da libido sexual; indução de síndrome de

disfunção erétil (KATIB, 2015) e influência direta no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG), ao alterar a frequência de pulsos dos hormônios GnRH, FSH e LH e que poderá afetar, conseqüentemente, a produção de espermatozoides (VERMEULEN, 1993).

2.7.1.1. Hiperestrogenismo

Uma das alterações promovidas nos homens com sobrepeso, é a influência hormonal, pois há ocorrência de maior atividade da enzima aromatase no tecido adiposo, que converte a testosterona em estrogênio e ocasiona o hiperestrogenismo. Dessa maneira, a supressão do eixo HHG, com redução dos níveis de GnRH, FSH, LH e testosterona, ocorre pelos altos níveis de estrogênio (KATIB, 2015). Pauli *et al.* (2008) também relataram redução nas concentrações dos hormônios FSH, LH e testosterona em homens obesos, embora não tenham encontrado alterações nas concentrações de espermatozoides e nas taxas de fertilidade humana. Aggerholm *et al.* (2008), em outro estudo com 2.139 homens, demonstraram que houvera redução dos níveis de testosterona e inibina B em torno de 25-32% e aumento de 6% na concentração do estrogênio nos pacientes obesos analisados, quando comparados com os pacientes com condição normal. A redução de taxas de inibina B pode ser um reflexo direto causado pelo quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico, ocasionado pela obesidade, em que os reduzidos níveis de FSH promovem supressão da atividade das células de Sertoli, com conseqüente inibição do processo espermatogênico (GLOBERMAN *et al.*, 2005).

2.7.1.2. Hiperleptinemia

Adicionalmente, em pessoas obesas, é comum se encontrarem níveis aumentados do hormônio leptina, responsável pelo controle do apetite. A leptina é um produto do gene *ob*, produzido nos adipócitos e realiza a ligação do tecido adiposo com o cérebro. Ela inibe a produção do neuropeptídeo Y e estimula a produção do hormônio estimulador dos melanócitos pelo núcleo arqueado do hipotálamo, que tem a função, respectivamente, de estimular e inibir a ingestão de alimentos. A hiperleptinemia dos obesos promove resistência periférica à insulina e aumento da secreção deste hormônio pelo pâncreas e aumento das concentrações séricas de estrogênio. Como consequência, a hiperinsulinemia diminui a produção da globulina ligadora de hormônios sexuais pelo fígado (AGGERHOLM *et al.*, 2008). Segundo Sanchez-Garrido *et al.* (SANCHEZ-GARRIDO *et al.*, 2018), a hiperleptinemia, no caso da obesidade paterna, envolveria o comprometimento das vias hipotalâmicas no sistema *Kiss1* dos descendentes e alterar a dinâmica do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal.

Além disso, estudos demonstraram a presença de receptores para a leptina no tecido testicular e na membrana citoplasmática de espermatozoides, sugerindo que este hormônio, em níveis aumentados, poderia causar alterações espermáticas de forma direta, além da influência sobre o eixo HHG (CABLER *et al.*, 2010). O quadro de hiperleptinemia promovida em ratos também foi acompanhada de redução das taxas de testosterona e poderia explicar a interferência no processo espermatogênico (MARGETIC *et al.*, 2002; HARON *et al.*, 2010; KATIB, 2015).

Em um trabalho realizado por Esmaili-Nejad; Babaei; Kheirandish (2015), verificou-se que camundongos que receberam doses de leptina exógena, tiveram o

peso relativo dos testículos menor, assim como redução da altura do epitélio seminífero, demonstrando que a hiperleptinemia pode ser uma via causadora do comprometimento da espermatogênese. Haron *et al.* (2010) também verificaram que a hiperleptinemia exógena promoveu quadro de redução de concentração espermática de ratos adultos. Zhao *et al.* (2014) verificaram que a hiperleptinemia associada com o aumento de expressão de espécies reativas de oxigênio, podem ser as vias responsáveis pela baixa concentração de testosterona e hipogonadismo ocasionados em camundongos que receberam dieta hiperlipídica.

2.7.1.3. Influência da adiponectina

A correlação da expressão de outra adipocina, a adiponectina, com a fertilidade masculina também tem sido estudada. Esta substância, que é secretada pelos adipócitos e possui função no controle metabólico de glicose e lipídios, foi descrita como tendo efeito negativo na secreção de GnRH, FSH e LH (AL-ANI; SALMAN; AL-QURAIISHI, 2016). Contudo, o papel da mesma no controle da esteroidogênese tem sido relatado, uma vez que os seus receptores são expressos em maiores proporções nas células de Leydig, e as concentrações séricas da adiponectina estão mais elevadas nos animais adultos quando comparados com os pré-púberes (MARTIN, 2014). Trabalhos demonstram que, embora não totalmente esclarecido, existe participação da adiponectina na fisiologia reprodutiva masculina. Kawwass; Summer; Kallen (2015) evidenciaram presença dos receptores no epidídimo, sugerindo a participação desta adipocina na fisiologia epididimária. Bjursell *et al.* (2007) relataram que camundongos que não possuíam os receptores do tipo 2 (AdipoR2), apresentaram azoospermia e atrofia do epitélio seminífero.

No caso do sobrepeso e obesidade, foi demonstrado que há correlação negativa dos níveis de adiponectina com o índice de massa corpórea de homens (MARTIN, 2014). À adiponectina também se atribui potente atividade anti-inflamatória e que reduz os efeitos ocasionados pela ação dos mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (INF- γ) que causam os mecanismos citotóxicos sobre as células que realizam a esteroidogênese. Portanto, a perda de um mecanismo protetivo desempenhada pela adiponectina em homens com sobrepeso, poderia explicar a subfertilidade e a redução de sua concentração sérica (ROUMAUD; MARTIN, 2015).

De forma contrária, Al-ani; Salman; Al-Quraishi (2016) verificaram que, em homens com problemas reprodutivos, os níveis de adiponectina estavam aumentados, correlacionando-se com astenozoospermia, oligospermia e azoospermia, além de reduzidos níveis de testosterona sérica. Em decorrência destes estudos com resultados paradoxais, e devido à lacuna de conhecimento dos mecanismos pelos quais a adiponectina participa do processo reprodutivo, mais pesquisas ainda são necessárias que descrevam indivíduos com alterações pela sinalização inadequada (KAWWASS; SUMMER; KALLEN, 2015).

2.7.2. O quadro inflamatório crônico ocasionado pela obesidade e danos no sistema reprodutor masculino

No sistema reprodutor masculino, há produção de citocinas como o TNF- α pelas espermatídes arredondadas, espermátócitos em paquíteno e em macrófagos testiculares, assim como IL-1 pelos macrófagos e pelas células pós-meióticas da linhagem espermatogênica. Ambas citocinas apresentaram receptores nas células

de Sertoli e de Leydig, o que demonstra direitinha que demonstram que essas substâncias são necessárias para a fisiologia testicular e que o aumento de seus níveis sanguíneos poderia causar danos. No tecido testicular, o TNF- α tem a função de estimular a expressão da enzima aromatase que realiza a conversão de testosterona em estrogênio e auxiliar a apresentação de receptores androgênicos na superfície das células espermatogênicas. Ele também tem papel fundamental na diferenciação sexual, pois suprime a atividade da substância do hormônio Mülleriano. Já a IL-1 tem a função de promover a proliferação das células de Leydig no desenvolvimento pré-puberal (LYSIAK, 2004).

Contudo, em níveis aumentados, as citocinas podem atuar sobre as células germinativas e ocasionar impedimento no desenvolvimento por vias de apoptose, além de promover danos na barreira hematotesticular. Fan *et al.* (2018) demonstraram aumento dos níveis de interleucina 6 (IL-6) e TNF- α no soro sanguíneo e tecidos do sistema reprodutor masculino como testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, além de expressão aumentada dos seus RNA mensageiros testiculares. Neste trabalho, relatou-se também aumento correlacionado das citocinas no plasma seminal e soro sanguíneo de homens com sobrepeso e obesidade. Os autores também demonstraram que os níveis dessas citocinas apresentaram correlação com atrofia do epitélio seminífero em camundongos e com baixa contagem e motilidade de espermatozoides humanos, e que o sobrepeso e acúmulo de tecido adiposo possui capacidade de promover um quadro inflamatório crônico sistêmico e local a nível do sistema reprodutor masculino, com capacidade de danos e ocasionar subfertilidade.

Este quadro conferido pelo sobrepeso e a obesidade se caracteriza como inflamação de baixo grau e se correlaciona com a infertilidade (HÆRVIG *et al.*,

2018). Kaur (2014) relatou danos no sistema reprodutor masculino pela maior produção e secreção de adipocinas como as interleucinas 1 Beta (IL-1 β), IL-6 e TNF- α . A origem da secreção aumentada são os adipócitos alterados e os órgãos mais acometidos pelo quadro inflamatório são o pâncreas, fígado e tecido adiposo, que podem demonstrar maiores populações de macrófagos teciduais e que produzem citocinas pró-inflamatórias e pioram o quadro (MAEGAWA *et al.*, 2002; ESSER *et al.*, 2014).

Os mecanismos intrínsecos regulatórios que relacionam as citocinas e a reprodução masculina são demonstrados também pelo fato de que a testosterona tem a capacidade de suprimir a produção de IL-6 e TNF- α e INF- γ pelos macrófagos, linfócitos e células do músculo liso vascular e, assim, atuar de forma protetiva aos danos causados por estas (MALKIN *et al.*, 2003).

2.7.3. As modificações genéticas ocasionadas pela obesidade

As alterações provocadas pela obesidade na reprodução também podem estar ligadas às modificações genéticas. Bakos *et al.* (2011b), em um estudo experimental utilizando camundongos, verificaram que os animais submetidos à dieta hipercalórica rica em gordura, apresentaram espermatozoides com menores índices de capacitação e motilidade, além de aumento do estresse oxidativo e de danos no DNA. Essas alterações foram também refletidas em menores taxas de ligação aos oócitos. Campbell *et al.* (2015) descreveram que homens obesos apresentaram alterações espermáticas com fragmentação do DNA e morfologia anormal dos espermatozoides, além de menores índices de fertilização quando comparados com homens de peso normal.

Como consequências destas alterações, também tem sido relatado que o perfil de microRNA (miRNA) foi alterado em espermatozoides de indivíduos que eram considerados obesos e a inibição do miRNA do pró-núcleo masculino pode produzir uma prole com fenótipos variáveis (SHUKLA *et al.*, 2014).

2.8. Epigenética, transmissão de influências ambientais às gerações descendentes e a relação com a fertilidade masculina

O sistema reprodutor masculino demonstrou ser sensível à influência de agentes ambientais como toxinas e componentes alimentares, especialmente os desreguladores endócrinos, durante as fases iniciais do desenvolvimento e com um significativo impacto na saúde humana (GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2014). Diversos casos humanos fundamentaram esta hipótese e levantaram preocupações sobre o efeito de agentes ambientais sobre a fertilidade humana e de seus descendentes. Em Taiwan, na década de 1970, uma exposição a poluentes orgânicos sintéticos, por ingestão acidental de óleo de arroz com o bifenil policlorinado em mulheres gestantes, produziu efeito negativo sobre a qualidade espermática de seus filhos em idade adulta, com malformações do sistema reprodutor masculino e com atraso no desenvolvimento sexual e físico, verificados ao final da década de 1990 (GUO *et al.*, 2004).

Outro estudo relacionado com a herança transgeracional de influências ambientais, com substâncias químicas, foi realizado por Doyle *et al.* (2013) com camundongos gestantes fêmeas submetidas aos ftalatos. Neste caso, observou-se que houve desorganização celular do epitélio germinativo, além de baixa contagem e motilidade de espermatozoides das gerações F1 a F4. Entretanto, nos dois casos

observados, os estudos envolveram a exposição materna a determinadas substâncias e/ou agentes lesivos, sobre a capacidade reprodutiva das gerações masculinas subsequentes.

O termo definido como “*herança transgeracional epigenética induzida pelo meio ambiente*”, está relacionado com exposições precoces no desenvolvimento e que promovem alterações na programação epigenética das células germinativas, as quais transmitem estas marcas para as gerações subsequentes na ausência das exposições ambientais (GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2014). Essa transmissão de informação independe da sequência de DNA que resultará em determinado fenótipo, pode ser influenciada por fatores ambientais aos quais a geração parental foi submetida e poderá perdurar por várias gerações. Essa via pode ser responsável pela maior predisposição dos descendentes a doenças crônicas como a obesidade, diabete do tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer e até desordens comportamentais (WEI; SCHATTEN; SUN, 2015).

Um exemplo de um processo de herança transgeracional epigenética induzida pelo meio ambiente de forma experimental foi descrito em 2005, ocasionado pela exposição de ratas gestantes ao fungicida agrícola vinclozolina, que tem atividade antiandrogênica, utilizado em plantações de frutas e verduras. No estudo, as ratas gestantes foram submetidas ao tratamento durante o período de determinação sexual da prole e houve apoptose das células espermatogênicas e redução da concentração e viabilidade espermáticas dos descendentes que persistiu por três gerações após a exposição inicial. O mecanismo envolvido foi a alteração do padrão de metilação do DNA das células da linhagem germinativa masculina (ANWAY *et al.*, 2005). Há descrição também de indução transgeracional e alterações de fertilidade

masculina ocasionadas por ftalatos em camundongos (DOYLE *et al.*, 2013) e bisfenol A em ratos (SALIAN; DOSHI; VANAGE, 2011).

A importância do papel dos mecanismos epigenéticos para a infertilidade está relacionado com o fato de que diversos insultos ambientais podem induzi-los (GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2014). De forma experimental, Dunn e Bale (2011) descreveram que dieta rica em gordura ofertada a mães pode ocasionar camundongos descendentes machos com sobrepeso, diabetes e com resistência à insulina e com transmissão para a segunda geração que também foram resistentes à insulina, porém não obesos. Neste caso, as mães gestantes foram expostas às substâncias, com alterações epigenéticas da prole masculina em desenvolvimento.

A metilação do DNA, alterações nas histonas e geração de RNA não codificantes são mecanismos viáveis que poderiam explicar a transferência não genética de informações ambientais paternas (SOUBRY *et al.*, 2014). Dentre estes, a metilação do DNA é um processo que ocorre para regulação de genes durante o desenvolvimento de um indivíduo e pode ser um mecanismo de defesa genômica que serve para bloquear a expressão de sequências gênicas repetidas. Geralmente ocorre na posição 5 dos resíduos de citosina predominantemente dentro dos dinucleotídeos citosina-guanina e que pode ocasionar a não transcrição de genes (TRASLER, 2009). Os padrões alterados de metilação do DNA espermático de genes poderia gerar anormalidades na geração descendente. A acetilação aberrante das histonas do espermatozoide pode promover compactação insuficiente da cromatina espermática durante a espermiogênese e ocasionar parâmetros reprodutivos desfavoráveis (GUERRERO-BOSAGNA; SKINNER, 2014).

2.9. Influências do sobrepeso/obesidade paterna e transmissão transgeracional de desordens metabólicas e reprodutivas

Há evidência emergente de que a obesidade impacta negativamente na reprodução masculina, não somente reduzindo a qualidade do espermatozoide analisado, mas também alterando a estrutura molecular das células germinativas nos testículos e no espermatozoide maduro (PALMER *et al.*, 2012). As alterações no DNA espermático ocasionadas pela obesidade ocorrem por fragmentação, via recrutamento de macrófagos testiculares, ativação de radicais livres e reação acrossômica precoce (KATIB, 2015).

Em estudos de avaliação de influência transgeracional sobre a fertilidade masculina, Navya e Yajuverdi (2017) verificaram alterações transgeracionais de distúrbios reprodutivos masculinos mediados pela obesidade materna. Neste estudo, ratas foram expostas à dieta hipercalórica desde antes do acasalamento até a lactação e os seus descendentes apresentaram quadro de obesidade, com redução da contagem de espermátides arredondadas e de espermatozoides epididimários, além da redução de concentração de testosterona e aumento da leptina séricas. Os autores sugerem que o impedimento da espermatogênese tenha ocorrido pelo quadro de redução de testosterona ocasionado pela hiperleptinemia.

Contudo, se a prole masculina cujos pais foram expostos à condição de disfunção metabólica podem desenvolvê-la, e se as mesmas podem ser transmitidas às futuras gerações ainda permanece incerto (FULLSTON *et al.*, 2013). O primeiro estudo experimental que evidenciou alterações na redução de saúde reprodutiva foi realizado por Fullston *et al.* (2012), no qual foi fornecida dieta hiperlipídica contendo 22% de gordura (em relação a 6% da dieta controle) a camundongos C57Bl/6. Os

pesquisadores observaram que a obesidade induzida promoveu alterações reprodutivas na geração paterna com aumento de expressão de espécies reativas de oxigênio e danos morfológicos espermáticos. Este quadro ocasionou distúrbios reprodutivos a nível de gametas nos descendentes machos e fêmeas de geração F1, com resultados compatíveis com subfertilidade. Entretanto, com relação à geração F2, foi evidenciado que os descendentes machos provenientes de fêmeas F1 apresentaram maiores danos reprodutivos em relação aos machos F2 provenientes dos descendentes machos F1. No caso das fêmeas F2, as que foram provenientes dos machos F1 ainda apresentaram alterações reprodutivas como estresse oxidativo nos ovócitos. Entretanto, estas alterações não foram observadas nas fêmeas F2 filhas de fêmeas F1. Os autores demonstraram que condições de obesidade masculina podem apresentar alterações reprodutivas em até duas gerações descendentes, embora com menor efeito na geração F2. Pelo maior acometimento dos machos F2 provenientes de fêmeas F1, os autores sugerem que as alterações podem também estar relacionadas com a expressão gênica do cromossomo sexual X.

Fullston *et al.* (2013) também descreveram que a obesidade induzida em camundongos machos C57Bl/6 da geração F0 por dieta hiperlipídica, provocou alterações metabólicas nas gerações descendentes F1 e F2. Neste caso, mesmo a geração F0 não apresentando alterações do metabolismo glicêmico, tanto os machos e fêmeas descendentes apresentaram transmissibilidade de obesidade e resistência insulínica. O efeito foi considerado maior na geração F1 em relação à geração F2, sendo esta última, com maior acometimento de machos F2 provenientes de fêmeas F1 e de fêmeas F2 provenientes de machos F1, cuja geração F0 tenha recebido dieta hiperlipídica. Neste estudo, o aumento de cerca de

21% na adiposidade paterna promoveu alterações genéticas em nível testicular das gerações F1 e F2, com expressão alterada de RNA espermático e redução de 25% do padrão de metilação do DNA. Para os autores, estes achados podem estar envolvidos na transmissibilidade da saúde metabólica para as gerações descendentes, como ocorre com os humanos.

Além disso, estudos realizados por Barbosa *et al.* (2016) demonstraram que alterações epigenéticas puderam ser transmitidas transgeracionalmente pelo epigenoma espermático e promover alterações metabólicas em duas gerações de ratos.

O campo de estudo das influências ambientais maternas sobre a saúde dos descendentes tem sido bem estabelecido e foi denominado de “*Developmental Origin of Health and Disease*” (DOHaD) ou origem da saúde e doença provenientes do desenvolvimento. Contudo, ainda são poucos os trabalhos que estudam as influências ambientais paternas sobre a saúde da prole. Essa necessidade de mais estudos foi evidenciada no ano de 2017, no qual foi constituído outro campo de pesquisa, denominado de POHaD - “*Paternal Origins of Health and Disease*”, no qual se visa apontar a necessidade de entender o papel do pai na transmissão de influências ambientais sobre a geração descendente, principalmente porque modificações no epigenoma espermático podem estar implicadas neste processo (SOUBRY, 2018).

Dentre os diversos trabalhos experimentais que se utilizam de dieta, a maioria utiliza apenas um fator em excesso na alimentação como as dietas hiperlipídicas. Ainda são escassos os trabalhos que se baseiam em padrões de dieta ou grupos de alimentos que mimetizem a dieta ocidental moderna (GASKINS *et al.*, 2012). Estes

apresentam o fornecimento de maiores proporções de mais de um componente como os lipídios e glicídios, chamadas dietas “*High-Fat-High-Sugar*”.

Portanto, a compreensão dos efeitos de uma dieta do tipo *High-Fat-High-Sugar* no metabolismo e fertilidade da geração paterna, e nos seus descendentes são necessários, o que motivou a realização do presente trabalho.

3. Hipótese

As gerações F1 e F2 de ratos, cuja geração parental masculina foi submetida às condições de dieta hipercalórica, apresentam alterações metabólicas e reprodutivas.

4. Objetivos

4.1. Geral

Avaliar o efeito da dieta hipercalórica sobre o sistema reprodutor masculino e o metabolismo de ratos Wistar adultos da geração parental e das gerações F1 e F2.

4.2. Específicos

- Avaliar o desenvolvimento morfológico dos animais, com relação à idade do início da puberdade;
- Determinar a concentração dos espermatozoides epididimários;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos séricos dos animais, com a determinação da concentração de creatinina, ureia, ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), colesterol total e suas frações HDL e LDL e triglicérides;
- Avaliar o metabolismo glicêmico dos animais pela determinação do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e teste de tolerância à insulina (TTI);
- Avaliar o peso corporal e o coeficiente de eficiência energética (CEE) e medidas como o comprimento nasoanal (CNA) dos animais;
- Avaliar o peso de órgãos e das gorduras retroperitoneal e perigonadal;
- Analisar as medidas histométricas testiculares.

5. Material e Métodos

A metodologia proposta para este trabalho seguiu os guias da Organização para Cooperação de Desenvolvimento Econômico - *OECD Series on Testing and Assessment* N. 21 (OECD, 2002) - para avaliação do efeito de desreguladores de hormônios sexuais. Além deste, seguiram-se as recomendações da Conferência Internacional em Harmonização (ICH) dos requerimentos técnicos para registro dos fármacos para uso humano e de detecção de toxicidade para produtos medicinais e contra a fertilidade masculina (ICH, 2005).

O delineamento experimental seguiu as normas internacionais preconizadas no manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011) e na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora e protocolado sob o número 03/2016 (ANEXO 1).

O estudo foi realizado no Biotério de Experimentação Animal do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, registrado com o número 02.0048.2019 de CIAEP (Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa) e as análises foram realizadas nos laboratórios do CBR.

5.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769) fornecidos pelo Biotério de Produção do CBR, também registrado com o mesmo CIAEP. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do CBR em mini-isoladores da marca ALESCO® (Brasil), de 48,3 × 33,7 × 21,4 cm de dimensões, forrados com maravalha não esterilizada, dotadas de cocho aramado para disposição de ração do tipo peletizada e bebedouros do tipo mamadeira de garrafa de polipropileno, providos de água filtrada. Os mini-isoladores foram dispostos em estantes ventiladas da marca ALESCO® (Brasil) que forneciam ambiente climatizado aos animais, com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e com 12 trocas de ar por minuto. O alojamento dos animais ocorreu em salas com dispositivo para manter a iluminação com ciclo de claro/escuro de 12 horas. A proporção de animais foi de cinco animais por mini-isolador, que correspondeu a cinco animais/1627,71 cm², ou seja, de um animal para cada 325,54 cm², ou um animal para cada 0,032554 m². O ambiente de manutenção dos animais seguiu as recomendações das resoluções normativas 15 (CONCEA, 2013a) e 30 (CONCEA, 2016) do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

5.1.1. Composição das Gerações F0, F1 e F2 de ratos Wistar

Foram utilizados 30 ratos machos (n=30) com vinte e cinco dias de vida advindos do Biotério de Produção do CBR e que estavam se alimentando de dieta do tipo padrão com a ração normocalórica da marca Nuvilab CR-1 irradiada, da empresa Quimtia® (Curitiba - PR, Brasil). Os animais compuseram os grupos da

geração F0 e foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com 15 animais cada (n=15). Os grupos avaliados receberam as dietas padrão e hipercalórica respectivamente, de forma *ad libitum* dos 25 até os 90 dias de vida. Após os 90 dias, 10 animais de cada grupo foram eutanasiados e cinco, tomados de forma aleatória, foram destinados ao acasalamento com fêmeas de fertilidade comprovada (segunda gestação), de quatro meses, alimentadas com dieta padrão, na proporção de uma fêmea para cada macho. A confirmação da cópula foi realizada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal que foi realizado diariamente. Para os cinco machos da geração F0 de cada grupo foram utilizadas cinco fêmeas.

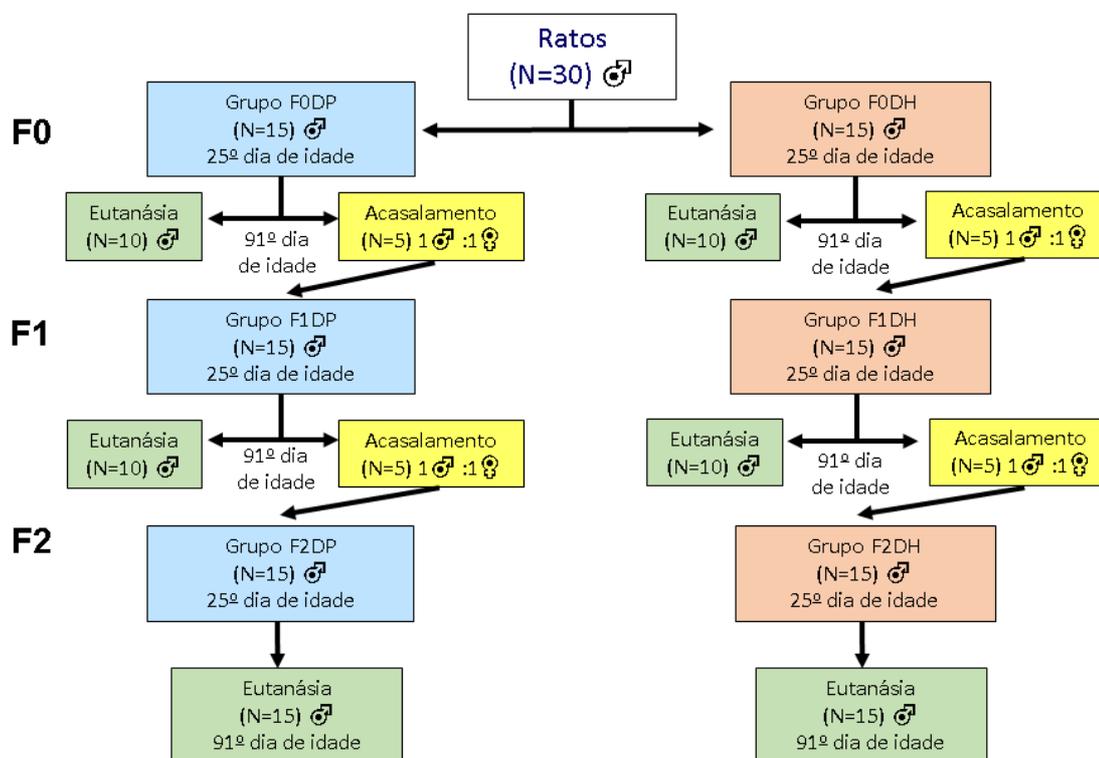
Após a confirmação da gestação, os machos que foram destinados à cópula, foram separados das fêmeas e aguardaram mais 72 horas para recomposição da reserva espermática e, posteriormente, foram encaminhados para a eutanásia. Nesse período, os ratos receberam suas respectivas rações conforme os grupos aos quais eles pertenceram. As fêmeas prenhes foram identificadas e alojadas até o momento do parto, alimentadas com dieta padrão, sendo que no dia anterior ao mesmo, foram individualmente alojadas. Após dois dias do parto, foi realizada a sexagem das crias, e a ninhada de cada fêmea foi padronizada em oito componentes, sendo quatro machos e quatro fêmeas. As fêmeas neonatas, após o desmame, foram destinadas para outros estudos. De cada grupo experimental (dieta padrão ou dieta hipercalórica) foram tomados até 15 machos por grupo parental respectivo que compuseram a geração F1 (n=15). Foram tomados, de forma aleatória, três filhotes machos de cada macho acasalado, totalizando os 15 animais da geração F1.

Os animais da geração F1 foram separados nos respectivos grupos aos quais pertenceram na geração parental, com 15 animais cada. Todos os grupos

receberam dieta padrão normocalórica (ração Nuvilab CR-1, Quimtia®) até os 90 dias de vida. Após esse período, de forma semelhante ao que foi realizado com a geração F0, 10 animais de cada grupo foram eutanasiados e cinco, tomados de forma aleatória, foram destinados ao acasalamento com fêmeas de fertilidade comprovada (segunda gestação), de quatro meses, alimentadas com dieta padrão, na proporção de uma fêmea para cada macho. A confirmação da cópula foi realizada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal que foi realizado diariamente. Para os cinco machos da geração F1 de cada grupo foram utilizadas cinco fêmeas.

As fêmeas prenhes foram identificadas e alojadas até o momento do parto, alimentadas com dieta padrão, sendo que no dia anterior ao mesmo, foram individualmente alojadas. Após dois dias do parto, foi realizada a sexagem das crias, e a ninhada de cada fêmea foi padronizada em oito componentes, sendo quatro machos e quatro fêmeas. As fêmeas neonatas, após o desmame, foram destinadas para outros estudos. De cada grupo experimental (dieta padrão ou dieta hipercalórica) foram tomados 15 machos por grupo parental respectivo que compuseram a geração F2 (n=15). Foram tomados, de forma aleatória, três filhotes machos de cada macho de geração F1 acasalado, totalizando os 15 animais da geração F2. Os grupos da geração F2 foram submetidos à dieta padrão até os 90 dias de idade. Após esse período, todos os animais foram eutanasiados e não houve acasalamento. Dessa maneira, para este estudo, foram utilizados o total de 110 ratos, sendo 90 machos e 20 fêmeas (Figura 1). Ressalta-se que apenas os animais F0DH receberam a dieta hipercalórica. Todos os demais animais, receberam a dieta padrão.

Figura 1 – Organograma que demonstra a distribuição dos animais nos grupos experimentais utilizados no estudo. Os ratos da geração F0 receberam dieta padrão ou hipercalórica do 25º até o 90º dia de vida. Os animais das gerações F1 e F2 de todos os grupos receberam dieta padrão.



F0DP – grupo de animais de geração F0 que recebeu dieta padrão, F0DH – grupo de animais de geração F0 que recebeu dieta hipercalórica, F1DP – grupo de animais de geração F1 provenientes de geração F0 que recebeu dieta padrão, F1DH – grupo de animais de geração F1 provenientes de geração F0 que recebeu dieta hipercalórica, F2DP – grupo de animais de geração F2 provenientes de geração F0 que recebeu dieta padrão, F2DH – grupo de animais de geração F2 provenientes de geração F0 que recebeu dieta hipercalórica. Todos os animais das gerações F1 e F2 receberam dieta padrão. ♂ = animais do gênero masculino; ♀ = animais do gênero feminino.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2. Rações utilizadas para determinação das dietas padrão e hipercalórica

O grupo dieta padrão (DP) recebeu a ração normocalórica da marca Nuvilab CR-1 irradiada, da empresa Quimtia® (Curitiba - PR, Brasil) de densidade calórica de 3,86 kcal/kg. O extrativo não nitrogenado, constituído pelos carboidratos (57%), era composto, em sua maior parte, por milho integral moído e farelos de soja e trigo. O

grupo dieta hipercalórica (DH) recebeu a ração hipercalórica HF peletizada, rica em sacarose e lipídios, de alta palatabilidade fabricada pela empresa PragSoluções Comércio e Serviços Ltda[®] (Jaú - SP, Brasil) com densidade calórica de 4,77 kcal/kg. Deste aporte calórico, 45% é advindo de gordura e 20% de sacarose. O componente lipídico principal da ração era constituído de banha de porco (80% do total) (Figura 2). As recomendações de composição da ração hipercalórica seguiram os protocolos utilizados por Park *et al.* (1999).

Figura 2 – Figura que demonstra o aspecto das rações que compuseram as dietas fornecidas aos animais da geração parental. DP – Dieta padrão, composta por ração padrão com 3,86kcal/kg - Quimtia[®] (Curitiba - PR, Brasil). DH – Dieta hipercalórica, composta por ração hipercalórica com 4,77kcal/kg - PragSoluções Comércio e Serviços Ltda[®] (Jaú - SP, Brasil).



Fonte: arquivo pessoal.

As rações foram fornecidas para os animais do grupo F0 conforme o tipo de dieta pré-estabelecida, dos 25 até os 90 dias de vida. A tabela 1 demonstra a composição comparativa das dietas utilizadas no trabalho.

Tabela 1: Comparativo entre as composições das dietas que foram fornecidas aos ratos de geração F0 do 25^o até o 90^o dia de vida.

Composição	Dieta Padrão Ração Nuvilab CR-1 Quimtia®	Dieta Hipercalórica Ração HF 45% PragSoluções®
Matéria mineral (%)	9,0	6,2
Proteína bruta (%)	22,0	23,7
Extrato etéreo (%)	5,0	23,9
Fibra bruta (%)	7,0	4,5
Extrativo não nitrogenado (%)	57,0	41,7
Total (%)	100,0	100,0
Densidade Calórica (kcal/kg)	3,86	4,77

Fonte: dados fornecidos pelos fabricantes das rações.

5.3. Avaliações de peso corporal, consumo alimentar e aporte calórico

Após os 25 dias de vida, os filhotes machos (geração F0, F1 e F2) foram avaliados semanalmente e anotados os dados quanto à evolução de peso corporal total (g) e a estimativa de consumo alimentar de um dia. A primeira anotação de peso dos animais foi realizada aos 25 dias de vida (primeira semana de avaliação) e a anotação de consumo de ração, a partir da segunda semana de avaliação, devido a quesitos de adaptação à dieta. Por se tratar de exposição a duas diferentes dietas na geração F0, também foi determinado, a cada 7 dias, a medida do aporte calórico de um dia por animal, que foi calculado a partir da estimativa de consumo diário (g) por animal e da respectiva densidade calórica da ração. O aporte calórico se iniciou a partir da segunda semana de avaliação e terminou até a semana de eutanásia.

5.4. Determinação do Coeficiente de Eficiência Energética (CEE)

Com base na evolução de peso dos animais e o aporte calórico, foi determinado o coeficiente de eficiência energética (CEE), que determina a conversão do aporte calórico em aumento de peso dos animais, tomando-se como base a fórmula matemática 1 utilizada segundo Nery *et al.* (2011)

$$CEE = \frac{PCF-PCI}{ACT} \quad (1)$$

Sendo:

CEE – Coeficiente de Eficiência Energética (g/cal)

PCF – Peso corporal final aos 90 dias de idade (g)

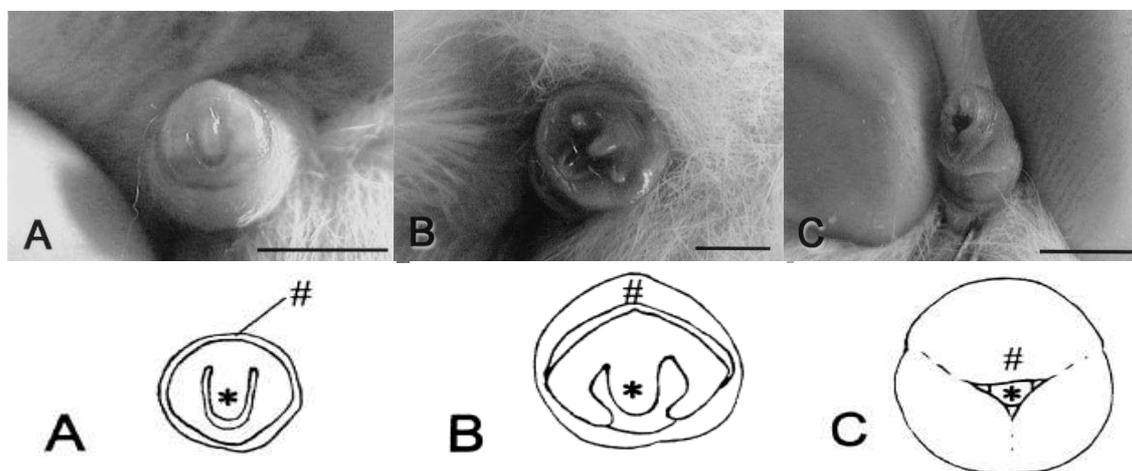
PCI – Peso corporal inicial aos 25 dias de idade (g)

ACT – Aporte calórico total dos 25-90 dias de idade (calorias)

5.5. Avaliação de idade pré-puberal dos animais

A partir dos 18 dias pós-natal, os ratos das gerações F1 e F2 foram avaliados diariamente quanto ao desenvolvimento pré-puberal com relação à idade (dias) em que foram visualizados a descida dos dois testículos e a ocorrência da morfologia da glândula, especificadas nas fases A, B e C segundo Yamasaki *et al.* (2001) (Figura 3).

Figura 3 – Determinação de avaliação de fase pré-puberal de ratos Wistar pela modificação morfológica da glândula do pênis. Foram anotados os dias de vida em que ocorreram as fases A – com protuberância do osso peniano; B – formato de W e C – achatamento da superfície da glândula.



*osso peniano; #tecido conectivo lateral que se projeta sobre a glândula do pênis. Barra=5mm.

Fonte: modificado de Yamasaki *et al.* (2001).

5.6. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Duas semanas antes da eutanásia, os animais machos foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O objetivo do teste é a avaliação da capacidade de secreção insulínica pelo pâncreas dos animais. O método consiste em manter os animais em jejum alimentar de 6 horas e obter o sangue por meio de secção da ponta da cauda por lancetamento com uso de lâmina de bisturi para aferição de glicemia capilar no T0 (tempo zero). Em seguida, foi administrado 2 g/kg de peso corporal de solução de glicose a 50% aos animais, por via intragástrica (gavagem), e coletado a partir de então, amostras de sangue nos tempos T1 (15 minutos), T2 (30 minutos), T3 (60 minutos) e T4 (120 minutos) (SILVA *et al.*, 2015). As aferições de glicose capilar subsequentes foram realizadas nos tempos determinados após a administração de glicose pela via intragástrica. Todas as

amostras foram analisadas em glicosímetro Accu-Check® modelo Active (Roche - Alemanha). A avaliação da tolerância à glicose foi avaliada pela área sob a curva que foi calculada utilizando-se o programa Graphpad Prism® – Versão 5 (La Jolla, Estados Unidos).

5.7. Teste de tolerância à insulina (TTI)

O objetivo do teste é a avaliação da resistência à ação da insulina exógena nos animais. Uma semana antes da eutanásia, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina. Estes, foram mantidos em jejum alimentar de 6 horas previamente ao teste e, então, tiveram novamente a glicose aferida por meio de sangue coletado a partir da ponta da cauda. Os animais receberam dose de insulina do tipo NPH Novolin – Novo Nordisk® (Bagsvaerd, Dinamarca) por via intraperitoneal na dose de 1 UI/kg de peso. As medidas subsequentes de glicose foram realizadas no T1 (5 minutos), T2 (15 minutos), T3 (30 minutos) e T4 (45 minutos) (HIRATA *et al.*, 2003). Os tempos necessários para coleta foram contados a partir da administração intraperitoneal da solução de insulina. Todas as amostras foram analisadas em glicosímetro Accu-Check - modelo Active da marca Roche® (Roche - Alemanha). A avaliação da sensibilidade à insulina foi feita pela determinação da constante de decaimento de glicose/minuto (K_{TTI}), que estabelece a redução da glicemia capilar em porcentagem por minuto. Para isto, foi utilizado o programa Graphpad Prism® – Versão 5 (La Jolla, Estados Unidos).

5.8. Eutanásia

Os animais adultos foram eutanasiados por exsanguinação cardíaca após anestesia e complementada pela ruptura diafragmática (CONCEA, 2018). O protocolo anestésico utilizado foi a combinação do anestésico dissociativo cloridrato de quetamina na dose de 90 mg/kg (Vetanarcol®, Konig – Brasil) e o sedativo e miorelaxante cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg (Kensol®, Konig – Brasil). Os dois fármacos foram misturados e aplicados unicamente pela via intraperitoneal segundo protocolo anestésico preconizado por Wolfensohn e Lloyd (1994). Foi aguardado o tempo mínimo de 5 minutos para se proceder à ruptura diafragmática. Antes desta, e após a anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca e o soro sanguíneo foi separado, fracionado em alíquotas e armazenado a -80° C para as análises bioquímicas.

As crias excedentes de cada mãe, as quais não foram necessárias para compor os animais das gerações F1 e F2, foram eutanasiadas pelo método de decapitação com tesoura.

5.9. Determinação do comprimento nasoanal (CNA) e estimativa de acúmulo de tecido adiposo

Após a eutanásia, com o auxílio de uma fita métrica, foi determinada a distância em centímetros (cm) das narinas do animal até a inserção da base da cauda, que correspondeu ao comprimento nasoanal (CNA). A estimativa de acúmulo de tecido adiposo foi realizada pelo peso (g) dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal após necropsia. Essa identificação foi realizada após dissecação dos

órgãos abdominais e das gorduras, as quais foram pesadas em balanças de precisão Ohaus - modelo Adventure Pro[®] (São Bernardo do Campo, Brasil).

5.10. Avaliação da lipídemia e avaliações bioquímicas séricas

Os níveis séricos de ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), colesterol total e frações (HDL e LDL) foram avaliados utilizando kits comerciais da marca Roche[®], o aparelho analisador Cobas, Modelo C 111, também da marca da Roche[®] (Indianápolis, Estados Unidos).

5.11. Contagem dos espermatozoides

A contagem de espermatozoides epididimários foi feita por meio de amostras coletadas a partir da secreção da cauda do epidídimo direito de acordo com Kempinas e Lamano-Carvalho (1988) e Seed *et al.* (1996), obtidas por uma pequena incisão com tesoura cirúrgica oftálmica para Íris e obtenção de duas frações de secreção. Estas, foram imediatamente colocadas em 50 μ L de solução tampão salina fosfato (Sigma[®] - Estados Unidos) para cada fração, previamente preparada em uma placa de Petri disposta sobre uma placa aquecida a 37° C. Foi aguardado o tempo de 5 minutos para ocorrer a homogeneização do material. Essa amostra foi considerada a solução homogeneizada inicial. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, foi retirada uma alíquota de 20 μ L da solução homogeneizada e colocado em 6 mL de água destilada para imobilização dos espermatozoides e diluição da ordem de um para 300. Essa amostra diluída foi acondicionada nos dois retículos da câmara de Neubauer e os espermatozoides foram contados em

microscópio de luz modelo BX41TF Olympus® (Japão) no aumento de 100×. De cada retículo da câmara, foram contados os espermatozoides localizados nos quatro quadrantes laterais. Para cada animal, foi realizada a contagem nos dois retículos da câmara. O valor total foi dividido por oito e obtido o valor médio de um quadrante lateral. A partir desse valor, foi obtida a concentração final de espermatozoides/mL a partir da fórmula matemática 2:

$$x = a \times 300 \times 10.000 \quad (2)$$

Sendo:

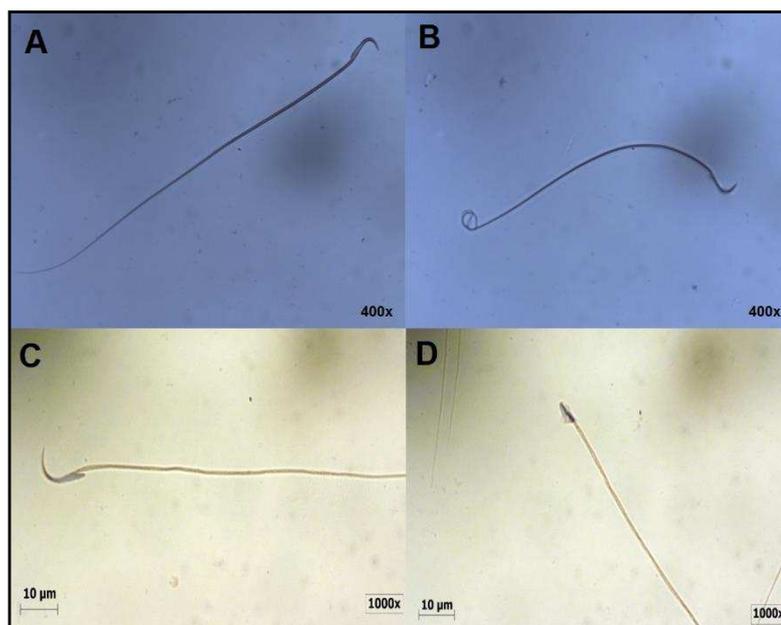
x = concentração final de espermatozoides/mL

a = média obtida por quadrante do número de espermatozoides contados em oito quadrantes laterais da câmara de Neubauer

5.12. Avaliação de morfologia espermática

Foi realizada diluição de 20 µL da secreção epididimária da placa de Petri em 2 mL de tampão salina fosfato Sigma® (Estados Unidos). Uma gota dessa diluição foi colocada uma lâmina de vidro para realização do esfregaço. Após secagem deste, a lâmina foi corada pela técnica de Shorr para realização de contagem e classificação morfológica dos espermatozoides a fim de determinar os índices de anormalidades (WHO, 2010). Foram analisados 200 espermatozoides íntegros (que não sofreram decapitação advinda do método de coleta e realização do esfregaço) e classificados em normais e anormais no aumento de 1.000× em microscópio de luz. As principais alterações dos espermatozoides avaliadas foram: defeitos de cabeça, como amorfas e cabeça dupla e defeitos de cauda, como caudas quebradas e enroladas (Figura 4)

Figura 4 – Esfregaço de espermatozoides corado pela técnica de Shorr para avaliação morfológica com microscópio de luz. A – espermatozoide evidenciando a cauda normal; B – espermatozoide com a cauda enrolada; C – espermatozoide com a cabeça normal; D – espermatozoide com a cabeça disforme. A e B: aumento de 400x. C e D: aumento de 1000x.



Fonte: arquivo do CBR/UFJF

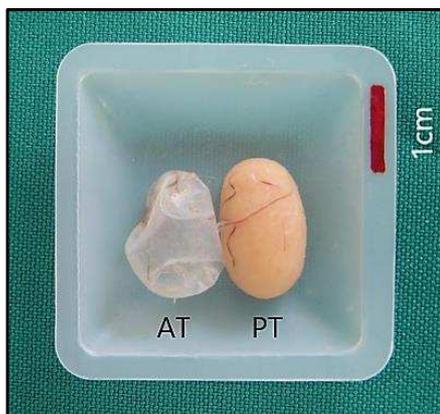
5.13. Peso dos órgãos

Os animais foram submetidos à necropsia e tiveram os seguintes órgãos removidos e pesados em balança de precisão Ohaus - modelo Adventure Pro® (São Bernardo do Campo, Brasil): testículos esquerdo e direito, epidídimo direito, vesícula seminal repleta, próstata, rins, fígado, baço e glândulas adrenais esquerda e direita.

5.14. Análise histométrica testicular

Após pesagem, os testículos foram fixados por meio da imersão em fixador modificado de Karnovsky (paraformaldeído a 4%: glutaraldeído a 4% em tampão salina fosfato 0,1 mL/L, pH 7,4). Vinte e quatro horas após o início da fixação, o testículo direito teve a albugínea removida e pesada e o também parênquima testicular pesado (Figura 5). O testículo esquerdo foi seccionado e os fragmentos foram transferidos e mergulhados em solução de álcool 70% até o processamento histológico.

Figura 5 – Imagem que demonstra a separação da albugínea testicular (AT) do parênquima testicular (PT), 24 horas após fixação para nova pesagem.



Fonte: arquivo pessoal.

Os fragmentos testiculares foram incluídos em resina histológica - 2-hidroxietil metacrilato - Leica® (Alemanha) e submetidos à microtomia com uso de navalha de vidro. Os cortes foram realizados em espessura de 3 μ m, mantendo-se uma distância de 50 cortes entre os escolhidos para o estudo, dispostos em lâminas de vidro e corados com o corante azul de toluidina – borato de sódio a 1%. As preparações foram montadas e tiveram as lamínulas fixadas com Entellan® (Brasil).

Os cortes histológicos foram fotografados em microscópio de luz modelo AXIOPHOT HBO50 Zeiss® (Alemanha) dotado de câmera acoplada para captura modelo AXIOCAM ICc3 Zeiss® (Alemanha). Foi utilizado o programa de captura de imagem e sistema de mensuração digital Axiovision versão 4.9.1 Zeiss® (Alemanha). Os seguintes parâmetros foram analisados baseados nos estudos realizados por França e Godinho (2003) e Oshio *et al.* (2015): densidade volumétrica dos compartimentos testiculares tubular (DTT) e intertubular (DTI); volume dos compartimentos testiculares tubular (VTT) e intertubular (VTI); índice tubulossomático (ITS); diâmetros do túbulo seminífero (DT) e do lúmen tubular (DL); altura do epitélio seminífero (AE); comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (CT) e por grama de testículo (CTG); densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular.

5.14.1. Densidade volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular testiculares

Foram contados 2.660 pontos, utilizando uma grade padronizada de 266 pontos aplicada sobre as imagens histológicas com o programa Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 Media Cybernetics® (Estados Unidos). A grade foi composta por linhas longitudinais e transversais, considerando-se como pontos, as interseções das linhas (Figura 6). Os 2.660 pontos foram obtidos em 10 imagens obtidas de campos escolhidos de forma aleatória por animal. Cada ponto foi analisado e classificado como pertencente ao compartimento tubular ou intertubular.

Para a avaliação de densidade de volume dos compartimentos tubular (DTT) e intertubular testiculares (DTI), foram utilizadas as fórmulas 3 e 4, respectivamente.

$$x = (a \div 2.660) \times 100 \quad (3)$$

$$y = (b \div 2.660) \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

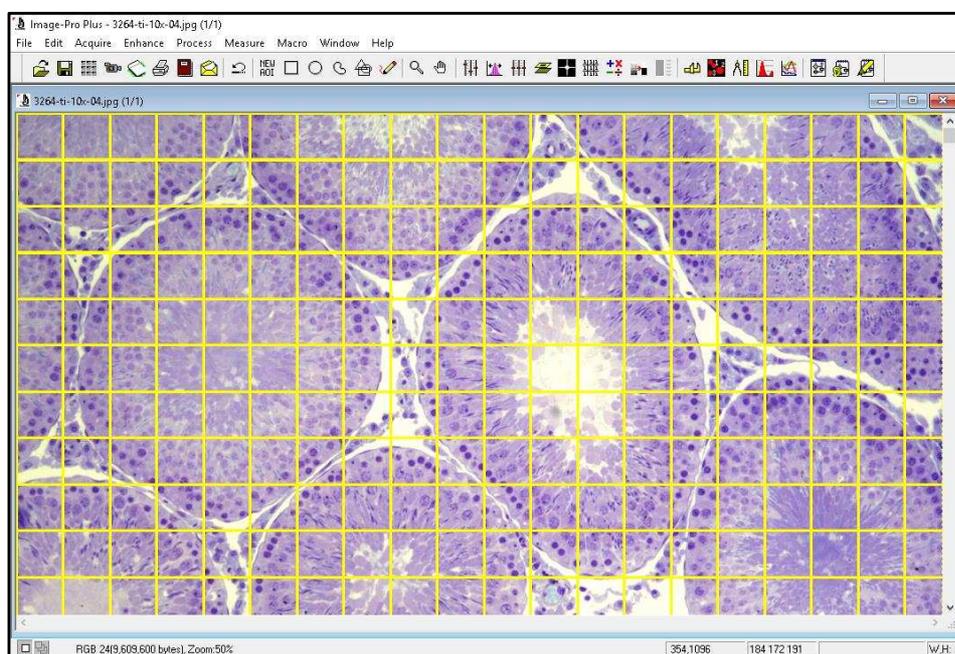
x = densidade volumétrica do compartimento tubular

y = densidade volumétrica do compartimento intertubular

a = soma total dos pontos sobrepostos no compartimento tubular

b = soma total dos pontos sobrepostos no compartimento intertubular

Figura 6 – Imagem que demonstra a utilização da grade ortogonal aplicada sobre as fotomicrografias tomadas com a objetiva de 10x de aumento com auxílio do programa Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 Media Cybernetics® (Estados Unidos). Os pontos são os locais de interseção entre as linhas verticais e horizontais.



Fonte: arquivo pessoal.

5.14.2. Volume dos compartimentos testiculares tubular e intertubular e índice tubulossomático

Para a determinação do volume dos compartimentos tubular (VTT) e intertubular (VTI), foram utilizadas, respectivamente as fórmulas 5 e 6. Foi considerada a densidade específica testicular igual a 1 (JOHNSON; PETTY; NEAVES, 1981), dessa maneira, o peso do parênquima (g) foi considerado igual ao seu volume (mL).

$$x = (a \times z) \div 100 \quad (5)$$

$$y = (b \times z) \div 100 \quad (6)$$

Sendo:

x = volume do compartimento tubular (mL)

y = volume do compartimento intertubular (mL)

z = peso do parênquima testicular (g)

a = densidade volumétrica do compartimento tubular

b = densidade volumétrica do compartimento intertubular

Também foi calculado o índice tubulossomático (ITS), determinado a partir da fórmula 7:

$$x = (a \div y) \times 100 \quad (7)$$

Sendo:

x = índice tubulossomático (ITS)

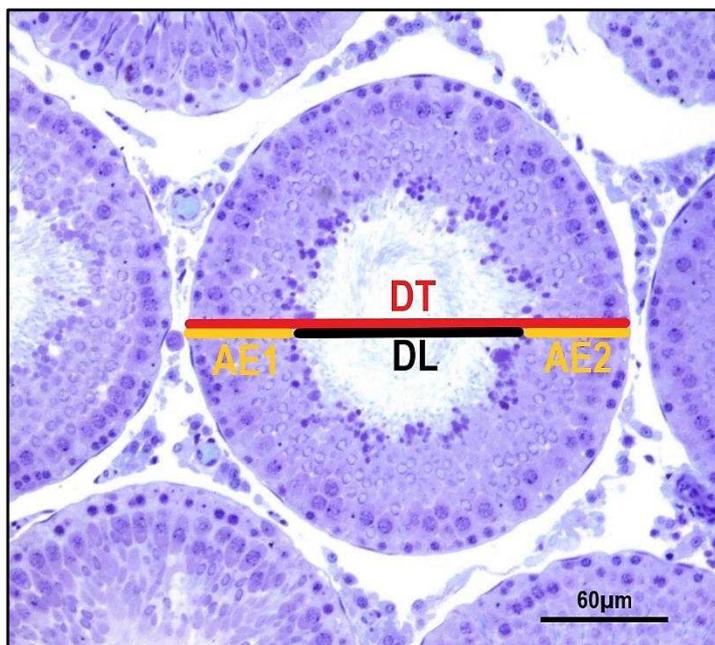
a = volume do compartimento testicular tubular

y = peso corporal

5.14.3. Diâmetros do túbulo seminífero e do lúmen tubular e altura do epitélio seminífero

Vinte secções transversais dos túbulos seminíferos mais circulares possíveis, por animal, foram digitalizadas com a lente objetiva de 10×. As medidas obtidas de cada túbulo seminífero foram o diâmetro total (DT), o raio tubular, a altura do epitélio (AE) e o diâmetro luminal (DL). O DT foi medido pela maior distância mensurada da secção transversal do túbulo ao perpassar pelo centro. Dividindo-se o valor do DT por dois, determinou-se o raio tubular. Paralelamente à medida de DT, foram realizadas duas medidas da altura do epitélio seminífero (AE1 e AE2), tomadas em posições opostas e foi considerado o valor médio dessas duas medidas (AE). A determinação do DL foi feita por meio da diferença entre o valor de DT com a soma das duas alturas do epitélio seminífero (Figura 7).

Figura 7 – Determinação de medidas histométricas testiculares dos túbulos seminíferos de ratos Wistar de geração F0 que receberam dieta padrão (F0DP) ou dieta hipercalórica (F0DH) e de seus descendentes F1 e F2.



DT – Diâmetro total; AE1 – Medida 1 da altura do epitélio seminífero; AE2 – Medida 2 da altura do epitélio seminífero; DL – Diâmetro luminal obtido por meio de: $DL = DT - (AE1 + AE2)$. O raio tubular foi determinado ao se dividir o valor de DT por 2 (dois).

Fonte: arquivo pessoal.

5.14.4. Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo

Com a determinação da medida do raio do túbulo seminífero e do volume ocupado pelos mesmos, foi obtido o comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) pela fórmula 8 (ATTAL; COUROT, 1963):

$$x = a \div (\pi \times r^2) \quad (8)$$

Sendo:

x = comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo

a = volume do compartimento tubular

π = valor de π , sendo considerado = 3,14

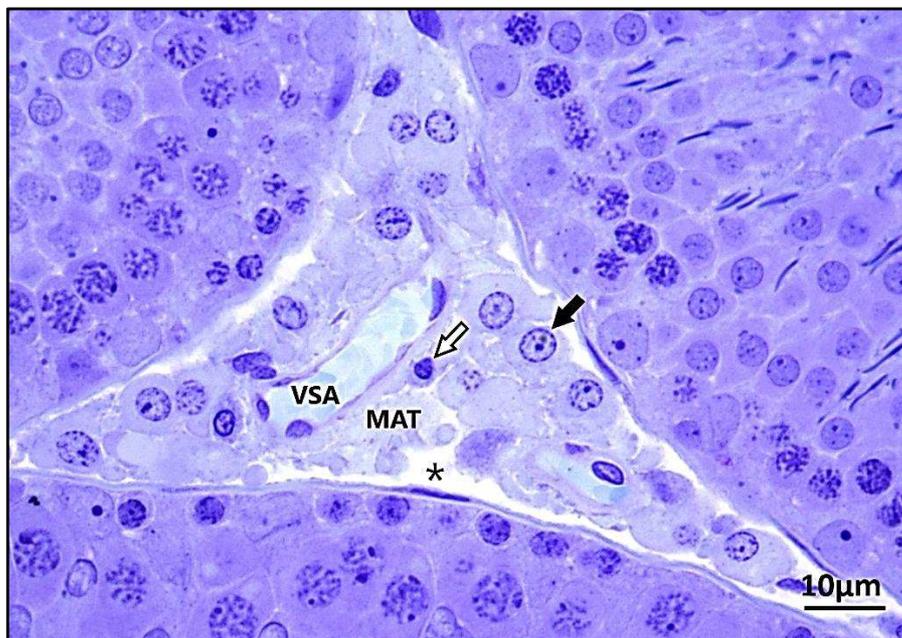
r = raio do túbulo seminífero

Dividiu-se o comprimento total dos túbulos seminíferos pelo peso total dos testículos (CTG) e obteve-se o comprimento dos túbulos por grama de testículo.

5.14.5. Densidade volumétrica e volume dos componentes do tecido intertubular

Foram contados 1.000 pontos projetados sobre imagens capturadas da região intertubular nos diferentes cortes histológicos do testículo de cada animal com aumento de 400 \times utilizando uma grade padronizada de 609 pontos. Os pontos foram classificados e quantificados conforme estivessem sobre as células de Leydig (LEY), vasos sanguíneos (VSA), espaços linfáticos (LIN), matriz extracelular (MAT) e macrófagos (MAC) (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografia que demonstra a definição dos componentes do compartimento testicular intertubular que foi usada para avaliação histométrica testicular de ratos Wistar de geração F0 que receberam dieta padrão (F0DP) ou dieta hipercalórica (F0DH) e de seus descendentes F1 e F2.



Os seguintes símbolos correspondem a: MAT – Matriz extracelular; VSA – Vasos Sanguíneos; * – Espaço linfático; seta fechada – célula de Leydig; seta aberta – macrófago.

Fonte: arquivo pessoal.

A densidade volumétrica desses elementos foi calculada a partir da seguinte fórmula 9:

$$x = (a \div 1.000) \times 100 \quad (9)$$

Sendo:

x = densidade volumétrica dos elementos do compartimento intertubular

a = soma total dos pontos sobrepostos sobre cada elemento do compartimento intertubular

O volume dos elementos intertubulares foi calculado a partir da fórmula 10:

$$x = (a \times z) \div 100 \quad (10)$$

Sendo:

x = volume do elemento intertubular

a = densidade volumétrica de um elemento do compartimento intertubular

z = volume do espaço total intertubular

5.15. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por meio do teste de Shapiro-Wilk para avaliação de distribuição normal. Para os dados com distribuição normal, foi utilizado o teste t de Student para comparação entre os grupos de dieta padrão e hipercalórica. Para dados sem distribuição normal, foi usado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado para o presente estudo foi de $p < 0,05$.

Para a análise estatística, utilizou-se o programa SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences), versão 21 (Nova York, Estados Unidos).

6. Resultados e discussão

Os resultados e discussão são apresentados na forma de artigo submetido em periódico conforme demonstrado no Apêndice.

7. Comentários Gerais

A dieta hipercalórica utilizada no projeto se diferenciou das mais comumente utilizadas em experimentação por ser considerada do tipo “*High-Fat-High-Sugar*”, ou seja, rica em sacarose e gordura. As mais comumente requeridas apresentam apenas um componente nutricional em excesso, sendo hiperlipídicas ou hiperglicídicas. A escolha da ração do tipo HFHS foi devido à maior semelhança com o padrão alimentar ocidental humano atual.

Pode-se evidenciar que a ração promoveu alterações metabólicas diferentes das observadas das dietas hiperlipídicas descritas na literatura, levando a geração parental ao quadro de dislipidemia, maior coeficiente de eficiência energética sem alterar o metabolismo glicêmico. Contudo, outros efeitos foram semelhantes, como maior adiposidade e alterações reprodutivas.

Embora sem alterações evidentes como na geração parental, os grupos F1 e F2 descendentes dos grupos expostos à DH apresentaram maior coeficiente de eficiência energética (F1) e maior crescimento corpóreo (F2) e alterações no peso renal, sugerindo que podem ter comprometido, embora em menor escala, o metabolismo destas duas gerações.

A geração parental apresentou alterações macroscópicas como redução do peso gonadal. Contudo, as gerações descendentes apresentaram alterações que variaram desde a precocidade da fase pré-puberal e alterações histométricas testiculares em maior expressividade nas gerações F0 e F1, e menor na F2.

Embora não tenham sido evidenciadas alterações adicionais, ressalta-se que a observação dos animais contemplou somente até a fase adulta jovem, sendo que, comumente, os distúrbios metabólicos tendem a surgir de forma mais tardia. No

entanto, a escolha de observação final nesta faixa etária jovem, foi feita para se evitar a redução natural de fertilidade que ocorre com os indícios de senilidade dos animais.

8. Conclusão

Sendo assim, como conclusões ao trabalho avaliado tem-se que a dieta hipercalórica rica em gorduras e carboidratos simples promoveu alterações na geração exposta F0DH, em parâmetros metabólicos lipídicos relacionados à adiposidade e hiperlipidemia, além de maior coeficiente de eficiência energética. Esse padrão não foi observado nas gerações descendentes. Também não houve modificação do metabolismo glicêmico das três gerações avaliadas. As avaliações reprodutivas também demonstraram que houve comprometimento do peso das gônadas nas gerações F0DH, embora redução na espessura do epitélio seminífero tenha acontecido na geração F1DH. Associado às irregularidades verificadas no desenvolvimento pré-puberal do animal, houve precocidade no surgimento das fases de morfologia da glândula do pênis e descida do testículo nos animais da geração F1DH, embora com discreto atraso em isolada fase da F2DH, tem-se que a dieta hipercalórica promoveu alterações reprodutivas nas gerações F1 e F2.

9. Produções científicas advindas do projeto apresentadas em congressos e seminários

OSHIO, L. T.; BOLOTARI, M.; LOPES, J. F.; COSTA, V. M. G.; LADE, C. G.; SÁ, J. P.; ANDREAZZI, A. E.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Diferenças bioquímicas em dois modelos de indução de obesidade por modificação do padrão alimentar em ratos Wistar. *In*: 15º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, 4º Encontro Latino Americano de Ciência em Animais de Laboratório e Reunião Anual do International Council On Laboratory Animal Science, 2018, Goiânia-GO. **Resumos** [...]. Goiânia: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, 2018.

OSHIO, L. T.; LOPES, J. F.; SÁ, J. P.; ANDREAZZI, A. E.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Avaliação dos efeitos da dieta hipercalórica paterna sobre o metabolismo e a fertilidade de gerações F1 e F2 de ratos Wistar. *In*: Seminário da Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018, Juiz de Fora-MG. **Resumos** [...]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.

SÁ, J. P.; OSHIO, L. T.; LOPES, J. F.; ANDREAZZI, A. E.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Geração parental masculina submetida à dieta hipercalórica e seus efeitos no metabolismo e na fertilidade da geração F1. *In*: Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018, Juiz de Fora-MG. **Resumos** [...]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.

10. Referências

- AGARWAL, A. *et al.* A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2015.
- AGGERHOLM, A. S. *et al.* Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 3, p. 619–626, 2008.
- AHMAD, G. *et al.* Mild induced testicular and epididymal hyperthermia alters sperm chromatin integrity in men. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 3, p. 546–553, 2012.
- AL-ANI, N. K. H.; SALMAN, M. O.; AL-QURAIHI, S. The Role of Adiponectin Hormone in the Infertile Men. **Global Science of Bio-Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 23–25, 2016.
- AMROLIA, P. *et al.* An investigation of glucose uptake in relation to steroidogenesis in rat testis and tumour Leydig cells. **The Biochemical Journal**, v. 249, p. 925–928, 1988.
- ANDERSON, D. Male-mediated developmental toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, n. 2 SUPPL., p. 506–513, 2005.
- ANWAY, M. D. *et al.* Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, p. 1466–1470, 2005.
- ASSINDER, S. *et al.* Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 11–19, 2007.
- ATTAL, J.; COURROT, M. Développement Testiculaire Et Établissement De La Spermatogenèse Chez Le Taureau. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 3, p. 219–241, 1963.
- BAKOS, H. W. *et al.* Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 5, p. 1700–1704, 2011a.
- _____. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 5 PART 1, p. 402–410, 2011b.
- BARBOSA, T. de C. *et al.* High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 3, p. 184–197, 2016.
- BARREIRO, M. L. *et al.* Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4825–4834, 2004.
- BIENIEK, J. M. *et al.* Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men.

Fertility and Sterility, v. 106, n. 5, p. 1070–1075, 2016.

BJURSELL, M. *et al.* Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 583–593, 2007.

BONDE, J. P.; CHRISTENSEN, J. M. Chromium in biological samples from low-level exposed stainless steel and mild steel welders. **Archives of Environmental Health**, v. 46, n. 4, p. 225–229, 1991.

BONDE, J. P.; ERNST, E. Sex Hormones and Semen Quality in Welders Exposed to Hexavalent Chromium. **Human and Experimental Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 259–263, 1992.

BREZINA, P. R.; YUNUS, F. N.; ZHAO, Y. Effects of pharmaceutical medications on male fertility. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 13, n. 1, p. 3–11, 2012.

CABLER, S. *et al.* Obesity: Modern man's fertility nemesis. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, n. 4, p. 480–489, 2010.

CAMPBELL, J. M. *et al.* Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, n. 5, p. 593–604, 2015.

CARLSEN, E. *et al.* Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **British Medical Journal**, v. 305, p. 609–613, 1992.

CARLSEN, E. *et al.* History of febrile illness and variation in semen quality. **Human Reproduction**, v. 18, n. 10, p. 2089–2092, 2003.

CARRERA-BASTOS, P. *et al.* The western diet and lifestyle and diseases of civilization. **Research Reports in Clinical Cardiology**, v. 2, p. 15–35, 2011.

CENTOLA, G. M. *et al.* Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: Observations from a U.S. sperm bank. **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 270–276, 2016.

CHEMES, H. E. *et al.* Early manifestations of testicular dysgenesis in children: Pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour development. **Acta pathologica, microbiologica, e immunologica Scandinavica**, v. 111, n. 1, p. 12–24, 2003.

CHIU, Y. H. *et al.* Sugar-sweetened beverage intake in relation to semen quality and reproductive hormone levels in young men. **Human Reproduction**, v. 29, n. 7, p. 1575–1584, 2014.

CHRISTOU, M. A. *et al.* Effects of Anabolic Androgenic Steroids on the Reproductive System of Athletes and Recreational Users: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1869–1883, 2017.

COCUZZA, M.; ESTEVES, S. C. Shedding light on the controversy surrounding the temporal decline in human sperm counts: A systematic review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

CONCEA (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO

ANIMAL). **Resolução Normativa no. 15 - Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica**. Brasília: Diário Oficial da União, 2013.

_____. **Resolução Normativa no. 30 - Baixa a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA**. Brasília: Diário Oficial da União, 2016.

_____. **Resolução Normativa no. 37 - Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. Brasília: Diário Oficial da União, 2018.

CORDAIN, L. *et al.* Origins and Evolution of the Western Diet. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 340–356, 2005.

CRITTENDEN, A. N. The Importance of Honey Consumption in Human Evolution. **Food and Foodways**, v. 19, n. 4, p. 257–273, 2011.

CROSNOE, L. E. *et al.* Exogenous testosterone: A preventable cause of male infertility. **Translational Andrology and Urology**, v. 2, n. 2, p. 106–113, 2013.

DAI, J.-B.; WANG, Z.-X.; QIAO, Z.-D. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 6, p. 954, 2015.

DANIELEWICZ, A.; PRZYBYŁOWICZ, K. E.; PRZYBYŁOWICZ, M. Dietary patterns and poor semen quality risk in men: A cross-sectional study. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2018.

DAS, S. *et al.* Reproduction in Male Rats is Vulnerable to Treatment with the Flavonoid-rich Seed Extracts of *Vitex negundo*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 1, p. 8–13, 2004.

DELBES, G.; LEVACHER, C.; HABERT, R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 527–538, 2006.

DING, J. *et al.* FDA-approved medications that impair human spermatogenesis. **Oncotarget**, v. 8, n. 6, p. 10714–10725, 2017.

DORESWAMY, K. *et al.* Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: Evidence of DNA damage and genotoxic effects. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 6, p. 996–1003, 2004.

DOYLE, T. J. *et al.* Transgenerational Effects of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate on Testicular Germ Cell Associations and Spermatogonial Stem Cells in Mice¹. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 5, p. 1–15, 2013.

DUIJS, F. H. *et al.* Healthy overweight male partners of subfertile couples should not worry about their semen quality. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 4, p. 1356–1359, 2010.

DUNN, G. A.; BALE, T. L. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2228–2236, 2011.

- DURAIRAJANAYAGAM, D.; AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 1, p. 14–27, 2015.
- EL-MAGD, M. A. *et al.* A potential mechanism associated with lead-induced testicular toxicity in rats. **Andrologia**, v. 49, n. 9, p. 1–9, 2017.
- ESLAMIAN, G. *et al.* Intake of food groups and idiopathic asthenozoospermia: A case-control study. **Human Reproduction**, v. 27, n. 11, p. 3328–3336, 2012.
- ESMAILI-NEJAD, M. R.; BABAEI, H.; KHEIRANDISH, R. The effects of long-term leptin administration on morphometrical changes of mice testicular tissue. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1176–1182, 2015.
- ESSER, N. *et al.* Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 141–150, 2014.
- FAN, W. *et al.* Obesity or overweight, a chronic inflammatory status in male reproductive system, leads to mice and human subfertility. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–11, 2018.
- FERNANDEZ, C. D. B. *et al.* Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 1–10, 2011.
- FIGÀ-TALAMANCA, I.; TRAINA, M. E.; URBANI, E. Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: Recent evidence on male reproductive effects and biological markers. **Occupational Medicine**, v. 51, n. 3, p. 174–188, 2001.
- FOROUZANFAR, M. H. *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 386, n. 10010, p. 2287–2323, 2015.
- FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1554–1561, 2003.
- FULLSTON, T. *et al.* Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. **Human Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1391–1400, 2012.
- _____. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. **FASEB Journal**, v. 27, n. 10, p. 4226–4243, 2013.
- GARDNER, M. J. *et al.* Results of case-control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, v. 300, n. 6722, p. 423–9, 1990.
- GASKINS, A. J. *et al.* Dietary patterns and semen quality in young men. **Human Reproduction**, v. 27, n. 10, p. 2899–2907, 2012.

GLOBERMAN, H. *et al.* Inhibin B in men with severe obesity and after weight reduction following gastroplasty. **Endocrine Research**, v. 31, n. 1, p. 17–26, 2005.

GUERRERO-BOSAGNA, C.; SKINNER, M. K. Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Male Infertility. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 26, p. 79–88, 2014.

GUO, Y. L. *et al.* Yucheng: Health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 77, n. 3, p. 153–158, 2004.

HÆRVIG, K. K. *et al.* Is male factor infertility associated with midlife low-grade inflammation? A population based study. **Human Fertility**, v. 21, n. 2, p. 146–154, 2018.

HANOVER, M. L.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. Suppl, p. 724–732, 1993.

HARON, M. N. *et al.* Exogenous leptin administration decreases sperm count and increases the fraction of abnormal sperm in adult rats. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, p. 322–324, 2010.

HIRATA, A. E. *et al.* Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. **Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 1369–1381, 2003.

HU, G. X. *et al.* Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 139–145, 2009.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION). **Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5 (R2)**, 2005. .

JAROW, J. P. *et al.* Best Practice Policies for Male Infertility. **Journal of Urology**, v. 167, n. 5, p. 2138–2144, 2006.

JENSEN, T. K. *et al.* Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 4, p. 863–870, 2004.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. **Biology of reproduction**, v. 25, n. 1, p. 217–226, 1981.

JOUANNET, P. *et al.* Semen quality and male reproductive health: The controversy about human sperm concentration decline. **Acta pathologica, microbiologica, e immunologica Scandinavica**, v. 109, n. 5, p. 333–344, 2001.

JUNG, A.; SCHUPPE, H. C. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. **Andrologia**, v. 39, n. 6, p. 203–215, 2007.

KATIB, A. Mechanisms linking obesity with male infertility. **Central European Journal of Urology**, v. 68, 2015.

- KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology Research and Practice**, v. 2014, p. 01–22, 2014.
- KAWWASS, J. F.; SUMMER, R.; KALLEN, C. B. Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: A critical review. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 617–632, 2015.
- KEMPINAS, W. G.; LAMANO-CARVALHO, T. L. A method for estimating the concentration of spermatozoa in the rat cauda epididymidis. **Laboratory Animals**, v. 22, n. 2, p. 154–156, 1988.
- KESARI, K. K.; AGARWAL, A.; HENKEL, R. Radiations and male fertility. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 16, n. 1, p. 118, 2018.
- KHUSHBOO, M. *et al.* Testicular toxicity and sperm quality following copper exposure in Wistar albino rats: ameliorative potentials of L-carnitine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 2, p. 1837–1862, 2018.
- KIZILER, A. R. *et al.* High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. **Biological Trace Element Research**, v. 120, n. 1–3, p. 82–91, 2007.
- KONNER, M.; BOYD EATON, S. Paleolithic nutrition: Twenty-five years later. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 25, n. 6, p. 594–602, 2010.
- KORT, H. I. *et al.* Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 3, p. 450–452, 2006.
- KOSTELAC, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7632–5, 2003.
- KOVAC, J. R.; KHANNA, A.; LIPSHULTZ, L. I. The effects of cigarette smoking on male fertility. **Postgraduate Medicine**, v. 127, n. 3, p. 338–341, 2015.
- KUIPER, G. G. *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and pytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252–4263, 1998.
- KÜNZLE, R. *et al.* Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 2, 2003.
- LANDEN, G.; WRANGHAM, R. The rise of the hominids as an adaptive shift in fallback foods: Plant underground storage organs (USOs) and australopith origins. **Journal of Human Evolution**, v. 49, n. 4, p. 482–498, 2005.
- LARSEN, C. S. Animal source foods to improve micronutrient nutrition and human function in developing countries. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. (11 Suppl 2), p. 3875S-4061S, 2003.
- LEE, H. Y. **Experience with 3,520 infertile male patients and a clinical perspective** *Seoul J Med*, 1986. .
- LEVINE, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 6, p. 646–659, 2017.

- LI, C. *et al.* Lead exposure reduces sperm quality and DNA integrity in mice. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 594–602, 2018.
- LIU, C. Y. *et al.* The association between dietary patterns and semen quality in a general Asian population of 7282 Males. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–12, 2015.
- LYSIAK, J. J. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1–10, 2004.
- MAEGAWA, M. *et al.* A repertoire of cytokines in human seminal plasma. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 54, n. 1–2, p. 33–42, 2002.
- MALKIN, C. J. *et al.* Testosterone as a protective factor against atherosclerosis - Immunomodulation and influence upon plaque development and stability. **Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 3, p. 373–380, 2003.
- MAR, C.; BENT, S. An evidence-based review of the 10 most commonly used herbs. **The Western Journal of Medicine**, v. 171, n. 3, p. 168–171, 1999.
- MARGETIC, S. *et al.* Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. **International Journal of Obesity**, v. 26, n. 11, p. 1407–1433, 2002.
- MARQUES, R. M. *et al.* Abnormality of spermatozoa in Wistar rats exposed to high doses of Valeriana officinalis L. aqueous suspension. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 4, p. 35–46, 2016.
- MARTIN, L. J. Implications of adiponectin in linking metabolism to testicular function. **Endocrine**, v. 46, n. 1, p. 16–28, 2014.
- MARTINI, A. C. *et al.* Overweight and seminal quality: A study of 794 patients. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 5, p. 1739–1743, 2010.
- MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 1, p. 148–157, 2010.
- MASCARENHAS, M. N. *et al.* National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1–12, 2012.
- MEDINA, M. F. *et al.* Early signs of toxicity in testes and sperm of rats exposed to low cadmium doses. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33, n. 7, p. 576–587, 2017.
- MEEKER, J. D. *et al.* Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: Human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 11, p. 1473–1479, 2008.
- MERZENICH, H.; ZEEB, H.; BLETTNER, M. Decreasing sperm quality: A global problem? **BMC Public Health**, v. 10, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **VIGITEL. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estimativas sobre a frequência e distribuição sócio-demográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros.** 1. ed. Brasília: Ministério da

Saúde, 2018.

MOCEVIC, E. *et al.* Environmental mercury exposure, semen quality and reproductive hormones in Greenlandic Inuit and European men: A cross-sectional study. **Asian Journal of Andrology**, v. 15, n. 1, p. 97–104, 2013.

MUKHERJEE, S.; MUKHOPADHYAY, P. K. Studies on Arsenic Toxicity in Male Rat Gonads and its Protection by High Dietary Protein Supplementation. **Al Ameen Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 73–77, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8. ed. Washington: National Academies Press, 2011.

NAVYA, H.; YAJURVEDI, H. N. Obesity causes weight increases in prepubertal and pubertal male offspring and is related to changes in spermatogenesis and sperm production in rats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 4, p. 815–823, 2017.

NELSON, C. M. K.; BUNGE, R. G. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. **Fertility and Sterility**, v. 25, n. 6, p. 503–507, 1974.

NERY, C. da S. *et al.* Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49–55, 2011.

NG, M. *et al.* Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.

NORDKAP, L. *et al.* Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: Semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, n. 2, p. 221–230, 2012.

OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). **OECD Series on Testing and Assessment No. 21 – Appraisal of Test Methods of Sex Hormone Disrupting Chemicals**, 2002. .

ONDRIZEK, R. R. *et al.* An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 3, p. 517–522, 1999a.

_____. Inhibition of human sperm motility by specific herbs used in alternative medicine. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 16, n. 2, p. 87–91, 1999b.

OSHIO, L. T. *et al.* Effect of Ginkgo biloba extract on sperm quality, serum testosterone concentration and histometric analysis of testes from adult Wistar rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 122–131, 2015.

PALMER, N. O. *et al.* Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. **Spermatogenesis**, v. 2, n. 4, p. 253–263, 2012.

PANDEY, M. *et al.* Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential

source of therapeutics. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 3, n. 3, p. 27–37, 2011.

PARK, S. *et al.* Increased binding at 5-HT(1A), 5-HT(1B), and 5-HT(2A) receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats. **Brain Research**, v. 847, n. 1, p. 90–97, 1999.

PAULI, E. M. *et al.* Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 2, p. 346–351, 2008.

PODZIMEK, S. *et al.* Sensitization to inorganic mercury could be a Risk Factor for Infertility. **Neuroendocrinology Letters**, v. 26, n. 4, p. 277–282, 2005.

POONGOTHAI, J.; GOPENATH, T. S.; MANONAYAKI, S. Genetics of human male infertility. **Singapore Medical Journal**, v. 50, n. 4, p. 336–347, 2009.

PRAUSNITZ, S.; SUSSKIND, C. Effects of Chronic Microwave Irradiation on Mice. **IRE Transactions on Bio-Medical Electronics**, v. 9, n. 2, p. 104–108, 1962.

RANGANATHAN, P. *et al.* Cadmium effects on sperm morphology and semenogelin with relates to increased ROS in infertile smokers: An in vitro and in silico approach. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 2, p. 189–197, 2018.

RATO, L. *et al.* High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 495–504, 2013.

RAYBURN, E. R. *et al.* FDA-approved drugs that are spermatotoxic in animals and the utility of animal testing for human risk prediction. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 2, p. 191–212, 2018.

ROBERTO, C. A. *et al.* Patchy progress on obesity prevention: Emerging examples, entrenched barriers, and new thinking. **The Lancet**, v. 385, n. 9985, p. 2400–2409, 2015.

RODRIGUEZ-WALLBERG, K. A.; OKTAY, K. Fertility preservation during cancer treatment: Clinical guidelines. **Cancer Management and Research**, v. 6, n. 1, p. 105–117, 2014.

ROUMAUD, P.; MARTIN, L. J. Roles of leptin, adiponectin and resistin in the transcriptional regulation of steroidogenic genes contributing to decreased Leydig cells function in obesity. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 24, n. 1, p. 25–45, 2015.

SAKAUE, M. *et al.* Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. **Journal of Occupational Health**, v. 43, n. 4, p. 185–190, 2001.

SALAS-HUETOS, A.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: A systematic review of observational studies. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 4, p. 371–389, 2017.

SALIAN, S.; DOSHI, T.; VANAGE, G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring-An overview. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 359–362, 2011.

SANCHEZ-GARRIDO, M. A. *et al.* Intergenerational Influence of paternal obesity on metabolic and reproductive health parameters of the offspring: Male-preferential impact and involvement of kiss1-mediated pathways. **Endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 1005–1018, 2018.

SANSONE, A. *et al.* Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2018.

SCHRADER, M. *et al.* The impact of chemotherapy on male fertility: A survey of the biologic basis and clinical aspects. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 611–617, 2001.

SEED, J. *et al.* Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. **Reproductive Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 237–244, 1996.

SEMET, M. *et al.* The impact of drugs on male fertility: a review. **Andrology**, v. 5, n. 4, p. 640–663, 2017.

SENGUPTA, P. *et al.* Evidence for decreasing sperm count in african population from 1965 to 2015. **African Health Sciences**, v. 17, n. 2, p. 418–427, 2017.

_____. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 247–255, 2018.

SENGUPTA, P.; DUTTA, S.; KRAJEWSKA-KULAK, E. The Disappearing Sperms: Analysis of Reports Published Between 1980 and 2015. **American Journal of Men's Health**, v. 11, n. 4, p. 1279–1304, 2017.

SHAYEB, A. G. *et al.* An exploration of the association between male body mass index and semen quality. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 6, p. 717–723, 2011.

SHIRAISHI, K.; MATSUYAMA, H.; TAKIHARA, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **International Journal of Urology**, v. 19, n. 6, p. 538–550, 2012.

SHUKLA, K. K. *et al.* Recent scenario of obesity and male fertility. **Andrology**, v. 2, n. 6, p. 809–818, 2014.

SILVA, A. *et al.* Acute and Subchronic Antihyperglycemic Activities of *Bowdichia virgilioides* Roots in Non Diabetic and Diabetic Rats. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 57, 2015.

SKAKKEBÆK, N. E. *et al.* Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: Evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. **Apmis**, v. 111, n. 1, p. 1–11, 2003.

SONG, Y. *et al.* Endocrine-disrupting chemicals, risk of type 2 diabetes, and diabetes-related metabolic traits: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Diabetes**, v. 8, n. 4, p. 516–532, 2016.

SOUBRY, A. *et al.* A paternal environmental legacy: Evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. **BioEssays**, v. 36, n. 4, p. 359–371, 2014.

SOUBRY, A. POHaD: why we should study future fathers. **Environmental Epigenetics**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2018.

SPREADBURY, I. Comparison with ancestral diets suggests dense acellular carbohydrates promote an inflammatory microbiota, and may be the primary dietary cause of leptin resistance and obesity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 5, p. 175–189, 2012.

SWAN, S. H.; ELKIN, E. F.; FENSTER, L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 11, p. 1228–1232, 1997.

SWAN, S. H.; ELKIN, E. P.; FENSTER, L. The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 10, p. 961–966, 2000.

TAVARES, R. S. *et al.* Parabens in male infertility-Is there a mitochondrial connection? **Reproductive Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 1–7, 2009.

THRUPP, L. A. Sterilization of Workers from Pesticide Exposure: The Causes and Consequences of DBCP-Induced Damage in Costa Rica and beyond. **International Journal of Health Services**, v. 21, n. 4, p. 731–757, 1991.

TRASLER, J. M. Epigenetics in spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 306, n. 1–2, p. 33–36, 2009.

TSAO, C. W. *et al.* Exploration of the association between obesity and semen quality in a 7630 male population. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

VAKALOPOULOS, I. *et al.* Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. **Hormones**, v. 14, n. 4, p. 579–589, 2015.

VERMEULEN, A. Environment, human reproduction, menopause, and andropause. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. SUPPL. 2, p. 91–100, 1993.

VICTOR-COSTA, A. B. *et al.* **Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine** **Reproductive Toxicology**, 2010. .

VIDAEFF, A. C.; SEVER, L. E. In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: A systematic review of biological and epidemiologic evidence. **Reproductive Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 5–20, 2005.

WANG, X. *et al.* Low-level environmental arsenic exposure correlates with unexplained male infertility risk. **Science of the Total Environment**, v. 571, p. 307–313, 2016.

WEI, Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 2, p. 194–208, 2015.

WELSH, M. *et al.* Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479–1490, 2008.

WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. **World Health**, p. 176, 2014.

WHORTON, D. *et al.* Infertility in Male Pesticide Workers. **The Lancet**, p. 1259–1261, 1977.

WILLCOX, B. J. *et al.* Caloric restriction, the traditional okinawan diet, and healthy aging: The diet of the world's longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1114, p. 434–455, 2007.

WOHLFAHRT-VEJE, C.; MAIN, K. M.; SKAKKEBÆK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: Foetal origin of adult reproductive problems. **Clinical Endocrinology**, v. 71, n. 4, p. 459–465, 2009.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of laboratory animal management and welfare**. New York: Oxford University Press Inc, 1994.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Effects of hypercholesterolaemia on Leydig and Sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. **Human Reproduction**, v. 14, n. 6, p. 1516–1521, 1999.

YAMASAKI, K. *et al.* Preputial separation and glans penis changes in normal growing Crj: CD (SD) IGS rats. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 533–536, 2001.

ZHAO, J. *et al.* Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, n. 1, 2014.

ANEXO 1

Certificado de aprovação da solicitação de uso de animais pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF (CEUA-UFJF) para o presente projeto de pesquisa.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 003/2016 – CEUA sobre “AVALIAÇÃO DO METABOLISMO E DA FERTILIDADE DAS GERAÇÕES F1 E F2 DE RATOS WISTAR DE GERAÇÃO PARENTAL MASCULINA (F0) SUBMETIDA À DIETA HIPERCALÓRICA” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de VERA MARIA PETERS com a colaboração de LEONARDO TOSHIO OSHIO, ANA ELIZA ANDREAZZI, MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA, MARCELLA MARTINS TERRA, CARLOS GABRIEL DE LADE, TAMIRIS SCHAEFFER FONTOURA e JÉSSICA FERRAZ LOPES está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 110 ratos Wistar (90 machos, 20 fêmeas) de 25 dias de idade (machos) e 3 meses de idade (fêmeas), conforme solicitado e que serão utilizados no período 10/08/2016 a 10/08/2019.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 003/2016 – CEUA about “AVALIAÇÃO DO METABOLISMO E DA FERTILIDADE DAS GERAÇÕES F1 E F2 DE RATOS WISTAR DE GERAÇÃO PARENTAL MASCULINA (F0) SUBMETIDA À DIETA HIPERCALÓRICA” under responsibility of VERA MARIA PETERS and collaboration of LEONARDO TOSHIO OSHIO, ANA ELIZA ANDREAZZI, MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA, MARCELLA MARTINS TERRA, CARLOS GABRIEL DE LADE, TAMIRIS SCHAEFFER FONTOURA and JÉSSICA FERRAZ LOPES is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2016. For the development of this research 110 Wistar rats (90 males, 20 females) of 25 days of age (females) and 3 months of age (males), will be delivered as requested in the period of 10/08/2016 to 10/08/2019.

Juiz de Fora, 09 de agosto de 2016

Coordenadora
CEUA

Vice-coordenadora
CEUA

ANEXO 2

Comprovação de submissão de artigo em periódico especializado

Submission Confirmation Print

Thank you for your submission

Submitted to
Journal of Developmental Origins of Health and Disease

Manuscript ID
DOHaD-06-19-OA-1143

Title
A paternal hypercaloric diet affects the metabolism and fertility of F1 and F2 Wistar rat generations

Authors
Oshio, Leonardo
Andreazzi, Ana
Lopes, Jessica
Sá, Jackson
Bolotari, Mariana
Costa, Vinicius
Guerra, Martha
Peters, Vera

Date Submitted
07-Jun-2019

Journal of Developmental Origins of Health and Disease <onbehalfof@manuscriptcentral.com>
7 de jun de 2019 04:02 (há 1 dia)

para eu ▾

🌐 Inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

07-Jun-2019

Dear Mr. Oshio:

Your manuscript entitled "A paternal hypercaloric diet affects the metabolism and fertility of F1 and F2 Wistar rat generations" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Developmental Origins of Health and Disease.

Your manuscript ID is DOHaD-06-19-OA-1143.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/dohad>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Developmental Origins of Health and Disease.

Sincerely,
Journal of Developmental Origins of Health and Disease Editorial Office

=====

Journal of Developmental Origins of Health and Disease (JDOHaD) is indexed in Thomson Reuters Citation Index®. All content from Volume 1 onwards is indexed by ISI, and its 2012 Impact Factor is 1.207. The Journal is additionally indexed by MEDLINE.

To keep up to date with the latest news from JDOHaD register for alerts: <http://journals.cambridge.org/doh-alerts>