

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

LEONARDO EDUARDO FERREIRA

**EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS (AQPS 1 e 9) NOS
DUCTOS EFERENTES E EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR
COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA.**

CASCAVEL-PR
(Julho/2013)

LEONARDO EDUARDO FERREIRA

**EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS (AQPS 1 e 9) NOS
DUCTOS EFERENTES E EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR
COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA.**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde.

ORIENTADOR: CÉLIA CRISTINA LEME BEU

CO-ORIENTADOR: RAQUEL FANTIN DOMENICONI

CASCADEL-PR

(Julho/2013)

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEONARDO EDUARDO FERREIRA

**EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS (AQPS 1 e 9) NOS
DUCTOS EFERENTES E EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR
COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA.**

Esta dissertação foi julgada adequada para a
obtenção do título de Mestre em Biociências e
Saúde e aprovada em sua forma final pelo
Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof.^a Dr.^a CÉLIA CRISTINA LEME BEU
UNIOESTE

Prof.^a Dr.^a ELAINE MANOELA PORTO AMORIM
UNIOESTE

Prof.^a Dr.^a DÉBORA DE MELLO GONÇALES SANT'ANA
UEM

CASCADEL-PR
(Julho/2013)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte deste trabalho, desde sua coleta em 2009 até o presente momento, pelo esforço empregado e pela dedicação a pesquisa, fatores que me incentivaram e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, em especial ao Profº Drº Allan Cezar Araujo Faria.

A todos os docentes, técnicos, alunos de ICC, alunos da graduação e demais colaboradores da UNIOESTE-Cascavel e da UNESP-Botucatu que com suas críticas e trabalhos, agregaram muito conhecimento durante esses 2 anos.

Aos Professores, que colaboraram para o desenvolvimento do trabalho, em especial a Profº Drº Elaine Manoela Porto Amorim, Prof João Paulo Amorim, Profº Drº Mária Lucia Bonfluer, Profº Drº Sandra Lucinei Balbo e Profº Drº Raquel Fantin Domeniconi, por todos os ensinamentos durante esse percurso do mestrado.

Aos colegas de turma do programa de Mestrado em Biociências e Saúde, que sempre colaboraram com debates, conhecimentos específicos de área, dicas da vida profissional e com momentos de lazer que não poderiam ser descartados em uma jornada árdua.

A minha família, por entender que neste momento da vida, outras prioridades aparecem, mas que mesmo assim, meu amor por vocês continua intacto e sempre em crescimento exponencial. Sou eternamente grato à educação que me deram e aos ensinamentos que me levaram a ser quem eu sou hoje. Agradeço em especial a Lourdes de Fátima Scapin Ferreira, Gilson Eduardo Ferreira, Rafael Eduardo Ferreira e Camila Scapin Ferreira, por serem os pilares da minha vida, minha estrutura e meu chão.

Aos meus amigos pessoais que sempre entenderam a minha ausência nos momentos de descontração e mesmo assim continuaram a me apoiar, sempre estando presente pra me levantar, quando por acaso era derrubado pela vida.

A minha noiva Lalinne de Magalhães Caldas e seus familiares, por me aturar, pela paciência, pelas incontáveis ajudas, sempre que possível, pelo amadurecimento, por ser um porto seguro nos momentos de fraqueza, pelos momentos de descontração, por ser um raio de luz no meio de tanta escuridão. Meu agradecimento a você é por fazer parte da minha vida, por ser amorosa e por ter me acrescentado tanto em tão pouco tempo, enfim, obrigada minha pequena.

Agradeço a minha nova amiga e orientadora, Prof^o Dr^o Célia Cristina Leme Beu, que com sua sabedoria, paciência e doçura, conseguiu me guiar em áreas totalmente inovadoras, me mostrar outros caminhos da pesquisa, pelas oportunidades concedidas no período de estágio docente como ministrante da disciplina de Anatomia Topográfica, bem como, novos aprendizados em laboratório, pelos livros doados, por todas as conversas que tivemos, as quais com certeza hoje fazem parte de quem eu sou, por todas as experiências novas e agregadoras que passamos nesse percurso até o presente momento, sou eternamente grato a sua dedicação como orientadora.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte dessa história tão enriquecedora e por qualquer contribuição, onde, com certeza, ficarão marcadas para o resto da minha vida em minha memória.

RESUMO GERAL

A indução à obesidade, no modelo experimental animal com dieta de cafeteria, simula a alimentação com alto teor calórico que os seres humanos ingerem, na atualidade, possibilitando, assim, estudar a obesidade bem como as comorbidades advindas desta condição. O sistema genital masculino é afetado diretamente pela obesidade com aumento de peroxidação lipídica, aumento de corpos apoptóticos, mudanças nos parâmetros espermatobioscópicos e redução de fertilidade. O objetivo do estudo foi avaliar se há alterações causadas pela obesidade nos epitélios dos ductos eferentes e epididimário, tanto em relação à morfologia quanto à expressão de aquaporinas 1 e 9 (AQPs 1 e 9) em ratos Wistar adultos. Após o desmame, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (CON), que recebeu dieta padrão e água *ad libitum* (n=10) e grupo cafeteria (CAF), que recebeu dieta de cafeteria e refrigerante desgasificado *ad libitum* (n=10). O tratamento do grupo CAF teve início depois da 12ª semana de vida, totalizando 40 semanas de consumo da dieta de cafeteria, sendo todos os animais mortos com 52ª semanas de idade. Os ductos eferentes, juntamente com segmentos inicial (Si), cabeça (Cç), corpo (Co) e cauda (Cd) do epidídimo, foram submetidos à rotina histológica e imunohistoquímica para AQP-1 e AQP-9. No presente estudo foram avaliados os dados: massa corporal, comprimento nasoanal, circunferência abdominal, índice de Lee e massa das gorduras retroperitoniais e perigonadais; também, avaliou-se dimensões, através de morfometria, e características morfológicas dos epitélios dos ductos eferentes e segmentos Si, Cç, Co e Cd do epidídimo, bem como foram analisadas as expressões de AQP-9 e AQP-1 nos ductos eferentes e segmentos epididimários supracitados. Alterações na expressão das AQPs, nos ductos eferentes e parte do epitélio epididimário, foram observadas com aumento na expressão de AQP-1 e redução de AQP-9 nos ductos eferentes e cauda epididimária, respectivamente, dos animais tratados com dieta de cafeteria. Também, ocorreram alterações morfológicas no epitélio epididimário, como aumento do número e tamanho de células halo e claras; aumento de organelas endocíticas; e distribuição heterogênea de estereocílios, nos animais com obesidade induzida por dieta de cafeteria. Em vista dos resultados, acredita-se que essas alterações devem causar um profundo impacto sobre o ambiente luminal e interferir no processo de transporte, maturação, manutenção, proteção e armazenamento dos espermatozoides, sendo a obesidade responsável por alterar a expressão de AQP-1 nos ductos eferentes, da AQP-9 na cauda epididimária, a distribuição relativa de células claras e halo e características morfológicas destas partes da via espermática. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos específicos pelos quais a dieta de cafeteria afeta a morfologia da via espermática, especificamente dos ductos eferentes e ductos epididimários.

Palavras-chave: Morfologia, dieta de cafeteria, obesidade, via espermática e aquaporinas, biologia da reprodução.

GENERAL ABSTRACT

The induction of obesity in experimental animals with cafeteria diet simulates the high-calorie food that humans eat, nowadays, thus enabling to study obesity and comorbidities resulting from this condition. The male reproductive system is directly affected by obesity with increased lipid peroxidation, increase of apoptotic bodies, changes in parameters espermatobioscópicas and reduced fertility. The aim of the study was to evaluate whether there are changes caused by obesity in epithelia of efferent ducts and epididymis, both in relation to morphology and expression of aquaporins 1 and 9 (AQPs 1 and 9) in adult Wistar rats. After weaning, the animals were randomly divided into two groups: control group (CON) received standard diet and water ad libitum (n = 10) and group cafeteria (CAF), which received cafeteria diet soda and degassed ad libitum (n = 10). The treatment group CAF began after the 12th week of life, totaling 40 weeks of consumption of cafeteria diet, being all dead animals with 52 weeks of age. The efferent ducts, along with initial segments (Si), head (Cç), body (Co) and tail (Cd) epididymis were submitted to routine histological and immunohistochemical staining for AQP-1 and AQP-9. In the present study we evaluated the data: body mass, length nasoanal, waist circumference, Lee index and retroperitoneal fat mass and perigonadais; also evaluated dimensions, using morphometry and morphology of the epithelia of the efferent ducts and segments Si, Cç, Co and Cd epididymis and analyzed the expression of AQP-9 and AQP-1 in the efferent ducts and epididymal segments above. Changes in expression of AQPs in the efferent ducts and the epididymal epithelium were observed with increased expression of AQP-1 and AQP-9 reduction in efferent ducts and epididymal cauda, respectively, in animals treated with cafeteria diet. Also, there were morphological changes in the epididymal epithelium, such as increasing the number and size of cells and clear halo; increased endocytic organelles, and heterogeneous distribution of stereocilia, in animals with diet-induced obesity cafeteria. Given the results, it is believed that these changes should cause a profound impact on the luminal environment and interfere in the transport process, maturation, maintenance, protection and storage of sperm, being responsible for obesity alter the expression of AQP-1 in efferent ducts, AQP-9 in the epididymal cauda, the relative distribution of cells and clear halo and morphological characteristics of these parts via the sperm. However, more studies are needed to elucidate the specific mechanisms by which the cafeteria diet affects sperm morphology via specifically efferent ducts and epididymal ducts.

Keywords: Morphology, cafeteria diet, obesity, spermatid ducts and aquaporins, reproduction biology.

SUMÁRIO

1-	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	09
2-	LISTA DE TABELAS.....	12
3-	LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
4-	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
4.1-	OBESIDADE.....	15
4.2-	OBESIDADE E REPRODUÇÃO.....	17
5-	REVISÃO GERAL DE LITERATURA.....	21
5.1-	OBESIDADE.....	21
5.2-	DIETA DE CAFETERIA.....	23
5.3-	DUCTOS EFERENTES E EPIDÍDIMO.....	24
5.4-	ANDROGÊNIOS E ESTROGÊNIOS.....	34
5.5-	AQUAPORINAS.....	37
5.6-	EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-TESTICULAR.....	40
6-	REFERÊNCIAS.....	42
7-	ARTIGO CIENTÍFICO.....	57
8-	ARTIGO CIENTÍFICO – DISSERTAÇÃO.....	58
9-	APÊNDICE.....	84
9.1-	CORANTE HEMATOXILINA–EOSINA.....	84
9.2-	REATIVO DE SCHIFF.....	84
9.3-	TAMPÃO PBS (SALINA TAMPONADA).....	85
9.4-	TAMPÃO TRIS-EDTA.....	85
9.5-	SOLUÇÃO DE FORMOL 10%.....	86
9.6-	SILANIZAÇÃO DE LÂMINAS.....	86
9.7-	DAB.....	86

10- ANEXO A.....87

11- ANEXO B.....88

1- LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras - Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Processo de enovelamento do ducto epididimário de rato (**1A-1C**), enovelamento completo no período inicial pós-natal (**1D**). Para facilitar a visualização das mudanças, os tamanhos do testículo e epidídimo não estão em escala. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3ª Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 22, Epididymis.....28

Figura 2 - Diagrama representativo do testículo, ductos eferentes, epidídimo e ducto deferente de humano. Regiões do epidídimo: Segmento inicial (**1B, 1C e 1D**), cabeça (**2A e 2B**), corpo (**3A, 3B e 3C**) e cauda (**4A, 4B e 4C**) são indicados no diagrama. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3ª Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 17, Anatomia do sistema reprodutor masculino.....29

Figura 3 - Esquema da organização e distribuição dos tipos celulares encontrados no epidídimo e respectivas funções. (**3A**) **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3ª Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 22, O epidídimo. (**3B**) BELLEANNÉE C.; THIMON V.; SULLIVAN R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell Tissue Res**, v.349, p.717-731, 2012.....31

Figura 4 - Diagrama esquemático da distribuição de AQPs no ducto eferente e epitélio epididimário masculino. DA SILVA N., PIÉTREMENT C. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1758, p.1025–1033, 2006.....39

Figuras - Artigo Científico

Figure 1 - Epithelial height of the efferent ducts (n = 3), (Si) initial segment, (Cç) head, (Co) body and epididymal (Cd) tail (n = 5). Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. (*) Significantly different values, p <0.05.....64

Figure 2 - Luminal diameter of the efferent ducts (n = 3), (Si) initial segment, (Cç) head, (Co) body and epididymal (Cd) tail (n = 5). Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. (*) Significantly different values, $p < 0.05$64

Figure 3 - Relative distribution of principal, basal, apical, clear and halo cells in the initial segment (3A), head (3B), body (3C) and epididymal tail (3D) of animals CAF x CON (% of total). Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. (*) Significantly different values, $p < 0.05$66

Figure 4 - Photomicrographs of the immunolocalization of AQP1 in the efferent ducts (4A-4D) and AQP9 in the epididymal tails (4E-4F) in Wistar rats. The following are indicated: the lumen (Lu), interstitium (IT) and vascular channels (VC) of the efferent ducts (4A-4D), and the lumen of the epididymal tail of the experimental animals (4E-4F); ciliated cells (thick arrow) and the weak to moderate reactions in the apical membrane (arrow), and weak reactions in the basolateral membrane of the non-ciliated cells; reactivity in the apical vacuoles of the of non-ciliated cells (circle) of the animals (4C); ciliated cells (thick arrow) and intense positive reaction in the apical and basolateral membranes of the non-ciliated cells (arrow) and reactivity in the vacuoles at the apex of the non-ciliated cells (circle) of the CAF animals (4D); principal cells (P), clear cells (C) and stereocilia (thick arrow) with intense reactivity in the epithelium of the epididymal tail (4E); principal cells (P), clear cells (C) and stereocilia (thick arrow) with weak reactivity in the epithelium of the epididymal tail (4F). Hematoxylin counterstain. Bar = 20 micrometres (4A-4B); Bar = 10 μ m (4C-4F).....69

Figure 5 - Photomicrographs of the efferent ducts (5A and 5B) and the epididymal tails of Wistar rats (5C and 5D). The following are indicated: the lumen (Lu), and interstitium (IT) of the efferent ducts (5A and 5B) and of the epididymal tail (5C and 5D); PAS-positive reactive endocytic organelles (thick arrows) in the efferent ducts of the Wistar rats in the CON group (5A) and the CAF group (5B), clear cells (C), PAS-positives in the epididymal tail of animals in the CON group (5C) and the CAFgroup

(**5D**); stereocilia (*) of the principal cells of the CON animals (**5C**) and the CAF animals(**5D**). PAS. Scale bar, 10 micrometers.....70

2- LISTA DE TABELAS

Tabelas - Artigo Científico

Table 1 - Composition of standard diet and cafeteria diet.....61

Table 2 - Data of mean body mass (at the 12th week and the 52nd week of age), naso-anal length, abdominal circumference, Lee index and percentage of retroperitoneal and perigonadal fats in relation to the body weight of the animals in groups CON and CAF.....63

Table 3 - Expression of AQP-1 in the efferent ducts of CON and CAF animals*.....67

Table 4 - Expression of AQP-1 and AQP-9 in the epididymis of the CON and CAF animals*.....68

3- LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Significado
ABP	Complexo de ligação da proteína testosterona-andrógeno
AGTR2	Receptor de angiotensina-II
AQP1	Aquaporina-1
AQP9	Aquaporina-9
AR	Receptor de Andrógeno
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CAF	Grupo Cafeteria
CAII	Anidrase carbônica tipo II associada à membrana
CAIV	Anidrase carbônica tipo IV associada à membrana
Cç	Cabeça do epidídimo
Cd	Cauda do epidídimo
CEEAAP	Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas
CIC3	Proteína de canal tipo III de cloreto
Co	Corpo do epidídimo
CON	Grupo Controle
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc
DAB	Diaminobenzidina
DCNT	Doença crônica não transmissível
DES	Dietilestilbestrol
DHT	Diidrotestosterona
E2	Estradiol-17 β
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EREs	Elementos de resposta estrogênica
ERK1	Quinase ativada por estímulos extracelulares tipo-1
ERK2	Quinase ativada por estímulos extracelulares tipo-2
ER α	Receptor de Estrógeno- α
ER β	Receptor de Estrógeno- β
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio de liberação das gonadotrofinas
GR	Receptor de glicocorticoide
GST	Glutathione-S-transferase
H/E	Hematoxilina/Eosina
HTH	Helix-Turn-Helix
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
LH	Hormônio luteinizante
MR	Receptor de mineralocorticoide
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão Fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
PNSN	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPV	Pesquisa sobre Padrões de Vida
PR	Receptor de progesterona
ROS	Espécies reativas a oxigênio
Si	Segmento inicial do epidídimo
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde
TRIS	Hidroximetil, aminometano
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
V-ATPase	Bomba vacuolar de prótons ATPase

4- INTRODUÇÃO GERAL

4.1- OBESIDADE

A obesidade é uma das desordens orgânicas, atualmente, considerada epidemia que apresentou grande aumento de incidência, praticamente em todo o planeta, nos últimos 20 – 30 anos. Esta é uma desordem heterogênea com largas variações para complicação de doenças tais como hipertensão arterial, osteoartrite, esteatose hepática, colecistopatias, dentre outras, inclusive implicando no risco de desenvolver outras doenças crônicas, tais como *diabetes mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias e câncer, particularmente em indivíduos com acúmulo de gordura visceral (BOWMAN *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2007). A obesidade está associada com múltiplas alterações do sistema endócrino, incluindo concentrações anormais de hormônios circulantes, inclusive os hormônios sexuais, devido a alterações no padrão de secreção e/ou metabolismo, transporte e/ou ação hormonal em nível dos tecidos-alvo (PASQUALI *et al.*, 2003), sendo que as concentrações plasmáticas reduzidas de testosterona podem ser associadas com a obesidade visceral e síndrome metabólica (HAFFNER *et al.*, 1993).

A obesidade desperta grande interesse para o desenvolvimento de constantes estudos científicos, visto que aumenta o risco de mortalidade, além das consequências orgânicas que acarreta, sendo o gerenciamento em saúde pública afetado também, uma vez que as ações para tratamento da obesidade e suas comorbidades, tais como doenças cardiovasculares, geram maior custo no SUS, inclusive com internações hospitalares (BANDEIRA, 2003). Em 2007, no Brasil, 12,7% das hospitalizações não relacionadas a gestações e 27,4% das internações de indivíduos de 60 anos ou mais foram causadas por doenças cardiovasculares (IBGE 2010; SILVA *et al.*, 2009). Os agravos à saúde e epidemiologia da obesidade ilustram a importância e o impacto da doença, no âmbito individual e coletivo, dentre os quais, os custos alarmantes de cerca R\$1,5 bilhão por ano com internações hospitalares, consultas médicas e medicamentos. Desse valor, 600 milhões são provenientes do governo via Sistema Único de Saúde (SUS), e representam 12% do orçamento gasto com todas as outras doenças (ANJOS *et al.*, 2006).

De acordo com a *World Health Organization* (2004) (Organização Mundial da Saúde), em 2015 aproximadamente 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e

mais de 700 milhões de pessoas estarão obesas. Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF) em 1974, Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN) em 1989, Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) em 2002-2003, Pesquisa sobre Padrões de Vida (PPV) em 1997, mostram uma redução da desnutrição em crianças e aumento de sobrepeso e obesidade, situação de “transição nutricional”, caracterizando mudança nas prevalências, podendo-se observar uma diminuição de doenças transmissíveis e aumento das doenças crônicas não transmissíveis (IBGE 2010, SILVA *et al.*, 2009).

A obesidade, por suas características, é classificada como doença crônica não transmissível (DCNT) e degenerativa que afeta tanto crianças quanto adultos. No conjunto de DCNTs, a obesidade deve ser destacada, uma vez que crianças apresentam uma taxa de aumento na sua prevalência que supera o índice desta doença em adultos (STYNE *et al.*, 2001). O conjunto das DCNTs é a principal causa de mortalidade no planeta, representando 60% de todas as mortes (WHO, 2005).

A obesidade é considerada uma doença com etiologia multifacetária, que reflete as interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e sociais, por isso, estes últimos não podem ser desconsiderados para o tratamento da obesidade (FEDERICA, 2012).

Atualmente, a obesidade pode ser compreendida como um “efeito colateral” de mudanças do padrão nutricional juntamente com o estilo de vida sedentário, portanto, a prática de atividade física regular, juntamente com uma alimentação regrada, é considerada ideal para manter ou reduzir o peso corporal (GUEDES *et al.*, 2002). Os afazeres da vida moderna tornaram-se muito mais complexos e demorados. O tempo disponível para a vida pessoal foi tomado por outras ocupações e, muitas vezes, para suprir a falta de tempo, deixa-se de lado o cuidado com a saúde e o bem-estar, em prejuízo do bom estilo de vida. Segundo Nahas (2001), pesquisas realizadas em diversos países têm mostrado que o estilo de vida passou a ser um dos mais importantes determinantes da saúde dos indivíduos, grupos e comunidades. Segundo Domingues Filho (2000), se a qualidade de vida está prejudicada, o organismo concomitantemente adoece, sendo a obesidade uma das doenças que surgem com maior frequência nestes casos.

Na vida familiar pode-se observar que os pais concentram esforços no crescimento profissional e material, para manterem seu poder aquisitivo e se conservarem em um mercado de trabalho cada vez mais competitivo, exigente de

produtividade e eficiência. Sem tempo, não apresentam disposição para o convívio com os filhos. Um dos aspectos antropológicos que mais caracterizam as relações contemporâneas é o fenômeno do declínio do convívio (ANJOS *et al.*, 2006). Muitos estudos apontam obesidade como um distúrbio da solidão e da desvalorização do cuidado nas relações interpessoais, ao nível psicossocial a obesidade pode provocar um déficit de autoestima, de autoconfiança, fraca imagem corporal, isolamento social, sentimentos de rejeição, depressão e insucesso escolar. Contudo, atualmente, come-se cada vez mais sozinho, fato observado pelo crescente número de *fast-foods*, ilustrando o protótipo da vida contemporânea, marcada por um consumo solitário, sem tempo, de um alimento pré-fabricado (MOURÃO-CARVALHAL, 2008). O excesso de ingestão de alimentos pode ser entendido então como uma forma eficiente de preencher vazios existenciais, tão comuns na sociedade mercantilista contemporânea (ANJOS *et al.*, 2006).

4.2- OBESIDADE E REPRODUÇÃO

A relação entre obesidade e infertilidade masculina foi grandemente ignorada até a década de 70, enquanto que em mulheres, os efeitos extremos da composição corporal sobre a função reprodutiva foram extensivamente estudados (HAMMOUD *et al.*, 2008a).

Embora os efeitos negativos da obesidade sobre a reprodução masculina tenha sido menos estudados, sabe-se que ela pode afetar diversamente a fertilidade masculina por mecanismos térmicos e endócrinos. Em homens obesos, os mecanismos térmicos estão relacionados com a quantidade de gordura, de maneira que o escroto permanece em contato mais próximo com o tecido circunjacente do que em homens com peso normal, predispondo ao aumento da temperatura escrotal que pode afetar adversamente os parâmetros seminais (HAMMOUD *et al.*, 2008a). Assim, estudos realizados sobre obesidade e infertilidade masculina baseiam-se, principalmente, em análises de qualidade do sêmen, relativamente aos espermatozóides, tais como concentração, motilidade, morfologia e integridade da cromatina; mostrando que as incidências de oligozoospermia e astenospermia aumentam com o índice de massa corporal de 5,3 % e 4,5 % respectivamente em homens com peso normal para 9,5 % e 8,9 %, em homens com sobrepeso e para 15,5 % e 13,3 % em homens obesos (HAMMOUD *et al.*, 2008a, b).

Os mecanismos endócrinos estão relacionados às alterações hormonais associadas com a obesidade e que devem ser o principal fator que afeta a fertilidade, porém outros fatores podem ser incluídos, como estilo de vida e aumento e acúmulo de debris celulares (HAMMOUD *et al.*, 2008a).

Estudos sobre a relação entre androgênios e obesidade são importantes por várias razões, entre elas: 1) obesidade tem um profundo impacto sobre a secreção e metabolismo de hormônios sexuais; 2) androgênios têm um papel pivô na regulação do padrão de distribuição da gordura corporal de acordo com o sexo; 3) alterações nos níveis de androgênios, em indivíduos dos sexos masculino e feminino, podem favorecer o aparecimento de desordens endócrinas específicas; 4) o desequilíbrio dos hormônios sexuais pode favorecer a infertilidade em ambos os sexos; 5) as alterações de androgênios na obesidade podem favorecer a susceptibilidade a desenvolver comorbidades, tais como *diabetes mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares (HU *et al.*, 2003; PASQUALI *et al.*, 2003).

Homens obesos apresentam o perfil hormonal específico hipogonadotrófico-hipoandrogênico-hiperestrogênico, caracterizado por diminuição da concentração de gonadotróficos, diminuição da concentração total e livre de testosterona, e aumento da concentração de estrogênios circulantes, sendo a diminuição na concentração de androgênios, proporcional ao grau de obesidade (GIAGULLI *et al.*, 1994). As concentrações de estrogênios aumentam em homens obesos, comparadas com indivíduos não obesos, devido à aromatização de testosterona circulante, principalmente, no tecido adiposo, no qual sua concentração encontra-se comparativamente aumentada em relação a outros tecidos, consequentemente, os níveis séricos de testosterona total são reduzidos. Tais anormalidades endócrinas são aparentes em indivíduos obesos e são mais pronunciadas naqueles que são obesos infértéis. Contudo, se elas causam infertilidade ou se refletem a disfunção testicular em indivíduos obesos, ainda não está esclarecido (BRAY, 1997).

A taxa total de aromatização de testosterona a estradiol aumenta com a idade e com a massa adiposa (VERMEULEN *et al.*, 2002), resultando, assim, em alteração na proporção de testosterona/estradiol, com maior deposição de gordura abdominal e maior grau de deficiência de testosterona, que pode resultar em hipogonadismo-hipogonadotrófico e infertilidade em situações de obesidade mórbida (ROTH *et al.*, 2008). Os estrogênios atuam em dois sítios de *feedback* negativo sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular: sobre o hipotálamo para

diminuir a secreção pulsátil do hormônio de liberação das gonadotrofinas (GnRH) e sobre a hipófise para diminuir a secreção do hormônio luteinizante (LH). Goyal et al., (2003) relataram que a produção diária de espermatozoides por testículo, as massas absoluta e relativa dos testículos, epidídimos e glândulas seminais e número de espermatozoides no epidídimo declinaram significativamente de forma dose-dependente em ratos tratados com altas doses de estrogênio dietilestilbestrol (DES).

Importantes avanços foram realizados nos últimos anos em muitos aspectos da Biologia da Reprodução. A identificação de diversas substâncias presentes no epidídimo e em outras partes do sistema genital masculino, tais como proteínas, glicoproteínas, hormônios e seus receptores têm contribuído neste aspecto. Comprovadamente, os hormônios sexuais masculinos e femininos, através de seus receptores, atuam de maneira indispensável para integridade do sistema genital masculino e de seu epitélio de revestimento, mantendo o microambiente luminal, condição imprescindível para a sobrevivência dos espermatozoides no sistema de ductos extratesticulares, constituído pela rede testicular extratesticular, ductos eferentes, epidídimo e ductos deferentes (HINTON *et al.*, 1996).

A via extratesticular foi estudada no hamster dourado (BEU *et al.*, 2007, BEU *et al.*, 2009), no gerbilo (DOMENICONI *et al.*, 2007a), no camundongo (ABOU-HAILA; FAIN-MAUREL, 1984), no rato (SUN; FLICKINGER, 1979; MOORE; BEDFOR, 1979; JONES; JURD, 1987; HERMO; DWORKIN; OKO, 1988; VERI; HERMO; ROBAIRE, 1993; SERRE; ROBAIRE, 1998) e outros mamíferos (ROBAIRE, HINTON, ORGEBIN-CRIST, 2006). Estes estudos abordaram aspectos bioquímicos da via espermática, possibilitando caracterizar a identificação dos constituintes do fluido seminal e de substâncias presentes no epitélio de revestimento tubular. As proteínas presentes no fluido seminal e no epitélio da via espermática desempenham funções indispensáveis para a manutenção da estrutura e homeostasia do epitélio de revestimento da via e dos espermatozoides presentes no microambiente luminal. Por isso foram realizados estudos na via espermática do cão adulto, com objetivo de imunolocalizar diferentes isoformas de aquaporinas (AQPs), proteínas intrínsecas de membrana, envolvidas no aumento da permeabilidade osmótica (DOMENICONI *et al.*, 2007b; DOMENICONI *et al.*, 2008).

As alterações endócrinas associadas com a obesidade influenciam os hormônios esteroides sexuais, entre outros secretados pelos órgãos endócrinos.

Estudos correlacionando a influência da subnutrição calórico-proteica materna de animais adultos, com a função sexual masculina, mostraram alterações no desenvolvimento testicular e na expressão de AQPs e receptores de andrógenos (AR) (ARRIGUI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Porém, estudos morfológicos da via espermática em modelos de obesidade como a dieta de cafeteria são escassos.

Tendo em vista que:

- 1) As concentrações dos androgênios e estrogênios fazem a autorregulação dos seus receptores;
- 2) A obesidade altera os níveis de hormônios sexuais;
- 3) As estruturas da via espermática são órgãos andrógeno-dependentes;
- 4) A via espermática também é regulada pelo estrogênio.
- 5) As AQPs estão presentes na via espermática e são importantes para formação do fluído luminal.

Justifica-se o interesse em investigar a expressão de AQPs no epitélio dos ductos eferentes e do ducto epididimário de ratos Wistar com obesidade induzida por dieta de cafeteria, tendo como:

Objetivo geral: realizar estudos para avaliar se a obesidade induzida por dieta de cafeteria causa alterações morfológicas no epitélio dos ductos eferentes e no epitélio epididimário de ratos Wistar adultos.

Objetivos específicos: realizar estudos que possibilite avaliar se a dieta de cafeteria induz a obesidade nos animais experimentais; analisar os epitélios dos ductos eferentes e dos segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de ratos Wistar adultos, através de análises morfológicas e morfométricas; avaliar a expressão de AQPs 1 e 9 nos epitélios dos ductos eferentes e dos segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de ratos Wistar adultos e avaliar a distribuição relativa celular dos segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de ratos Wistar adultos.

5- REVISÃO GERAL DE LITERATURA

5.1 - OBESIDADE

A obesidade e o sobrepeso são os problemas médicos crônicos mais frequentes da atualidade, e estão alcançando uma prevalência sem precedentes em pessoas de todas as idades, em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (SITORIUS, 1998). Atualmente, cerca de 1,6 bilhão de adultos (idade superior a 15 anos) têm sobrepeso (IMC - entre 25 e 30 kg/m²) e 400 milhões estão obesos (IMC $\geq$ 30 kg/m²). O Índice de Massa Corpórea (IMC) é aceito, internacionalmente, como determinante diagnóstico de obesidade e/ou sobrepeso, sendo entre 25 a 29,9 Kg/m² indicam sobrepeso e valores acima de 30 Kg/m², obesidade; esta pode ser classificada como de grau I (IMC entre 30 a 34,9 Kg/m²), de grau II (IMC entre 35 a 39,9 Kg/m²) e, ainda, de grau III (IMC $\geq$ 40 Kg/m²).

Segundo Pego-Fernandes (2011), nas últimas décadas, tanto os índices de sobrepeso como de obesidade aumentaram, em todo planeta, nas faixas etárias de 45 a 54 anos, entre os homens e, de 55 a 64 anos, entre as mulheres. Em faixas etárias superiores, a obesidade e o sobrepeso declinaram. Variações nos índices de obesidade também foram observadas considerando-se a classe econômica, visto que o excesso de peso foi mais evidente entre os homens com maior renda (61,8%), enquanto variou pouco entre as mulheres (45 – 49 %), independente da renda (PEGO-FERNANDES *et al.*, 2011). Dados coletados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) mostram que os brasileiros, também estão inclusos nestas estimativas, apresentando índices de aumento de massa corpórea nos últimos anos e que em 2008-2009, o excesso de peso afetava cerca de 50% dos homens e das mulheres brasileiras. Tais índices apontam a obesidade como um fenômeno que pode ser traduzido como um dos maiores desafios para as políticas públicas, no momento, exigindo um modelo de atenção à saúde, pautado na integralidade do indivíduo e com uma abordagem centrada na promoção da saúde (COUTINHO *et al.*, 2008).

Cada vez mais a obesidade vem chamando a atenção da comunidade científica e médica, por se mostrar uma doença grave, multifacetada e de genética complexa que, associada às suas comorbidades, é acompanhada de elevada morbidade e mortalidade, principalmente por doença cardiovascular, além de inúmeras outras complicações (BANDEIRA, 2003). Na obesidade ocorrem

alterações no equilíbrio energético do organismo, onde a obtenção de energia excede seu gasto, sendo então o excesso armazenado na forma de gordura no tecido adiposo (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). Estas alterações podem ser causadas por fatores genéticos, ambientais, sedentarismo, hábitos alimentares inadequados, hereditariedade, alterações metabólicas e neuroendócrinas, contribuindo para a criação e o desenvolvimento da obesidade (MOLINATTI *et al.*, 1992; BARSH *et al.*, 2000; BOUCHARD, 2001; FLEGAL *et al.*, 2002; MARTINEZ, 2000;; PI-SUNYER, 2002).

Segundo Almeida (2002), o estado final provocador de uma doença é resultado do sinergismo de uma multiplicidade de fatores políticos, econômicos, sociais, culturais, psicológicos, genéticos, biológicos, físicos e químicos. Este conceito de saúde-doença reflete também essa conjuntura social, econômica, política e cultural, não representando a mesma coisa para todas as pessoas, dependendo da época, lugar, classe social, valores individuais, concepções científicas, religiosas e filosóficas (SCLIAR, 2002). Assim sendo, ao longo da história da humanidade, o ganho de peso e depósito exagerado de gordura, foram vistos como sinais de saúde e prosperidade, no entanto, atualmente a obesidade é vista como um problema de saúde pública e afeta pessoas de todas as idades e de todo nível socioeconômico, provocando sérias consequências sociais, físicas e psicológicas (BOUCHARD *et al.*, 1989).

O excesso de peso é frequentemente associado com hiperlipidemia (McNAMARA *et al.*, 1992). Um relato do Instituto Nacional de Saúde dos EUA de 2002, conclui que a obesidade deve ser encarada como uma doença crônica degenerativa, pois existem múltiplos perigos biológicos de enfermidade prematura e morte para níveis surpreendentemente baixos de excesso de gordura, representando apenas 2,3 a 4,5 kg acima do peso corporal desejável (McARDLE *et al.*, 1998).

A obesidade é a forma mais comum de má-nutrição, do padrão alimentar inadequado e umas das mais comuns de resistência à insulina (FLEGAL *et al.*, 2002). O excesso de alimentação nos primeiros anos de vida e/ou exposição prolongada à escassez de alimentos, intrauterina e extrauterina, leva a desnutrição e tendência à obesidade posteriormente, e aumenta o número de células adiposas; um processo irreversível, que é a causa principal da obesidade para toda a vida.

Recentemente, a taxa de aumento na prevalência desta doença em crianças tem superado o índice da síndrome em adultos (STYNE *et al.*, 2001).

O acúmulo excessivo de gordura pode desencadear uma ampla variedade de respostas hormonais anormais, como a regulação de neuropeptídios relacionados com a saciedade. Segundo Rodrigues (2002), existe uma interação complexa entre hormônios e neuropeptídios, sob o controle principal de núcleos hipotalâmicos que regulam o peso corporal. Muitas pesquisas estão em andamento procurando isolar fatores genéticos, fatores intrínsecos e hormônios envolvidos na gênese da obesidade e com isto desenvolver novos medicamentos ou até terapias gênicas (REPETTO *et al.*, 2003).

Há muitas evidências de que a genética contribui substancialmente para a regulação do peso corporal. Estudos de correlação do IMC em gêmeos monozigóticos, gêmeos dizigóticos, irmãos biológicos e adotivos sugerem que a herança da obesidade é de 50-90% (BARSH *et al.*, 2000). No entanto, outros estudos, que correlacionam aspectos genéticos à ocorrência de obesidade, não foram capazes de evidenciar a interferência destes em mais de um quarto dos obesos, fazendo com que ainda se acredite que o processo de acúmulo excessivo de gordura corporal, na maioria dos casos, seja desencadeado por aspectos socioambientais (BOUCHARD *et al.*, 1989).

As mudanças de comportamento alimentar e os hábitos de vida sedentários atuando sobre genes de suscetibilidade são os determinantes principais do crescimento da obesidade no planeta. Quando se busca a explicação para esta epidemia global, certamente os esforços devem concentrar-se também na identificação de fatores ambientais envolvidos tais como, sedentarismo e ingestão de alimentos com altos teores de gordura, dentre outros fatores (EPSTEIN *et al.*, 2000).

5.2 - DIETA DE CAFETERIA

Muitos estudos foram desenvolvidos utilizando como modelo experimental para indução da obesidade a chamada dieta de cafeteria, que consiste em vários alimentos com alto valor energético, normalmente encontrado em supermercados, estes alimentos são colocados à disposição dos animais experimentais para desenvolvimento da obesidade. O desenvolvimento desta técnica teve como

objetivo aproximar o consumo alimentar dos ratos ao consumo feito pelas sociedades modernas, as quais fazem grande parte das refeições em cafeterias, lanchonetes e *fast foods*, onde, geralmente, são ingeridos alimentos com alto teor de gordura, caracterizando a denominada “dieta ocidental” (FRANCISCHINI *et al.*, 1999; WHO 1998). De fato, trabalhos demonstram aumento da quantidade de gordura em animais alimentados com este tipo de dieta (CESARETTI *et al.*, 2006; VON DIEMEN *et al.*, 2006). Na dieta de cafeteria adicionam-se à ração padrão, amendoim torrado, banha ou *bacon*, chocolate, refrigerantes, bolacha maisena, bolo de chocolate, dentre outros alimentos (CESARETTI, 2006; MEGUID, 2004; VON DIEMEN *et al.*, 2006). Na dieta de cafeteria, a mistura de alimentos com alto teor calórico e de alta palatabilidade proporciona grande aceitação dos animais experimentais, levando a maior ingestão alimentar e consequentemente, rápido ganho de peso; assim os animais tornam-se obesos, mais rapidamente, quando comparados com animais que recebem dieta hiperlipídica, com sobrecarga apenas de gordura (ESTADELLA *et al.*, 2004; WEST, 1998).

A dieta de cafeteria promove um acréscimo de peso corporal total de aproximadamente, 30 a 40%, além de produzir aumento na quantidade de gordura visceral. A dieta altamente calórica por um longo período de tempo faz que os animais, além da obesidade, desenvolvam outras comorbidades. A aplicação da dieta de cafeteria, independente do aumento de peso corporal, promove alterações metabólicas e bioquímicas nos animais (ESTADELLA *et al.*, 2004).

5.3 - DUCTOS EFERENTES E EPIDÍDIMO

Os espermatozoides produzidos nos túbulos seminíferos contorcidos de mamíferos são conduzidos dos testículos à uretra masculina através de um sistema de ductos para serem liberados durante a ejaculação. Este sistema de ductos é formado, sequencialmente, pela rede testicular, ductos eferentes, ducto epididimário e ducto deferente, os quais constituem juntamente com os túbulos seminíferos a via espermática (BEU, 2005). Os espermatozoides liberados pelos túbulos seminíferos são imaturos e ao transitarem pelo sistema de ductos da via espermática, principalmente pelo ducto epididimário, adquirem capacidade de fertilizar oócitos. Logo, os ductos da via espermática não são condutos meramente passivos, mas representam um sistema dinâmico que influencia o microambiente no qual os

espermatozoides estão localizados, os quais são submetidos a alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas relacionadas à sua maturação (ROBAIRE; HERMO, 1988; SETCHELL; MADDOCKS; BROOKS, 1994).

Os ductos eferentes fazem a conexão entre o testículo e o epidídimo, sendo compostos por uma série de túbulos que se estendem a partir da rede testicular até o segmento inicial do epidídimo. Estes ductos estão anatomicamente diferenciados em uma região proximal (Zona inicial) e uma região distal, formada pelo cone vascular e ducto eferente comum, na qual os ductos são mais sinuosos e anastomosam-se (JONES; JURD, 1987).

O número de ductos eferentes varia de 1 a 30 de acordo com a espécie. Os ductos eferentes de ratos variam de 5 a 7, com um comprimento total de 20 cm, formando um ducto avermelhado, que passa dorsalmente, partindo da rede extratesticular, cruzando a gordura epididimal superior, juntando-se ao segmento inicial do epidídimo (JONES; JURD, 1987). A região proximal dos ductos eferentes de ratos, possui 7 mm de comprimento e 1-5 mm de diâmetro, ocupando 39% do volume dos ductos eferentes, enquanto o cone vascular tem 2-5 mm de largura e 4 mm de comprimento, ocupando, cerca de 57% do volume dos ductos eferentes (JONES; JURD, 1987, p.82). A variabilidade do número e comprimento dos ductos eferentes é espécie-específica, uma vez que, humanos têm de 6 a 15 ductos, cangurus *Tammar sp.*, de 12 a 16 com comprimento total de 6,7 cm (CHATURAPANICH; JONES, 1991) e *Equidnas*, apenas 7 ductos eferentes, com um comprimento total de 39 cm (DJAKIEW; JONES, 1982).

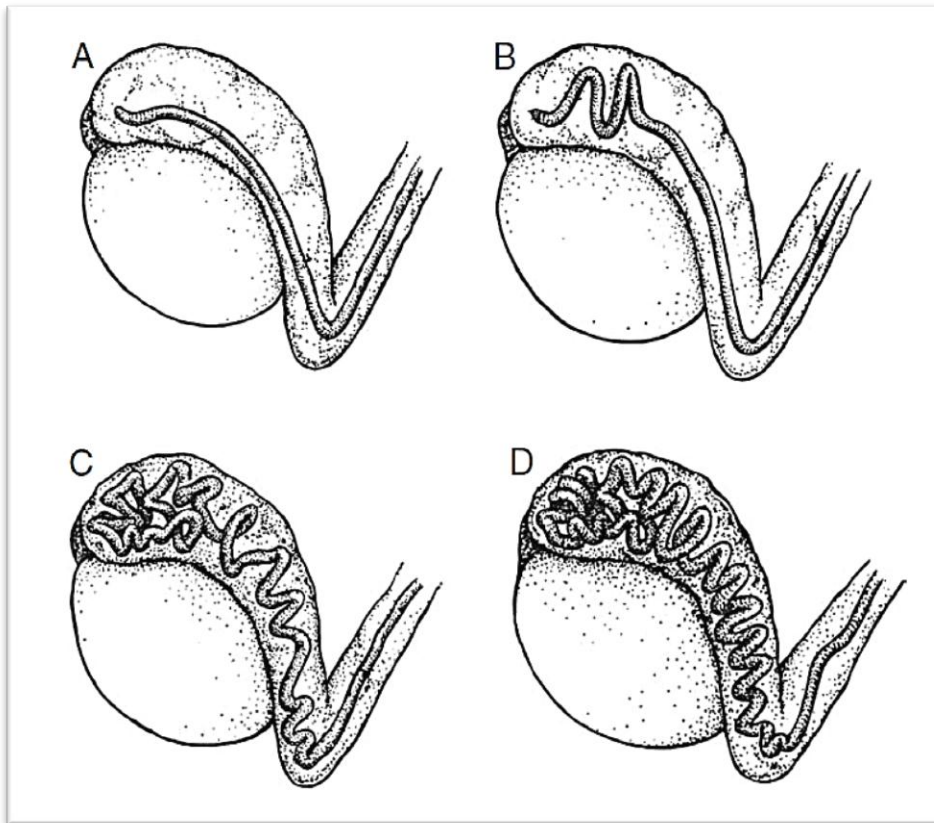
A morfologia epitelial destes ductos é caracterizada por um epitélio colunar simples e constituído por dois tipos principais de células, as células ciliadas e não ciliadas (ILIO *et al.*, 1994), sendo que as células ciliadas compõem cerca de 15% do epitélio da zona proximal e 33% da zona distal (JONES; JURD, 1987). Os cílios não parecem estar envolvidos na movimentação dos espermatozoides e do fluido no qual estão imersos para o epidídimo, mas possivelmente com função de agitar o fluido no lúmen dos eferentes, atuando em processos absorptivos do conteúdo luminal (AMSELGRUBER; SINOWAT, 1991; ILIO *et al.*, 1994; HESS, 2002). As células não ciliadas têm microvilosidades na sua superfície apical, aumentando a área superficial, tal como ocorre nos túbulos proximais dos rins, porém, não há similaridade entre as membranas basolaterais das células não ciliadas e as dos túbulos proximais dos rins (WANG; JONES; CLULOW, 1994).

Os ductos eferentes têm origem a partir dos túbulos mesonéfricos, mantendo, portanto, similaridade com túbulos renais proximais tanto na morfologia, quanto na função (HINTON *et al.*, 1988). A maior parte do fluido (50% a 90%), proveniente dos túbulos seminíferos e da *rete testis*, é reabsorvido nos eferentes, o que aumenta cerca de 25 vezes a concentração de espermatozoides (CLULOW *et al.*, 1998; LEVINE *et al.*, 1971; TURNER *et al.*, 1983). A concentração dos espermatozoides, no segmento inicial, do epidídimo é de suma importância para o desenvolvimento dos processos relacionados à maturação dos espermatozoides, pois possibilita a interação eficiente dos produtos secretados pelas células principais, bem como absorção de conteúdos presentes no lúmen pelas mesmas (CORNWALL *et al.*, 2002; HESS, 2002 *et al.*, 2002; ROBAIRE; HERMO, 1988).

As similaridades de origem embriológica entre os ductos eferentes e os túbulos renais podem ser verificadas pelas expressões de aquaporinas em ambas as estruturas (ROBAIRE; HERMO, 1988). As AQPs 1, 9 e 10 são expressas pelas células não ciliadas nos ductos eferentes, com AQP 1 localizada na região apical e basolateralmente, e as AQPs 9 e 10 mais proeminentes nas microvilosidades, contribuindo em grande parte para a reabsorção nos ductos eferentes. Para alguns autores, as células ciliadas também expressam AQP 1, 9 e 10, mas com ausência na região basolateral (BADRAN; HERMO, 2002; HERMO *et al.*, 2004), porém, outros autores, relataram a ausência de AQP 1 e 9 nessas células (BROWN *et al.*, 1993; FISHER *et al.*, 1998; PASTOR-SOLER *et al.*, 2001).

O epidídimo apresenta uma estrutura básica, sendo um túbulo único, altamente enovelado (**Figura 1**), que liga os ductos eferentes ao ducto deferente, e possui como funções principais: receber e armazenar espermatozoides imaturos do testículo; transportar e maturar os espermatozoides, graças à interação com os componentes secretados no seu lúmen; armazenar e proteger os espermatozoides funcionais, antes da liberação no ducto deferente no momento da ejaculação (BEDFORD, 1966; ORGEBIN-CRIST, 1976). Estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, realizados no epidídimo, têm revelado uma extraordinária complexidade tanto a nível estrutural como funcional (ROBAIRE *et al.*, 2006). O ducto epididimário possui comprimento variável de acordo com a espécie; em ratos este comprimento varia de 3-4 m, com o espermatozoide levando de 8 a 11 dias para percorrer todo o trajeto até a cauda do epidídimo (ROBAIRE *et al.*, 2006; TURNER; GLEAVY; HARRIS, 1990). Enquanto em humanos, relata-se um

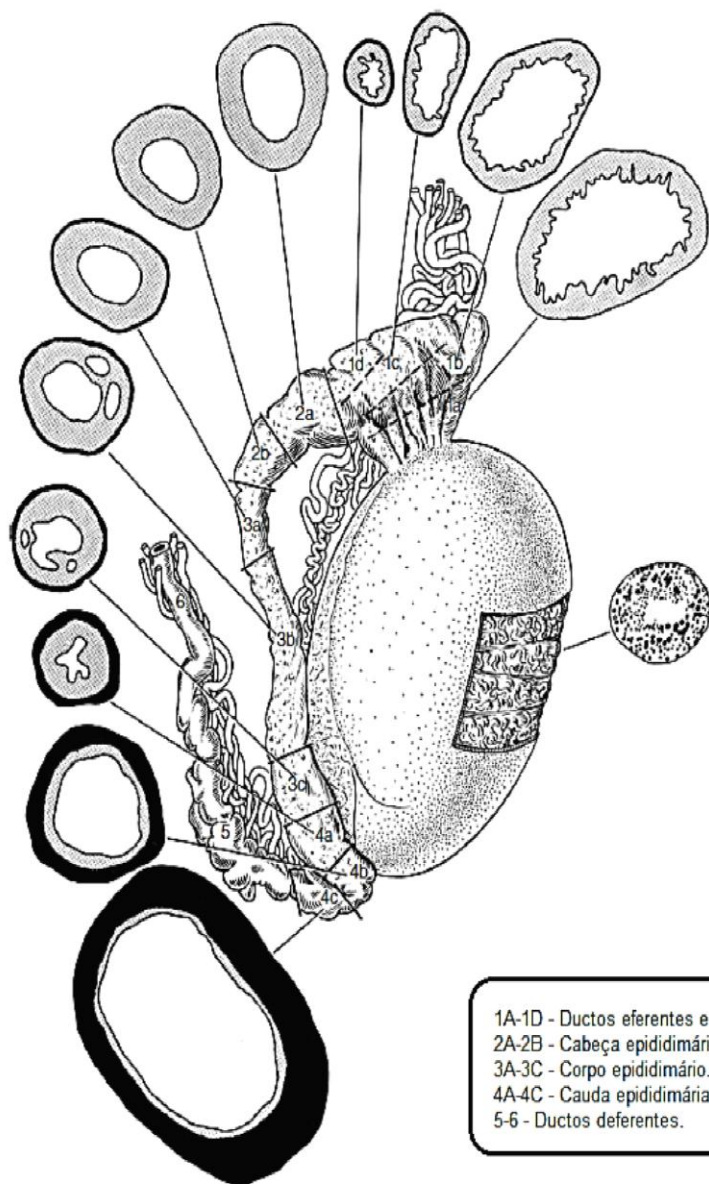
comprimento de 3-6 m, variando de 1 a 2 semana pra que o espermatozoide percorra todo o trajeto (VON LANZ; NEUHAUSER, 1964). Camundongos possuem um comprimento total de 1 m (TAKANO; ABE; ITO, 1981), já em equinos, pode-se encontrar um comprimento maior que 80 m de ducto (MANEELY, 1959). A aquisição da capacidade de fertilização dos espermatozoides ocorre numa localização epididimária espécie-específica (DACHEUX; PAQUIGNON, 1980), sendo em ratos adquirida na cauda proximal (ROBAIRE *et al.*, 2006).



O epidídimo pode ser dividido, com base nas suas propriedades anatômicas e características histológicas, em quatro regiões principais: segmento inicial, cabeça, corpo e a cauda (**Figura 2**). Cada uma destas regiões possui perfis de expressão de genes-específicos diferentes (TURNER *et al.*, 2003; JOHNSTON *et al.*, 2005, 2007; ZHANG *et al.*, 2006; DUBÉ *et al.*, 2007; JELINSKY *et al.*, 2007; THIMON *et al.*, 2007; GUYONNET *et al.*, 2009).

Enovelamento do ducto epididimário de rato

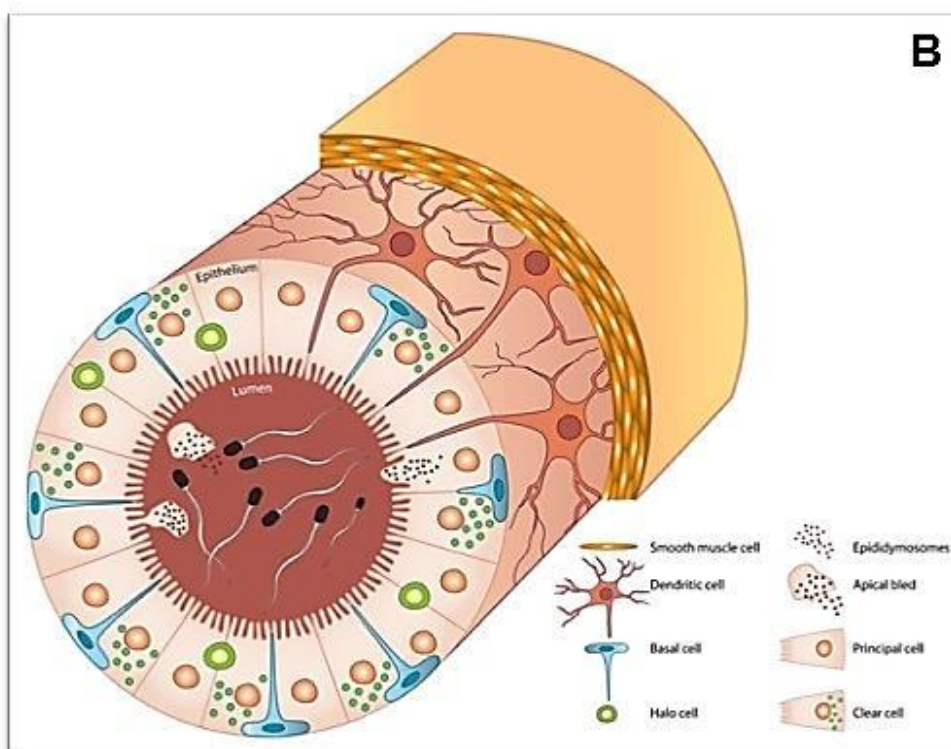
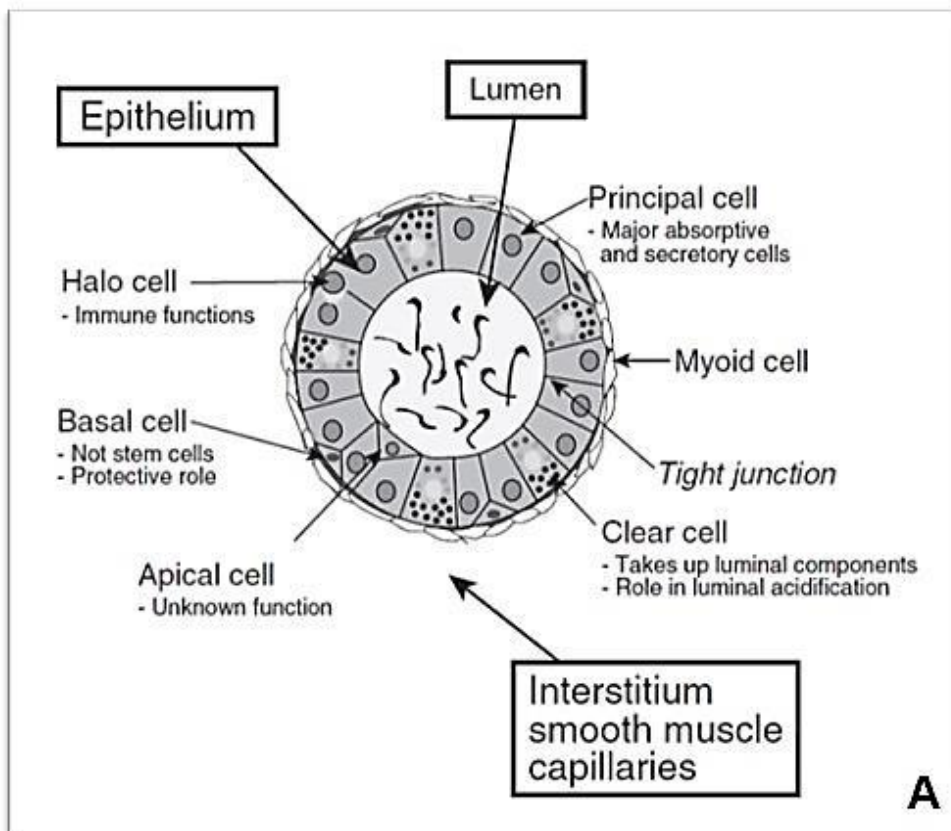
Figura 1 - Processo de enovelamento do ducto epididimário de rato (**1A-1C**), enovelamento completo no período inicial pós-natal (**1D**). Para facilitar a visualização das mudanças, os tamanhos do testículo e epidídimo não estão em escala. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3^a Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 22, Epididymis.



Regiões do Epidídimo

Figura 2 - Diagrama representativo do testículo, ductos eferentes, epidídimo e ducto deferente de humano. Regiões do epidídimo: Segmento inicial (1B, 1C e 1D), cabeça (2A e 2B), corpo (3A, 3B e 3C) e cauda (4A, 4B e 4C) são indicados no diagrama. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3^a Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 17, Anatomia do sistema reprodutor masculino.

As secreções segmento-específicas de proteína para o fluido luminal geram microambientes propícios para cada etapa da maturação dos espermatozoides. Secreções na região de cabeça e corpo epididimário, são específicas para a aquisição de motilidade e capacidade fertilização dos espermatozoides (TURNER, 1995), já as secreções na região de cauda epididimária, são importantes para manter a integralidade dos espermatozoides, dando condições que preservam a sua capacidade de fertilização (JONES; MURDOCH, 1996). Estas regiões são subdivididas por septos de tecido conjuntivo e em pequenas regiões intrarregionais. Cada região tem propriedades funcionais distintas que se originam a partir de diferenças estruturais e moleculares entre os tipos de células epiteliais: principais, halo, delgadas, apical, clara e basal (**Figura 3A e 3B**) (ROBAIRE *et al.*, 2006).



Organização e distribuição celular no epidídimo

Figura 3 – Esquema da organização e distribuição dos tipos celulares encontrados no epidídimo e respectivas funções. **(3A) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3^a Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 22, O epidídimo. **(3B) BELLEANNÉE C.; THIMON V.; SULLIVAN R.** Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell Tissue Res**, v.349, p.717-731, 2012.

As células principais formam aproximadamente 65% a 80% da população total de células epiteliais e sintetizam essencialmente todas as proteínas secretadas para dentro do lúmen epididimário (SUN; FLICKINGER, 1979), considerando que algumas destas proteínas estão envolvidas na aquisição de capacidade de fertilização (MONTFORT *et al.*, 2002), aquisição de motilidade do espermatozoide (FRENETTE *et al.*, 2004, 2006), proteção dos gametas masculinos contra espécies reativas de oxigênio (VERNET *et al.*, 2004), ou eliminação de espermatozoides defeituosos (SUTOVSKY *et al.*, 2001).

Grandes mudanças estruturais e funcionais ao longo do epidídimo foram relatadas em células principais (HERMO; ROBAIRE 2002; JOSEPH *et al.*, 2011). Estas células, na região proximal, exibem uma forma colunar alta, enquanto que nas regiões distais são cuboídes, peculiaridade que se relaciona com modificações morfológicas e funcionais das organelas relacionados aos processos de secreção e endocitose (HERMO; ROBAIRE 2002). Além disso, as células principais expressam vários transportadores e canais de membrana, tais como a AQP-9, (PASTOR-SOLER *et al.*, 2001), proteína canal de cloreto (CIC3), (ISNARD-BAGNIS *et al.*, 2003), e as anidrases carbônicas associadas à membrana (CAII e CAIV) que medeiam o transporte de elementos importantes como ATP, cloreto, H₂O e bicarbonato para a fisiologia do epidídimo (KAUNISTO *et al.*, 1995).

As células apicais podem ser encontradas no segmento inicial e na zona intermediária de transição, localizada entre a cabeça e o corpo do epidídimo. Esta célula tem morfologia única e função que se sobrepõe um pouco com as das células claras (ADAMALI *et al.*, 1996). O núcleo das células apicais varia de oval a esférico e localiza-se na região apical; seu citoplasma apical contém numerosos vacúolos, vesículas de endocitose, lisossomos e mitocôndrias, podendo ser projetado para o lúmen. Além da CAII, também são encontradas nas células apicais, enzimas lisossomais, catepsina-D e beta-hexosaminidase bem como nas células halo (HERMO *et al.*, 2000).

As células halo são encontradas ao longo de todo epidídimo, mas são mais abundantes na região proximal (FLICKINGER *et al.*, 1997; NASHAN *et al.*, 1989; SEILER *et al.*, 1999). Elas representam um conjunto de diferentes células do sistema imunológico, como os linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos e macrófagos e seu número aumenta com a senescência (SERRE; ROBAIRE, 1999).

As células claras de ratos são grandes células endocíticas, intercaladas entre as principais, encontradas nas regiões da cabeça, corpo e cauda epididimárias, em proporção crescente de proximal para distal; estas são caracterizadas por uma região apical com numerosas vesículas revestidas, endossomos e corpos multivesiculares; além destas organelas, lisossomos são encontrados na região intermediária do citoplasma e na região basal, gotas lipídicas. A atividade endocítica das células claras é maior que a de qualquer outro tipo de célula no epidídimo, e é particularmente ativa na cauda (SUN *et al.*, 1979). Estas células expressam, em sua membrana, bombas vacuolares de prótons (V-ATPase), cuja atividade contribui para a acidificação do lúmen, mantendo assim os espermatozoides em um estado de repouso antes da ejaculação (BRETON *et al.*, 1996). Em estado estacionário, a V-ATPase é encontrada entre a membrana plasmática subapical e a membrana das vesículas apicais (SHUM *et al.*, 2009). Porém, estímulos fornecidos pelo ambiente luminal, tais como, pH elevado, concentração baixa de bicarbonato, angiotensina II ou agonistas purinérgicos, faz com que a V-ATPase seja recrutada pela membrana plasmática, a qual se alonga para formar microvilosidades (BEAULIEU *et al.*, 2005; BELLEANNÉE *et al.*, 2010; PASTOR-SOLER *et al.*, 2003; SHUM *et al.*, 2008). Além disso, as células claras são consideradas células endocíticas que removem proteínas, a partir do fluido luminal do epidídimo (VIERULA *et al.*, 1995), e gotas citoplasmáticas derivadas dos espermatozoides durante a maturação no epidídimo (HERMO *et al.*, 1988).

As células basais compõem cerca de 20% da população epitelial do epidídimo (MARENGO *et al.*, 1990; SERRE; ROBAIRE, 1998), sendo caracterizadas por seu formato piramidal e por sua localização entre células epiteliais e junto à lâmina basal. Shum *et al.* (2009) relataram que estas têm projeções estreitas que entram em contato com a superfície luminal do epitélio epididimário, e que expressam o receptor de angiotensina tipo II (AGTR2), que quando ativado, aumenta a secreção para células claras adjacentes. Estes autores, também, propuseram o mecanismo pelo qual as células basais emitem suas projeções: estreitas extensões citoplasmáticas, cruzando as junções no polo apical do epitélio, entram em contato direto com o fluido luminal, verificam sua composição, detectando angiotensina II pelo AGTR2, expresso pelas células basais, desencadeando a secreção de prótons pela V-ATPase, através das células claras, como resultado de uma interação entre as células basais e células claras adjacentes

(SHUM *et al.*, 2008). As células basais, também, compartilham interdigitações extensas com a membrana plasmática adjacente das células principais. Acredita-se que as células basais realizam endocitose de elementos provenientes de células sanguíneas e células principais, mediada por receptor (VERI *et al.*, 1993), podendo assim, ajudar a regular as funções das células principais e claras (SHUM *et al.*, 2009). Além disso, as células basais expressam marcadores diferentes, tais como a subunidade Yf da Glutathione-S-transferase (GST) (VERI *et al.*, 1993) e a CuZn-superoxide dismutase (SOD) (NONOGAKI *et al.*, 1992), sugerindo um papel na proteção contra espécies reativas de oxigênio.

Além de proporcionar a maturação dos espermatozoides, o epidídimo, também, desempenha importante papel no transporte, proteção e armazenamento dos mesmos (ROBAIRE *et al.*, 2006). A formação do ambiente luminal, propício à maturação, é o resultado de secreções de líquidos e os processos absorptivos realizados pelo epitélio, que atuam diferentemente ao longo do ducto epididimário (ROBAIRE *et al.*, 2006). Estas atividades das células epiteliais criam um ambiente luminal caracterizado por apresentar diferenças marcantes, em termos de compostos e constituintes, em comparação ao sangue. A existência de grandes diferenças nas concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos, entre o fluido luminal e o sangue, reflete a eficácia da barreira hemato-epididimária, que possibilita excluir seletivamente ou concentrar íons e moléculas dentro do epidídimo (CYR *et al.*, 1995; HINTON; HOWARDS, 1981). Além disso, a barreira hemato-epididimária participa do armazenamento dos espermatozoides auto-antigênico em um ambiente imunológico seguro. Os diferentes tipos de células do epidídimo formam uma camada única de epitélio em torno do lúmen, e estas, se ligam fortemente através de junções por todo polo apical, criando assim uma barreira hemato-epididimária (CYR *et al.*, 2007).

5.4 - ANDROGÊNIOS, ESTROGÊNIOS

Os ARs foram bem descritos em várias espécies, incluindo ratos e camundongos (FABER *et al.*, 1991; TAN *et al.*, 1988). O AR pertence à família de receptores de hormônios nucleares, que também inclui receptores de outros hormônios esteroides, em mamíferos, tais como o receptor de glicocorticoide (GR), o receptor de mineralocorticoide (MR), receptor de progesterona (PR) e receptores

de estrogênio (ER α e ER β). O gene AR, em humanos, está localizado no cromossomo X na posição Xq11-q12 (LUBAHN *et al.*, 1988), e compreende oito exons que codificam uma proteína de 110-kD, contendo um domínio N-terminal de ativação, um domínio de ligação central ao DNA e um domínio C-terminal ligante dependente (CHANG *et al.*, 1995) para androgênios e seus derivados metabólitos.

Os androgênios são hormônios esteroides com papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção do fenótipo masculino e da função reprodutiva. Estes exercem suas funções por mecanismos genômicos, que envolvem a ligação do hormônio ao AR, e um fator de transcrição ativado por ligante, o que resulta no controle de expressão gênica (MARILIA *et al.*, 2009). O AR tem sido encontrado na maioria dos tipos celulares de tecidos do sistema genital masculino (ZHOU *et al.*, 2002). Os androgênios estão envolvidos, principalmente, no desenvolvimento do fenótipo específico masculino durante a embriogênese; no estabelecimento da maturação sexual durante a puberdade; na manutenção da função do sistema genital masculino; na espermatogênese e no comportamento sexual, durante a vida adulta. Eles, também, afetam uma ampla variedade de funções em tecidos não reprodutivos, tais como os tecidos ósseos e tecidos musculares esqueléticos, em ambos os sexos (MATSUMOTO *et al.*, 2008). Androgênios endógenos, principalmente a testosterona e o seu metabólito ativo, a DHT, exercem a maior parte dos seus efeitos através da ligação AR (HE *et al.*, 1999; HEINLEIN; CHANG, 2002; JANNE *et al.*, 2000; LAMB *et al.*, 2001), ou através de vias de sinalização epididimária andrógeno-dependente, envolvendo a MEK, quinases ativadas por estímulos extracelulares tipo-1 e 2 (ERK 1-2) e a proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB) nas células do epidídimo (HAMZEH; ROBAIRE, 2011).

Estudos mostram que a orquidectomia, uma técnica que consiste na remoção do testículo e ligação dos ductos eferentes, provoca grandes mudanças sobre a morfologia e as funções do epidídimo (BROOKS, 1976; HOFFER, 1979; FAN; ROBAIRE, 1998; EZER; ROBAIRE, 2003; FAWCETT; TURNER *et al.*, 2007), demonstrando, assim, que a fisiologia do epidídimo, em grande parte, é dependente de fatores testiculares que não são sintetizados pelo epidídimo, tais como a testosterona, produzida pelas células de Leydig. Este hormônio androgênio é um dos fatores mais conhecidos e estudados que afetam as funções do epidídimo, tais como o metabolismo, transporte de íons, síntese e secreção de proteínas do epidídimo, maturação, transporte e armazenamento dos espermatozoides

(BILINSKA *et al.*, 2006). Este hormônio está presente no meio intraluminal dos ductos eferentes e do epidídimo, em altas concentrações. Depois de deixar o testículo, através dos ductos eferentes, a testosterona é incorporada pelas células principais do epidídimo, por endocitose, pelo complexo proteico de ligação de andrógenos (ABP). A testosterona pode ser metabolizada rapidamente, uma vez que a enzima 5-alfa-redutase converte a testosterona em uma forma biologicamente mais ativa, a di-hidrotestosterona (DHT), além disso, a aromatase-P450 converte a testosterona em compostos estrogênicos, tais como o estradiol (E2). Ambos, androgênios e estrogênios, têm sido relacionados à regulação da expressão de genes no epidídimo (DANZO *et al.*, 1977).

Além de testosterona, o principal hormônio sexual masculino, os testículos também produzem estrogênios, cujas concentrações no sistema genital masculino, geralmente, são maiores do que na circulação geral (HESS *et al.*, 2000). Estes são gerados a partir da aromatização da testosterona pela aromatase citocromo-P450. A atividade da aromatase foi detectada nas células de Leydig (HESS *et al.*, 2001) e, também, no epidídimo de ratos (HESS *et al.*, 1995; JOSEPH *et al.*, 2011). Os estrogênios realizam seus efeitos biológicos após a sua interação com seus receptores nucleares, ER α ou ER β , e reconhecimento subsequente dos elementos de resposta estrogênica (EREs), localizados nos promotores dos genes-alvo (JOSEPH *et al.*, 2011).

A perda de fertilidade em camundongos ER α *-/-* machos demonstra a importância da resposta induzida por estrogênios, mediada por ER α na função reprodutiva (EDDY *et al.*, 1996). Embora exista um número inferior de genes que são regulados por estrogênios, em comparação com o número de genes regulados por androgênios, no epidídimo de rato (ROBAIRE; HAMZEH, 2010), os estrogênios exercem uma função importante na regulação da expressão de genes ligados ao transporte de solutos e água (HESS *et al.*, 1997a, 2001; SNYDER *et al.*, 2009), o qual é essencial para a integridade do processo reprodutivo normal (HESS *et al.*, 1997b). Entre esses genes, o da expressão da AQP-9, é regulado por estrogênios (JOSEPH *et al.*, 2011; PASTOR-SOLER *et al.*, 2010). Isto sugere que o equilíbrio de estrogênio e androgênio pode ser importante para assegurar as funções apropriadas do epidídimo.

Os receptores ER α e ER β parecem ter papéis únicos e opostos no sistema genital (LIU *et al.*, 2002). Embora o papel do estrogênio nos órgãos do sistema

genital masculino não seja completamente compreendido, estudos forneceram evidências de que ele exerce papel fisiológico neste sistema, desempenhando papéis essenciais na manutenção de sua estrutura e função (HESS *et al.*, 2001). Relatos apontaram que a presença de ER α nos ductos eferentes pode ser essencial para a absorção de fluido luminal (LEE *et al.*, 2000).

5.5 - AQUAPORINAS

Nos epitélios dos ductos epididimários e eferentes são encontrados canais de íons, transportadores de membrana e proteínas de membrana, entre elas as AQP, são encontrados nos epitélios dos ductos eferentes e epididimário, correlacionados com transporte e fluxo de fluidos (HERMO *et al.*, 2011). As AQP pertencem a uma família de proteínas expressadas na membrana plasmática de diversos tipos celulares, tais como células do tecido renal, nervoso e em glândulas endócrinas, dentre outras, envolvidas no transporte de fluidos (LI *et al.*, 1994; ISHIBASHI *et al.*, 1997, 2000; PAGE *et al.*, 1998; BEITZ; SCHULTZ, 1999; SHANAHAN *et al.*, 1999; VERKMAN *et al.*, 2000).

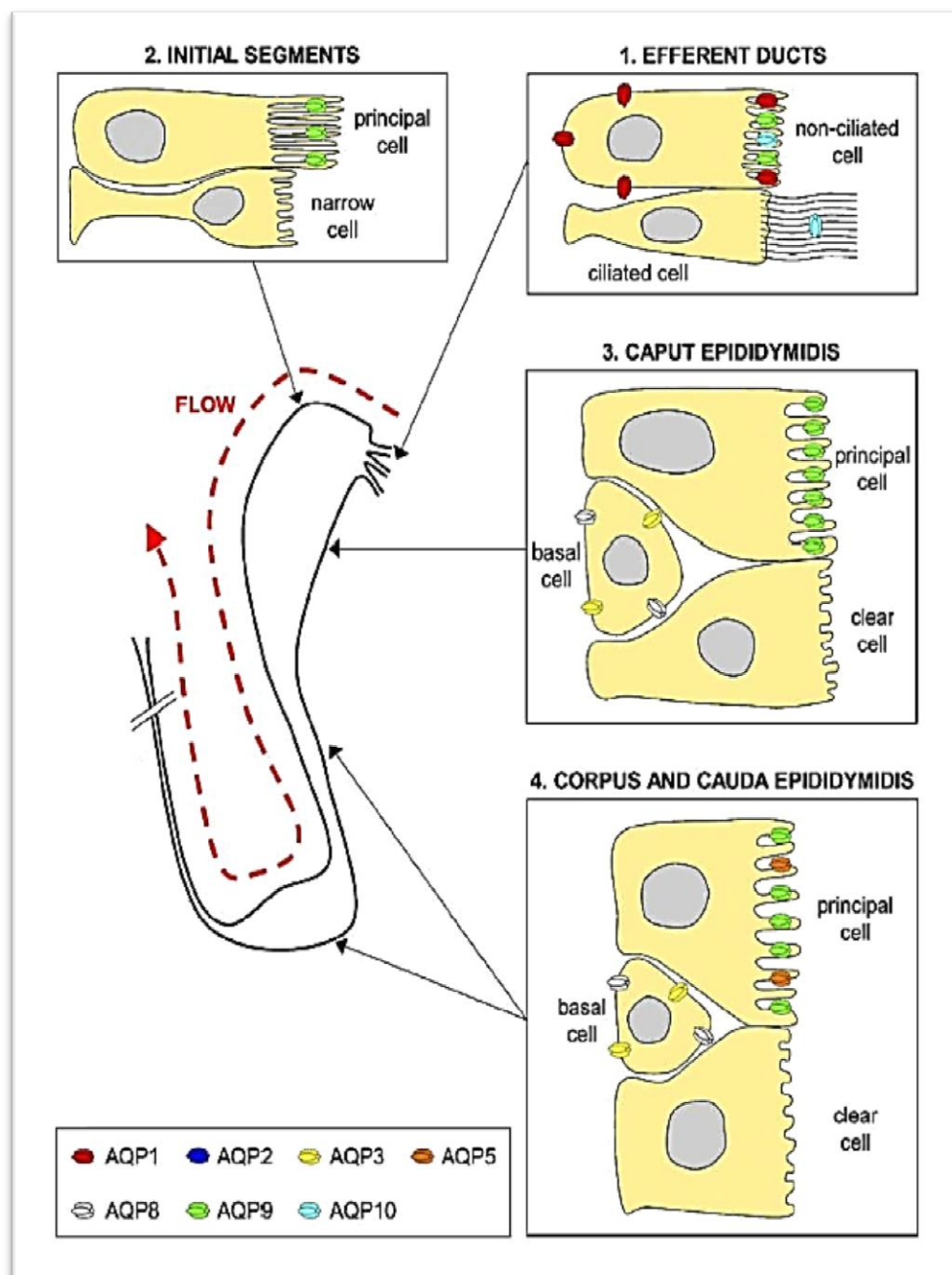
As AQP são uma família de 13 pequenas proteínas integrais de membrana, hidrofóbicas (massa molecular variável de 25 -34 kDa), agrupadas em tetrâmeros (PRESTON; AGRE, 1991; KING; AGRE, 1996). Cada monômero é constituído por seis domínios α -helicoidais, abrangendo um poro central que permite o movimento bi-direcional de água, através do epitélio (VERKMAN; MITRA, 2000; KING *et al.*, 2004). A família das AQP, atualmente, é subdividida em dois grupos, AQP propriamente ditas ou ortodoxas e aquagliceroporinas. As AQP ortodoxas, compostas pelas AQP 0, 1, 2, 4, e 5, são altamente seletivas à água, ao passo que as aquagliceroporinas, AQP 3, 7, 9, e 10, são canais não seletivos exclusivamente à água, sendo permeáveis também à ureia, glicerol e outras pequenas molécula. Além disso, outras AQP como as 6, 8, 11, 12, 13, podem ser encontradas nos tecidos envolvidos com transporte de fluidos (TSUKAGUCHI *et al.*, 1998; BORGNA *et al.*, 1999; VAN OS *et al.*, 2000; SANSOM *et al.*, 2001; AGRE *et al.*, 2002; MORISHITA *et al.*, 2004; YASUI, 2004; VERKMAN, 2005; ZARDOYA, 2005; HARA-CHIKUMA; VERKMAN, 2006; WANG, *et al.*, 2006; ROJEK *et al.*, 2007).

As AQP desempenham um papel essencial no transporte de água através da membrana plasmática. No epidídimo, o transporte de água contribui para a

concentração de espermatozoides ao longo do epidídimo (**Figura 4**). Esta função é crítica não só para o epidídimo, mas também para outras partes da via espermática, uma vez que a insuficiência de transporte de solutos e de fluido nesta via modifica as propriedades do ambiente luminal e afeta os processos de maturação, concentração e transporte de espermatozoides (HESS, 2000; YEUNG *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2001). Para que o transporte dos espermatozoides, ao longo da via espermática, seja realizado, é necessário um controle do influxo e efluxo de água nesta via, tornando-a um componente indispensável para este processo.

Vários membros da família AQP foram bem descritos no sistema genital masculino (Da SILVA *et al.*, 2006; HERMO; SMITH, 2011). No humano, foi demonstrada expressão abundante de AQP9 nas regiões de cabeça e corpo epididimários, já a expressão AQP1 é, significativamente, maior na região de cauda do epidídimo (THIMON *et al.*, 2007). A expressão elevada de AQP9 encontrada nas regiões proximais do epidídimo indica uma maior reabsorção de água que ocorre nestas regiões, comparativamente ao que foi demonstrado na cauda epididimária.

A expressão de AQP1 em células não ciliadas nos ductos eferentes foi confirmada (BADRAN; HERMO, 2002), sendo a expressão de AQP1 encontrada em oócitos de *Xenopus sp.* (PRESTON *et al.*, 1992), e a incorporação de proteínas purificadas em vesículas de fosfolipídios (VAN HOEK *et al.*, 1992; ZEIDEL *et al.*, 1992), o que demonstraram que AQP1 funciona como um canal de água seletivo. A AQP1 pode ser encontrada no epitélio dos ductos eferentes e nas células endoteliais de canais vasculares, situados no espaço intertubular do epidídimo de ratos (BADRAN; HERMO, 2002). Além disso, importantes genes localizados no epidídimo proximal codificam proteínas membros de canais aquosos para transporte de fluídos na região dos ductos eferentes (PASTOR *et al.*, 2001).



Distribuição de AQP's no epidídimo masculino

Figura 4 - Diagrama esquemático da distribuição de AQP's no ducto eferente e epitélio epididimário masculino. DA SILVA N., PIÉTREMENT C. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1758, p.1025–1033, 2006.

5.6 - EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-TESTICULAR

Segundo Ronald (2002), o eixo reprodutor masculino é composto de seis componentes principais: sistema nervoso central (SNC), hipotálamo, hipófise, testículos, órgãos sensíveis aos hormônios sexuais e receptores específicos a hormônios. A via hipotalâmica-hipofisária-testicular é um sistema integrado que assegura a secreção de hormônios sexuais masculino e auxília na produção de espermatozóides (RONALD *et al.*, 2002).

O controle entre os componentes do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular é realizado por *feedback* endócrino. O papel do hipotálamo na regulação da função testicular é integrar os centros cerebrais superiores com os da periferia, e modular a liberação dos principais neuropeptídeos reprodutivos, o LH e/ou GnRH. O GnRH é um estimulador da liberação e síntese de LH e hormônio folículo estimulante (FSH).

A síntese de GnRH ocorre nos corpos celulares das células neurosecretoras que possuem projeções axonais na eminência mediana do hipotálamo (STERNBERGER; HOFFMAN, 1978). O GnRH é sintetizado como um precursor de peso molecular maior e é transformado em (peptídio) inativo, durante o transporte axonal (SEEBURG; ADELMAN, 1984). A liberação de GnRH, pelas células neurosecretoras hipotalâmicas, é submetida ao controle neural, principalmente, pelos neurônios noradrenérgicos que exercem um efeito estimulador sobre a liberação de GnRH (KORDON *et al.*, 1994). No entanto, outros neurotransmissores, incluindo serotonina, dopamina e outros neuropeptídios, também exercem efeitos tanto estimulatórios quanto inibitórios sobre as células secretoras de GnRH. A influência da luz, emoções e olfato, sobre a função reprodutiva masculina, são presumivelmente mediadas pela atividade desses neurônios. Mensurações diretas dos níveis de GnRH em ovelhas, indicam que esse é liberado em frações pulsáteis; as gonadotrofinas, também, são liberadas num padrão pulsátil que é correspondente com a liberação pulsátil do GnRH (CLARKE; CUMMINS, 1982), fator observado também em humanos.

Tanto o LH quanto o FSH são sintetizados a partir do mesmo tipo de célula do parênquima glandular na parte anterior da hipófise (NAKANE, 1970). A ação do GnRH na síntese de LH e FSH, é realizado através da ativação de canais cálcio-dependentes e, também, através de proteinoquinasas-C independentes (CONN, 1994). As diferenças na amplitude de frequência dos pulsos de GnRH podem

modular a síntese diferencial de LH e FSH (MARSHALL *et al.*, 1991). Em geral, as frequências lentas favorecem a síntese de FSH e as frequências mais elevadas são necessárias para manter o LH. Uma vez secretada pela hipófise, as gonadotrofinas entram na corrente sanguínea, realizando seus efeitos biológicos nos testículos através da circulação periférica. Nos testículo, LH age diretamente sobre as células de Leydig, mantendo as suas características tróficas e estimulando a esteroidogênese (CHRISTENSEN; MASON, 1965). Já o FSH e testosterona são necessários para a manutenção da espermatogênese, onde atuam através de receptores específicos nas células de Sertoli e nos túbulos seminíferos (CLERMONT; HARVEY, 1965; CUNNINGHAM; HUCKINS, 1979).

A função gonadal é regulada pela secreção precisa e coordenada das gonadotrofinas hipofisárias, o LH e FSH. Nos testículos, o LH regula as concentrações locais e sistêmicas de esteroides sexuais, além dos esteroides pelas células de Leydig (ULLOA-AGUIRRE; TIMOSSI, 2000). As células de Leydig, nos testículos, são os locais de produção e secreção do hormônio testosterona, que através de sua ação direta e de seus metabólitos, DHT e estradiol, proporciona um ambiente necessário para o desenvolvimento da função sexual, juntamente com o andrógeno e estrógeno que irão agir em seus órgãos-alvos, tais como o cérebro, ossos, músculos, fígado, pele, medula óssea e sistema imune. As células de Sertoli e células germinativas, nos túbulos seminíferos, atuam de forma integrada com as células de Leydig, os hormônios gonadotróficos da hipófise, LH e FSH, conduzindo a produção normal de células germinativas. Os testículos, através da produção de esteróides, também fornecem os *links* reguladores para controlar o *feedback* dos componentes do eixo hipotálamo-hipofisário.

6- REFERÊNCIAS

- ADAMALI, H.I.; HERMO, L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. **J. Androl.** v.17, p.208–222, 1996.
- AGRE, P.; KING, L.S.; YASUI M, GUGGINO, W.B.; OTTERSEN, O.P.; FUJIYOSHI, Y.; ENGEL A. Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. **J. Physiol.** v.542, p.3–16, 2002.
- ABOU-HAÏLA, A.; FAIN-MAUREL M.A. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: Morphological and histochemical characterization. **Anat. Rec.** v.209, p.197-208, 1984.
- AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F. Raumliche Anordnung und Mikrovaskularisation der *Ductuli efferentes testis* vom Bullen (*Bos Taurus*). **Anat. Histol. Embryol.** v.20, p.139–151, 1991.
- ALMEIDA, F. N.; ROUQUAYROL, M. Z. **Introdução à epidemiologia**, 2002.
- ANJOS, L.A. Obesidade e Saúde Pública. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**. 100 pp. ISBN: 85-7541-082-2, 2006.
- ARAUJO, A. C. F.; BALBO, S. L.; RIBEIRO, R. A.; BONFLEUR M. L.; de FREITAS, A. C. T. Duodenal-Jejunal by-pass surgery enhances glucose tolerance and beta-cell function in western diet obese rats. **Obes. Surg.** v.22, p. 819.826, 2012.
- ARAUJO, A. C. F. Efeitos da derivação duodenojejunal em ratos wistar portadores de obesidade induzida pela dieta de cafeteria [**Tese de Doutorado**]. Curitiba, Paraná, Universidade Federal do Paraná UFPR, 2009.
- ARRIGHI, S.; ARALLA, M.; GENOVESE, P.; PICABEA, N.; BIELLI, A. Undernutrition during foetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats. **Therio.** v.74, p.1661-1669, 2010.
- BADRAN, H.H.; HERMO, L.S. Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. **J. Androl.** v.23, p.358–373, 2002.
- BANDEIRA, F. Endocrinologia e Diabetes. Rio de Janeiro: **Medsa**, 2003.
- BARSH, G. S.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Genetics of body-weight regulation. **Nature**, v.404, n.6778, p.644-651, 2000.
- BEAULIEU, V.; DA SILVA, N.; PASTOR-SOLER, N.; BROWN, C.R.; SMITH, P.J.; BROWN, D.; BRETON, S. Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H⁺-ATPase recycling. **J. Biol. Chem.** v.280, p.8452–8463, 2005.
- BEDFORD, J.M. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. **J. Exp. Zool.** v.163, p.319-329, 1966.

BEITZ, E.; SCHULTZ, J.E. The mammalian aquaporin water channel family: A promising new drug target. **Curr. Med. Chem.** v.6. p.457–467, 1999.

BELLEANNÉE, C.; DA SILVA, N.; SHUM, W.W.; BROWN, D.; BRETON, S. Role of purinergic signaling pathways in V-ATPase recruitment to apical membrane of acidifying epididymal clear. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** v.298, p.C817–C830, 2010.

BEU, C.C.L. Características estruturais e bioquímicas e segmentos epididimários do hamster dourado *Mesocricetus auratus*. [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

BEU, C.C.L.; ORSI, A.M.; DOMENICONI, R.F.; NOVELLI, E.L.B. Localization of total proteins and lactate dehydrogenase in hamster epididymis. **Int. J. Morphol.** v.25,(2): p.259-264, 2007.

BEU, C.C.L.; ORSI, A.M.; DOMENICONI, R.F. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the Golden hamster. **Anat. Histol. Embryol.** v.38(1): p.49-57, 2009.

BILINSKA, B.; WISZNIEWSKA, B.; KOSINIAK-KAMYSZ, K.; KOTULA-BALAK M.; GANCARCZYK M, HEJMEJ, A.; SADOWSKA, J.; MARCHLEWICZ, M.; KOLASA, A.; WENDA-ROZEWICKA L. Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. **Reprod. Biol.** v.6 (Suppl 1), p.43–58, 2006.

BORGNIA, M.; NILSEN, S.; ENGEL, A.; AGRE, P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. **Annu. Rev. Biochem.** v.68, p.425–458, 1999.

BOUCHARD, C.; DESPRÉS, J.P. Variation in fat distribution with age and health implications. **Am. Acad. Physical. Educ.** v.22, p78-106, 1989.

BOUCHARD, C. The genetics of human obesity: recent progress. **Bulletin et Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique**, v. 156, n. 10-12, p. 455-464, 2001.

BOWMAN, T. S.; KURTH, T.; SESSO, H. D.; MANSON, J. E.; GAZIANO, J. M. Eight-year change in body mass index and subsequent risk of cardiovascular disease among healthy non-smoking men. **Preven. Med.** v. 45, n. 6, p. 436-441, 2007.

BRAY, G.A. Obesity and reproduction. **Hum. Reprod.** v.12(Suppl. 1): p.26-32, 1997.

BRETON, S.; SMITH, P.J.; LUI, B.; BROWN, D. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. **Nat. Med.** V.2, p.470–472, 1996.

- BROOKS, D.E. Activity and androgenic control of glycolytic enzymes in the epididymis and epididymal spermatozoa of the rat. **Biochem. J.** v.156, p.527–537, 1976.
- BROWN, D; VERBAVATZ, J. M.; VALENTI, G.; LUI, B.; SABOLIC, I. Localization of the CHIP28 water channel in reabsorptive segments of the rat male reproductive tract. **Eur. J. Cell. Biol.** V.61, p.264–273, 1993.
- DA SILVA, N.; PIETREMENT, C.; BROWN, D.; BRETON, S. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1758, p.1025–1033, 2006.
- CESARETTI, M.L.; KOHLMANN JUNIOR, O. Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v.50(2), p.190-7. 2006.
- CHANG, C.; SALTZMAN, A.; YEH, S.; YOUNG, W.; KELLER, E.; LEE, H.J.; WANG, C.; MIZOKAMI, A. Androgen receptor: an overview. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.** v.5, p.97–125, 1995.
- CHATURAPANICH, G.; JONES, R. C. Morphometry of the epididymis of the Tammar wallaby, *Macropus eugenii*, and estimation of some physiological parameters. **Reprod. Fertil.** v. 3, p.651–658, 1991.
- CHRISTENSEN, A.K.; MASON, N.R. Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of rat testes to synthesize androgens from progesterone-4-14C *in vitro*. **Endoc.** v.76, p.646-656, 1965.
- CLARKE, I.J.; CUMMINS, J.T. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. **Endoc.** v.111, p.1737-1739, 1982.
- CLERMONT, Y.; HARVEY, S.C. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. **Endoc.** v.76, p.80-89, 1965.
- CLULOW, J.; JONES, R.C.; HANSEN, L.A.; MAN, S.Y. Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. **J. Reprod. Fertil.** v.53, p.1–14, 1998.
- CONN, P.M. The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary. In: *The Physiology of Reproduction*. 2nd edn. (Knobil, E. & Neill, J.D., eds.) p. 1815-1832. **Raven Press**, New York, 1994
- CORNWALL, G. A.; LAREYRE, J. J.; MATUSIK, R. J.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. C. Gene expression and epididymal function. In: *Robaire B, Hinton BT, eds. The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. New York, NY: **Kluwer Academic/Plenum Publishers**. P.169–199, 2002.
- COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição Malnutrition and obesity in

Brazil: dealing with the problem through. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. Sup 2, p. S332-S340, 2008.

CUNNINGHAM, G.R.; HUCKINS, C. Persistence of complete spermatogenesis in the presence of low intratesticular concentrations of testosterone. **Endoc.** v.105, p.177-186, 1979

CYR, D.G.; GREGORY, M.; DUBE, E.; DUFRESNE, J.; CHAN, P.T.; HERMO, L. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. **Asian. J. Androl.** v.9, p.463–475, 2007.

CYR, D.G.; ROBAIRE, B.; HERMO, L. Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. **Microsc. Res. Tech.** v.30, p.54–66, 1995.

DACHEUX, J.L.; PAQUIGNON, M. Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. **Reprod. Nutr. Dev** v.20, p.1085–1099, 1980.

DANZO, B.J.; COOPER, T.G.; ORGEBIN-CRIST, M.C. Androgen binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymidis of sexually mature and immature rabbits and observations on morphological changes in the epididymis following ligation of the ductuli efferentes. **Biol. Reprod.** v.17, p.64–77, 1977.

DJAKIEW, D.; JONES, R. C. Stereological analysis of the epididymis of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*, and Wistar rat. **Aust. J. Zool.** v.30, p.865–875, 1982.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Morphological features of the epididymal epithelium of gerbil, *Meriones unguiculatus*. **Tissue Cell.** v.39, p.47-57, 2007a.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; JUSTULIN, L.A.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Aquaporin 9 (AQP9) localization in the adult dog testis excurrent ducts by immunohistochemistry. **Anat. Rec.** v.290, p.1519-1525, 2007b.

DOMENICONI, R.F.; ORSI, A.M.; JUSTULIN, L.A.; BEU, C.C.L.; FELISBINO, S.L. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. **Cell. Tissue. Res.** v.39, p.47-57, 2008.

DOMINGUES FILHO, L. A. Obesidade e atividade física. SÃO PAULO: **Fontoura**, 2000.

DUBÉ, E.; CHAN, P.T.; HERMO, L.; CYR D.G. Gene expression profiling and its relevance to the blood–epididymal barrier in the human epididymis. **Biol. Reprod.** v.76, p.1034–1044, 2007.

EDDY, E.M.; WASHBURN, T.F.; BUNCH, D.O.; GOULDING, E.H.; GLADEN, B.C.; LUBAHN, D.B.; KORACH K.S. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in

male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endoc.** v.137, p.4796–4805, 1996.

ESTADELLA, D. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutri.** v.20(2), p.218-24. 2004.

EZER, N.; ROBAIRE, B. Gene expression is differentially regulated in the epididymis after orchidectomy. **Endoc.** v.144, p.975–988, 2003.

FABER, P.W.; KING, A.; VAN ROOIJ, H.C.; BRINKMANN, A.O.; DE BOT, H N.J.; TRAPMAN, J. The mouse androgen receptor. Functional analysis of the protein and characterization of the gene. **Biochem. J.** v.278 (Pt 1), p.269-78, 1991.

FAN, X.; ROBAIRE, B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. **Endocrinology.** v.139, p.2128–2136, 1998.

FAWCETT, D.W.; HOFFER, A.P. Failure of exogenous androgen to prevent regression of the initial segments of the rat epididymis after efferent duct ligation or orchidectomy. **Biol. Reprod.** v.20, p.162–181, 1979.

FEDERICA, R. Public health policy, evidence, and causation: lessons from the studies on obesity, **Med. Health Care and Philos.** v.15, p.141–151, 2012.

FISHER, J.S.; MILLAR, M.R.; MAJDIC, G.; SAUNDERS, P.T.K.; FRASER, H.M.; SHARPE, R.M. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha (ERalpha) within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. **J. Endocrinol.** v.153, p.485–495, 1997.

FLEGAL, K. M.; CARROLL, M. D.; OGDEN, C. L.; JOHNSON, C. L. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **The J. of the A. Med. Ass.** v. 288, n. 14, p. 1723-1727, 2002.

FLICKINGER, C.J.; BUSH, L.A.; HOWARDS, S.S.; HERR, J.C. Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. **Anat. Rec.** v.248, p.380–390, 1997.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSOVALE, M. I.; LIMA, F. B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J. of Ped.**, v. 83, Supl. 5, p. 192-203, 2007.

FRANCISCHI, R.P.; KLOPFER, M.; PEREIRA, L.O.; CAMPOS, P.L.; SAWADA, L.A.; SANTOS, R. Efeito da intensidade da atividade física e da dieta hipocalórica sobre consumo alimentar, a composição corporal e a colesterolemia em mulheres obesas. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** v.14, p.1-8, 1999.

FRANCO, M.; ORDUNEZ, P.; CABALLERO, B.; TAPIA GRANADOS, J. A.; LAZO, M.; BERNAL, J. L; GUALLAR COOPER, R. S. Impact of energy intake, physical activity, and population-wide weight loss on cardiovascular disease and diabetes mortality in Cuba, 1980-2005. **A. J. of Epid.**, v.166, n.12, p.1374-1380, 2007.

- FRENETTE, G.; GIROUARD, J.; SULLIVAN, R. Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis. **Biol. Reprod.** v.75, p.885–890, 2006.
- FRENETTE, G.; LESSARD, C.; SULLIVAN, R. Polyol pathway along the bovine epididymis. **Mol Reprod Dev.** v.69, p.448–456, 2004.
- GIAGULLI, V.A.; KAUFMAN, J.M.; VERMEULEN, A. Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v.79, p.997-1000, 1994.
- GOYAL, H.O.; ROBATEAU, A.; BRADEN, T.D.; WILLIAMS, C.S.; SRIVASTAVA, K.K.; ALI, K. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. **Biol. Reprod.** v.68, p.2081-2091, 2003.
- GUEDES, D. P. Programas de controle de peso corporal: Atividade física e nutrição. **Rev. Min. Educ. Fís.** v.10, n.1, p.62-98, 2002.
- GUYONNET, B.; MAROT, G.; DACHEUX, J.L.; MERCAT, M.J.; SCHWOB, S.; JAFFREZIC, F.; GATTI, J.L. The adult boar testicular and epididymal transcriptomes. **BMC Genomics.** v.10, p.369, 2009.
- HAFFNER, S.M.; VALDEZ, R.A.; STERN, M.P.; KATZ, M.S. Obesity, body fat distribution and sex hormones in men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* v.17, p.643-649, 1993.
- HAMMOUD, A.O.; GIBSON, M.; PETERSON, C.M.; MEIKLE, A.W.; CARRELL, D.T. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. **Fert. Steril.** v.90(4), p.897-904, 2008a.
- HAMMOUD, A.O.; WILDE, N.; GIBSON, M.; PARKS, A.; CARRELL, D.T.; MEIKLE, A.W. Male obesity and alteration in sperm parameters. **Fert. Steril.** v.90 (6), p.2222-2225, 2008b.
- HAMZEH, M.; ROBAIRE, B. Androgens activate mitogen-activated protein kinase via epidermal growth factor receptor/insulin-like growth factor 1 receptor in the mouse PC-1 cell line. **J. Endocrinol.** v.209, p.55–64, 2011.
- HAMZEH, M.; ROBAIRE, B. Identification of early response genes and pathway activated by androgens in the initial segment and caput regions of the regressed rat epididymis. **Endoc.** v.151, p.4504–4514, 2010.
- HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A.S. Physiological roles of glyceroltransporting aquaporins: the aquaglyceroporins. **Cell Mol. Life Sci.** v.63, p.1386–1392, 2006.
- HE, B.; KEMPPAINEN, J.A.; VOEGEL, J.J.; GRONEMEYER, H.; WILSON, E.M. Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. **J. Biol. Chem.** v.274, p.37219–37225, 1999.

HEINLEIN, C.A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocr. Rev.** v.23, p.175–200, 2001.

HERMO, L.; ADAMALI, H.I.; ANDONIAN, S. Immunolocalization of CA II and H₊ V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. **J. Androl.** v.21, p.376–391, 2000.

HERMO, L.; KRZECZUNOWICZ, D.; RUZ, R. Cell specificity of aquaporins 0, 3, and 10 expressed in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats. **J. Androl.** v.25, p.494–505, 2004.

HERMO, L.; DWORKIN, J.; OKO, R. Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. **Am. J. Anat.** v.183, p.107–124, 1988.

HERMO, L.; ROBAIRE, B. The epididymis: from molecules to clinical practice. **Plenum Press**, New York, 2002.

HERMO, L.; SMITH, C.E. Thirsty Business: Cell, Region and Membrane Specificity of Aquaporins (AQPs) in the Testis, Efferent Ducts and Epididymis and Factors Regulating Their Expression. **J. Androl.** March, 25, 2011.

HESS, R.A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Rev. Reprod.** v.5, p.84–92, 2000.

HESS, R. A. Efferent ductules: structure and functions. In *The Epididymis from Molecules to Clinical Practice* (B. Robaire and B. T. Hinton, Eds.), pp. 49–80. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, New York, 2002.

HESS, R.A.; BUNICK, D.; BAHR, J.M. Sperm, a source of estrogen. **Environ Health Perspect.** v.103 (Suppl 7), p.59–62, 1995.

HESS, R.A.; BUNICK, D.; LEE, K.H.; BAHR, J.; TAYLOR, J.A.; KORACH, K.S.; LUBAHN, D.B. A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature** v.390, p.509–512, 1997a.

HESS, R.A.; GIST, D.H.; BUNICK, D.; LUBAHN, D.B.; FARRELL, A.; BAHR, J.; COOKE, P.S.; GREENE, G.L. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the efferent ducts of the adult male rat reproductive tract, **J. Androl.** v.18, p.602–611, 1997b.

HESS, R.A.; ZHOU, Q.; NIE, R.; OLIVEIRA, C.; CHO, H.; NAKAIA, M.; CARNES, K. Estrogens and epididymal function. **Reprod. Fertil. Dev.** v.13, p.273–283, 2001.

HINTON, B.; TURNER, T. Is the epididymis a kidney analogue? **News Physiol. Sci.** v.3, p.28–31, 1988.

HINTON, B.T.; HOWARDS, S.S. Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. **J. Reprod. Fertil.** v.63, p.95–99, 1981.

HINTON, B.T.; PALLADINO, M.A.; RUDOLPH, D.; LAN, Z.J.; LABUS, J.C.; The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. **Curr. Top. Dev. Biol.** v.33, p.61-102, 1996.

HU, F.C.W.; VON ECKARDSTEIN, A. Androgens and coronary artery disease. **Endocr. Rev.** v.24, p.183-217, 2003.

ILIO K.Y., HESS R.A. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. **Microsc. Res. Tech.** v.29, p.432-467, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa nacional por amostra de domicílios (PNAD 2008), um panorama da Saúde no Brasil: acesso e utilização dos serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde. Rio de Janeiro: **IBGE**, 2010.

ISHIBASHI, K.; KUWAHARA, M.; GU, Y.; KAGEYAMA, Y.; TOHSAKA, A.; SUZUKI, F.; MARUMO, F. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. **J. Biol. Chem.** v.272, p.20782-20786, 1997.

ISHIBASHI, K.; KUWAHARA, M.; KAGEYAMA, Y.; SASAKI, S.; SUZUKI M, IMAI M. Molecular cloning of a new aquaporin superfamily in mammals: AQPX1 and AQPX2. In Hohmann S, Nielsen S, eds. *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*. New York, **Kluwer Academic/Plenum Publishers**. p.123-126, 2000.

ISNARD-BAGNIS, C.; DA SILVA, N.; BEAULIEU, V.; YU, A.S.; BROWN, D.; BRETON, S. Detection of CIC-3 and CIC-5 in epididymal epithelium: immunofluorescence and RT-PCR after LCM. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.** v.284, p.220-232, 2003.

JANNE, O.A.; MOILANEN, A.M.; POUKKA, H.; ROULEAU, N.; KARVONEN, U.; KOTAJA, N.; HAKLI, M.; PALVIMO, J.J. Androgen-receptor-interacting nuclear proteins. **Biochem. Soc.** v.28, p.401-405, 2000.

JELINSKY, S.A.; TURNER, T.T.; BANG, H.J.; FINGER, J.N.; SOLARZ, M.K.; WILSON, E.; BROWN, E.L.; KOPF, G.S.; JOHNSTON, D.S. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. **Biol. Reprod.** v.76, p.561-570, 2007.

JOHNSTON, D.S.; JELINSKY, S.A.; BANG, H.J.; DICANDELO, P.; WILSON, E.; KOPF, G.S.; TURNER, T.T. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. **Biol Reprod.** v.73, p.404-413, 2005.

JOHNSTON, D.S.; TURNER, T.T.; FINGER, J.N.; OWTSCHARUK, T.L.; KOPF, G.S.; JELINSKY, S.A. Identification of epididymis-specific transcripts in the mouse and rat by transcriptional profiling. **Asian J. Androl.** v.9, p.522-527, 2007.

- JONES, R.C.; JURD, K. M. Structural differentiation and fluid reabsorption in the ductuli efferents testis of the rat. **Aust. J. Biol. Sci.** v.40, p.79-90, 1987.
- JONES, R.C.; MURDOCH, R.N. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. **Reprod. Fertil.** v.8, p.553–568, 1996
- JOSEPH, A.; SHUR, B.D.; HESS, R.A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. **Biol. Reprod.** v.84, p.207–217, 2011.
- KAUNISTO, K.; PARKKILA, S.; PARKKILA, A.K.; WAHEED, A.; SLY, W.S.; RAJANIEMI, H. Expression of carbonic anhydrase isoenzymes IV and II in rat epididymal duct. **Biol. Reprod.** v.52, p.1350–1357, 1995.
- KING, L.S.; AGRE, P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. **Annu. Rev. Physiol.** v.58, p.619–648, 1996.
- KING, L.S.; KOZONO, D.; AGRE, P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v.5, p.687–698, 2004
- KORDON, C.; DROUVA, S.V.; MARTINEZ DE LA ESCALERA, G.; WEINER, R.I. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. In: The Physiology of Reproduction, 2nd edn. (Knobil, E. & Neill, J.D., eds.) p.1621-1681. **Raven Press**, New York, 1994
- LAMB, D.J.; WEIGEL, N.L.; MARCELLI, M. Androgen receptors and their biology. **Vitam. Horm.** v.62, p.199–230, 2001.
- LEE, K.H.; HESS, R.A.; BAHR, J.M.; LUBAHN, D.B.; TAYLOR, J.; BUNICK, D. Estrogen receptor α has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. **Biol. Reprod.** v.63, p.1873-1880, 2000
- LEVINE, N.; MARSH, D.J., Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats, **J. Physiol.** v.213, p.557–570, 1971.
- LI, J.; NIELSEN, S.; DAI, Y.; LAZOWSKI, K.W.; CHRISTENSEN, E.I.; TABAK, L.A.; BAUM, B.J. Examination of rat salivary glands for the presence of the aquaporin CHIP. **Pflugers Arch.** v.428, p.455–460, 1994.
- LIU, M.M.; ALBANESE, C.; ANDERSON, C.M.; HILTY, K.; WEBB, P.; UHT, R.M.; PRICE, J.R.; PESTELL, R.G.; KUSHNER, P.J; Opposing action of estrogen receptors α and β on cyclin D1 gene expression. **J. Biol. Chem.** v.277, p.24353-24360, 2002.
- LUBAHN, D.; JOSEPH, D.; SULLIVAN, P.; WILLARD, H.; FRENCH, F.; WILSON, E. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. **Science.** v.240(4850), p.327-30, 1988.

McCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. Fisiologia do exercício. 4^a edição, Rio de Janeiro, **Ed. Guanabara Koogan**, 1998.

MANEELY, R. B. Epididymal structure and function: a historical and critical review. **Acta Zool.** v.40, p.1–21, 1959.

MARENGO, S.R.; AMANN, R.P. Morphological features of principal cells in the ovine epididymis: a quantitative and qualitative study. **Biol. Reprod.** v.42, p.167–179, 1990.

MARILIA, T.C.C.; ERICK J. R. S.; MARIA, C.W. A. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.53, p.8, 2009.

MARSHALL, J.C.; DALKIN, A.C.; HAISENLEDER, D.J.; PAUL, S.J.; ORTOLANO, G.A.; KELCH, R.P. Gonadotropin releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. **Recent. Prog. Horm.** v.47, p.155-189, 1991.

MARTINEZ, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.59, p.3, p.337-345, 2000.

MATSUMOTO, T.; SHIINA, H.; KAWANO, H.; SATO, T.; KATO, S. Androgen receptor functions in male and female physiology. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v.109(3-5), p.236-41, 2008.

McNAMARA, D.J.; HOWELL, W.H. Epidemiologic data linking diet to hyperlipidemia and arteriosclerosis. **Semin. Liver Dis.** v.12, p.347-355, 1992.

MEGUID, M.M. et al. A surgical rat model of human Roux-en-Y gastric bypass. **J. Gastrointest. Surg.** V.8(5): p.621-30. 2004.

MOLINATTI, G.M.; LIMONE, P. Obesity: a challenge for the clinician. **Frontiers in Diabetes**, v.11, p.7-15, 1992.

MONTFORT, L.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Sperm-zona pellucidainteraction involves a carbonyl reductase activity in the hamster. **Mol. Reprod.** v.61, p.113–119, 2002.

MOORE, H. D. M.; BEDFORD, J. M. The differential absorptive capacity of epithelial cells of the rat epididymis before after castration. **Anat. Rec.** v.193, p.313-328, 1979.

MORISHITA, Y.; SAKUBE, Y.; SASAKI, S.; ISHIBASHI, K. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. **J. Pharmacol. Sci.** v.96, p.276–279, 2004.

MOURÃO-CARVALHAL. O papel da actividade física no combate à obesidade. **Actividade, Física Saúde e Lazer: Modelos de Análise e Intervenção.** p.287-297. Lidel – Edições Técnicas, Lda, 2008.

NAHAS, M. V. Atividade física, saúde e qualidade de vida: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo. 2. Ed. Londrina: **Midiograf**, 2001.

NAKANE, P.K. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. **J. Histochem. Cytochem.** v.18, p.9-21, 1970

NASHAN, D.; MALORNY, U.; SORG, C.; COOPER, T.; NIESCHLAG, E. Immuno-competent cells in the murine epididymis. **Int. J. Androl.** v.12, p.85–94, 1989.

NONOGAKI, T.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; SHIOTANI, M.; MORI, T.; MATSUDA, T.; YOSHIDA, O. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. **Hum. Reprod.** v.7, p.81–85, 1992.

ORGBIN-CRIST, M.C. Sperm maturation in rabbit epididymis. **Nature.** v.216, p.816-818, 1976.

PAGE, E.; WINTERFIELD, J.; GOINGS, G.; BASTAWROUS, A.; UPSHAW-EARLEY, J. Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae: osmolarity-dependent reversible internalization. **Am. J. Physiol.** v.274, p.1988–2000, 1998.

PASQUALI, R.; PELUSI, C.; GENGHINI, S.; CACCIARI, M.; GAMBINERI, A. Obesity and reproductive disorders in women. **Hum. Reprod. Update.** v.9: p.1-14, 2003.

PASTOR-SOLER, N.; BAGNIS, C.; SABOLIC, I.; TYSZKOWSKI, R.; MCKEE, M.; VAN HOEK, A.; BRETON, S.; BROWN, D. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. **Biol Reprod.** v.65, p.384–393, 2001.

PASTOR-SOLER, N.; BEAULIEU, V.; LITVIN, T.N.; DA SILVA, N.; CHEN, Y.; BROWN, D.; BUCK, J.; LEVIN, L.R.; BRETON, S. Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. **J. Biol. Chem.** v.278, p.49523–49529, 2003.

PASTOR-SOLER, N.M.; FISHER, J.S.; SHARPE, R.; HILL, E.; VAN HOEK, A.; BROWN, D.; BRETON, S. Aquaporin 9 expression in the developing rat epididymis is modulated by steroid hormones. **Reproduction.** v.139, p.613–621, 2010.

PEGO-FERNANDES, P. M.; BIBAS, B. J.; DEBONI, M. Obesity: the great est epidemic of the 21st century? **Sao Paulo Med J.** v.129, n.5, p. 283-4, 2011.

PI-SUNYER, F. X. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. **Obesity Research**, v.10, Suppl.2, p.97-104, 2002.

PRESTON, G.M.; AGRE, P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.88, p.11110–11114, 1991.

PRESTON, G.M.; CARROLL, T.P.; GUGGINO, W.B.; AGRE, P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein, **Science.** v.256, p.385–387, 1992.

REPETTO, G.; RIZOLLI, J.; BONATTO, C. Prevalência, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: Here, There and Everywhere. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.47, n.6, p.633-635, 2003.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. Efferent ducts, Epididymis, and vas deferens: Structure, function, and their regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. et al (Eds). **The Phy. of Repro.** Raven Press, New York, p. 999-1080, 1988.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. The epididymis. In: Neill JD (ed.), **Phy. of Repro.**, v.1, 3rd ed. p.1071–1148, 2006.

RODRIGUES, A.M.; SUPLICY, H.L.; RADOMINSKI, R.B. Controle Neuroendócrino do Peso Corporal: Implicações na Gênese da Obesidade. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.47, n.4, p.398-409, 2003.

ROJEK, A.M.; SKOWRONSKI, M.T.; FUCHTBAUER, E.M.; FUCHTBAUER, A.C.; FENTON, R.A.; AGRE, P.; FROKIAER, J. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.104, p.3609–3614, 2007.

RONALD, S.; SWERDLOFF, CHRISTINA, W.; AMIYA, P.S. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in men. **Hormones. Brain and Behavior**, v.5, 2002.

ROTH, M.Y.; AMORY, J.K.; PAGE, S.T. Treatment of male infertility secondary to morbid obesity. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.** v.4, p.415-419, 2008.

SEEBURG, P.H.; ADELMAN, J.P. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. **Nature.** v.311, p.666-668, 1984.

SEILER, P.; COOPER, T.G.; YEUNG, C.H.; NIESCHLAG, E. Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors. **J. Androl.** v.20, p.738–746, 1999.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Segment-Specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis. **Biol. Reprod.** v.58, p.497-513, 1998.

SERRE, V.; ROBAIRE, B. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. **Biol. Reprod.** v.61, p.705–714, 1999.

HANAHAN, C.M.; CONNOLLY, D.L.; TYSON, K.L.; CARY, N.R.; OSBOURN, J.K.; AGRE, P.; WEISSBERG, P.L. Aquaporin-1 is expressed by vascular smooth muscle cells and mediates rapid water transport across vascular cell membranes. **J. Vasc. Res.** v.36, p.353–362, 1999.

SHUM, W.W.; DA SILVA, N.; BROWN, D.; BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **J. Exp. Biol.** v.212, p.1753–1761, 2009.

SHUM, W.W.; DA SILVA, N.; MCKEE, M.; SMITH, P.J.; BROWN, D.; BRETON, S. Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. **Cell**. v.135, p.1108–1111, 2008.

SITORIUS, M. Obesidad. **Medicina de Familia: Principios y Práctica**. 5ª ed. España. Ed. Springer-Verlag Ibérica, p.488-493, 1998.

SNYDER, E.M.; SMALL, C.L.; LI, Y.; GRISWOLD, M.D. Regulation of gene expression by estrogen and testosterone in the proximal mouse reproductive tract. **Biol. Reprod.** v.81, p.707–716, 2009.

STEMBERGER, L.A.; HOFFMAN, G.E. Immunocytology of luteinizing hormone-releasing hormone. **Neuroendoc.** v.25, p.111-125, 1978.

STYNE, D.M. Childhood and adolescent obesity: prevalence and significance. **Ped. Clin. NA**. v.48, p.823-854, 2001.

SUN, E.L.; FLICKINGER, C.J. Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. **Am. J. Anat.** v.154, p.27–55, 1979.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; THOMPSON, W.E.; SCHATTEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **J. Cell. Sci.** v.114, p.1665–1675, 2001.

TAKANO, H.; ABE, K.; ITO, T. Changes in the mouse epididymis after ligation of the ductuli efferentes or proximal epididymal duct: qualitative and quantitative histological studies [author's translation]. **Kaibogaku Zasshi**. v.56, p.79–90, 1981.

TAN, J.A.; JOSEPH, D.R.; QUARMBY, V.E.; LUBAHN, D.B.; SAR, M.; FRENCH, F.S. The rat androgen receptor: primary structure, autoregulation of its messenger ribonucleic acid, and immunocytochemical localization of the receptor protein. **Mol. Endocrinol.** v.2(12), p.1276-1285, 1988.

TEIXEIRA, C.V.; SILANDRE, D.; SANTOS, A.M.S.; DELALANDE, C.; SAMPAIO, F.J.B.; CARREAU, S.; RAMOS, C.F. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. **J. Endocrinol.** v.192, p.301-311, 2007.

THIMON, V.; KOUKOU, O.; CALVO, E.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. **Mol. Hum. Reprod.** v.13, p.691–704, 2007.

TSUKAGUCHI, H.; SHAYAKUL, C.; BERGER, U.V.; MACKENZIE, B.; DEVIDAS, S.; GUGGINO, W.B.; VAN HOEK, A.N. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. **J. Biol. Chem.** v.273, p.24737–24743, 1998.

TURNER, T.T. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. **J. Androl.** v.16, p.292–298, 1995.

TURNER, T. T.; GLEAVY, J. L.; HARRIS, J. M. Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. **J. Androl.** v.11, p.422–428, 1990.

TURNER, T.T.; CESARINI, D.M. The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone, **J. Androl**, v.4, p.197–202, 1983.

TURNER, T.T.; JOHNSTON, D.S.; FINGER, J.N.; JELINSKY, S.A. Differential gene expression among the proximal segments of the rat epididymis is lost after efferent duct ligation. **Biol. Reprod.** v.77, p.165–171, 2007.

TURNER, T.T.; BOMGARDNER, D.; JACOBS, J.P.; NGUYEN, Q.A. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. **Reprod.** v.125, p.871–878, 2003.

ULLOA-AGUIRRE, A.; TIMOSSI, C. Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. Reproductive **Biomed. Online.** v.1, p.48–62, 2000.

VAN HOEK, A.N.; VERKMAN, A.S., Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28, **J. Biol. Chem.** v.267, p.18267–18269, 1992.

VAN OS, C.H.; KAMSTEEG, E.J.; MARR, N.; DEEN, P.M. Physiological relevance of aquaporins: luxury or necessity? **Pflugers. Arch.** v.440, p.513–520, 2000.

VERI, J.P.; HERMO, L.; ROBAIRE, B. Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. **J. Androl.** v.14, p.23–44, 1993.

VERKMAN, A.S. Novel roles of aquaporins revealed by phenotype analysis of knockout mice. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** v.155, p.31–55, 2005.

VERKMAN, A.S.; MITRA, A.K. Structure and function of aquaporin water channels. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** v.278, p.F13–28, 2000.

VERMEULEN, A.; KAUFMAN, J.M.; GOEMAERE, S.; VAN POTTELBERG, I. Estradiol in elderly men. **Aging Male.** v.5: p.98-102, 2002.

VERNET, P.; AITKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.216, p.31–39, 2004.

VIERULA, M.E.; RANKIN, T.L.; ORGEBIN-CRIST, M.C. Electron microscopic immunolocalization of the 18 and 29 kilodalton secretory proteins in the mouse epididymis: evidence for differential uptake by clear cells. **Microsc. Res. Tech.** v.30, p.24–36, 1995.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E.N.; TRINDADE, M.R. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta. Cir. Bras.** v.21(6), p.425-429. 2006.

VON LANZ, T.; NEUHAUSER, G. Morphometrische Analyse des menschlichen Nebenhodens. **Z. Anat. Entwickl.** v.124, p.126–152, 1964.

WANG, S.; JONES, R. C.; CLULOW, J. Surface area of apical and basolateral plasmalemma of epithelial cells of ductuli efferentes testis of the rat. **Cell. Tissue. Res.** v.276, p.581–586, 1994.

WANG, F.; FENG, X.; LI, Y.; YANG, H.; MA, T. Aquaporins as potential drug targets. **Acta. Pharmacol. Sin.** v.27, p.395–401, 2006.

WEST, D.B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am. J. Clin. Nutr.** v.67(3 Suppl), p.505S-512S. 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity – preventing and managing the global epidemic. Geneva: **Report of a WHO Consultation on Obesity**, 1998.

WHO. Obesity and overweight. Geneva: **World Health Organization**, 2004.

WHO. Preventing chronic diseases: a vital investment. Geneva: **World Health Organization**, 2005.

YASUI M. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: structure and function of aquaporins. **J. Pharmacol. Sci.** v.96, p.260–263, 2004.

YEUNG, C.H.; COOPER, T.G. Aquaporin AQP1 in the testis: molecular identity and associated with the processing of residual cytoplasm of elongated spermatids. **Reprod.** v.139, p.209-216, 2010.

ZARDOYA, R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. **Biol Cell.** v.97, p.397–414, 2005.

ZEIDEL, M.L.; AMBUDKAR, S.V.; SMITH, B.L.; AGRE, P., Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein, **Biochem.** v.31, p.7436–7440, 1992.

ZHANG, J.S.; LIU, Q.; LIYMHALL, S.H.; FRENCH, F.S.; ZHANG, Y.L. Genomewide profiling of segmental-regulated transcriptomes in human epididymis using oligo microarray. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.250, p.169–177, 2006.

ZHOU Q., CLARKE L., NIE R., CARNES K., LAI L.W., LIEN Y.H., VERKMAN A., LUBAHN D., FISHER J.S., KATZENELLENBOGEN B.S., HESS R.A. Estrogen action and male fertility: roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98:14132–14137, 2001.

ZHOU, Q.; NIE, R.; PRINS, G.S.; SAUNDERS, P.T.; KATZENELLENBOGEN, B.S.; HESS, R.A. Localization of Androgen and Estrogen Receptors in Adult Male Mouse Reproductive Tract. **J. Androl.** v.23, p.870-881, 2002.

7- ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos possibilitaram elaborar o artigo “OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA AFETA PARAMETROS MORFOMÉTRICOS E EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS 1 E 9 NOS DUCTOS EFERENTES E EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR.”

Submetido ao periódico Anatomia, Histologia e Embryologia.

**OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA AFETA
PARAMETROS MORFOMÉTRICOS E EXPRESSÃO DE
AQUAPORINAS 1 E 9 NOS DUCTOS EFERENTES E
EPIDÍDIMO DE RATOS WISTAR.**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brasil.

Obesity induced by cafeteria diet affects morphometric parameters and expression of aquaporins 1 and 9 in the efferent ducts and epididymis of Wistar rats.

L. E. Ferreira^{1*}, M. Bernardi², A. C. F. Araujo², R. F. Domeniconi³, C. C. L. Beu².

Addresses of authors: ¹Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, Jardim Universitário, 1619, 85819-110, Campus Cascavel, Cascavel, PR, Brasil; ²Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná; ³Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 186180-000 Distrito de Rubião Junior, Botucatu, SP, Brasil; *Corresponding author: Tel: +55 (45) 99240845; email: leonardo.edufer@gmail.com, bkleo@hotmail.com

With 5 figures and 4 tables

Abstract

The induction of obesity, using a cafeteria diet in animal experiments, is a good tool to study the biological processes that are affected by obesity. The aim of this study was to evaluate the effects of obesity on the morphology and expression of AQP- 1 and AQP- 9 in the epithelia of the efferent and epididymal ducts. The animals were randomly divided into two groups: control (CON), which received a standard diet and water *ad libitum* (n = 10) up to 52 weeks of life; and the cafeteria group (CAF), which received a cafeteria diet plus Bauducco® chocolate wafer biscuits and/or Frytbel® bacon flavor snacks and/or Renata® vanilla and chocolate flavor cake, on a daily basis, with degassed refrigerant, *ad libitum* (n = 10). The treatment with the cafeteria diet started after the 12th week of life; all animals were killed at 52 weeks. The efferent ducts and epididymis were collected and were processed histologically in paraffin and subsequently subjected to immunohistochemical reactions for AQPs 1 and 9, histochemical reactions with periodic acid-Schiff (PAS), and hematoxylin/eosin (H/E) for morphological and morphometric analyses of luminal diameter and epithelial height, as well as the relative distribution of the principal cells basal, apical, clear and halo of the initial segment (Si), head (Cç), body (Co) and tail (Cd) of the epididymis. The results showed greater intensity of reaction of AQP1 in the epithelium of the efferent ducts, and lower intensity of reaction of AQP 9 in the epithelium of the epididymal tail of the animals in the CAF group. Changes were also observed in the epididymal epithelium, including an increase in the number and size

of the halo and clear cells; clear cell protrusion into the lumen; and an increase in positive endocytic organelles. These changes can cause a profound impact on the luminal environment and interfere with the processes of maturation, maintenance and protection of spermatozoa, with consequences for reproduction and fertility.

Keywords: Obesity, cafeteria diet, via sperm, reproductive biology, AQP1 and AQP9.

Introduction

Obesity is an organic disorder that is now considered to be an epidemic; its incidence has increased greatly, virtually across the planet, during the last 20-30 years. It is a heterogeneous disorder that can develop cardiovascular disease, dyslipidemia, cancer and it can also affect fertility (Bowman et al., 2007; Franco et al., 2007; Roth et al., 2008). The latter factor merits attention because the ratio of the proportion between obesity and men in the reproductive period tripled over the last three decades (National Center of Health Statistics, 2010).

Several studies have linked obesity and compromised spermatozoa and/or semen quality, based on analysis of the concentration, motility, morphology and chromatin integrity of spermatozoa (Jensen et al., 2004; Fejes et al., 2005; Magnusdottir et al., 2005; Kort et al., 2006; Qin et al., 2007; Pauli et al., 2008; Chavarro et al., 2009; Bakos et al., 2010; Attaman et al., 2012).

It is known that the integrity of the morphology and the function of the epididymis is androgen-dependent; it is an important factor in the regulation of the epididymal epithelium and promoting the regulation of different proteins, glycoproteins, glycolipids and phospholipids, as well as epididymal fluid components that are necessary for the basic processes of via sperm (Robaire and Hermo, 1988; Viguera-Villasenor., 2011). The epididymis is a single, highly coiled duct that connects the efferent ducts to the vas deferens and its main functions are: to receive immature sperm from the testis; and to carry, mature, protect and store the sperm in the vas deferens until ejaculation (Bedford 1966; Orgebin-Crist, 1976). Most of the fluid (50-90%) from the seminiferous tubules and rete testis is reabsorbed in the efferent ducts, which increases the concentration of spermatozoa by about 25 times (Levine et al., 1971; Turner et al., 1983; Clulow et al., 1998). The process of reabsorption in the efferent and epididymal ducts takes the sperm to maturation because it allows the efficient interaction of products secreted by the principal cells,

as well as the absorption of content present in the lumen for them, and moves the fluid with the participation of essential proteins, such as carbonic anhydrase, $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase and AQPs. (Robaire and Hermo, 1988; Cornwall et al, 2002; Hess et al , 2002; Pastor-Soler et al., 2002; Verkman, 2005; Oliveira et al., 2013).

The present study assessed the effects of obesity induced by a cafeteria diet on the efferent and epididymal ducts.

Materials and Methods

Experimental animals

All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments and Practical Classes (CEEAAP), Protocol No 44/09 and recorded in the Minutes no. 072009 of the State University of Western Paraná (UNIOESTE), accredited with the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), which is consistent with the ethical principles in animal experimentation adopted by the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL).

Wistar rats from the central vivarium at UNIOESTE were kept under light (12 hours light/dark cycle) and controlled temperature ($26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) in the vivarium sector of the Endocrinology Laboratory of the Center of Biological and Health Sciences at UNIOESTE. After weaning (4 weeks), the animals received standard feed and water *ad libitum* for eight weeks. The animals were then randomly divided into two groups: a) control (CON, $n = 10$), which received standard feed and water *ad libitum*, and b) cafeteria (CAF, $n = 10$), which were fed on a cafeteria diet plus Bauducco® chocolate wafer biscuits and/or Frytbel® bacon flavor snacks and/or Renata® vanilla and chocolate flavor cake, on a daily basis, with degassed refrigerant, *ad libitum*. At 52 weeks of age the animals in both groups were anesthetized in a CO_2 chamber and then decapitated in a guillotine. The testis and epididymis were collected bilaterally, and then reduced to the efferent ducts, initial segment, head, body and epididymal tail, and fixed in 10% formalin solution.

Cafeteria diet

The cafeteria diet consisted of modified feed pellets, with the following ingredients: 37.5% standard feed, 25% roasted peanuts, 25% chocolate bar and 12.5%

cornstarch wafer. Some additional foods such as Bauducco® chocolate wafer biscuits, and/or Frytbel® bacon flavor snacks, and/or Renata® vanilla and chocolate flavor cake, and degassed Antarctica® guaraná soft drink were offered to this group every day.

Table 1 - Composition of standard diet and cafeteria diet:

Composition	Standard Diet	Cafeteria Diet
Carbohydrate	70%	38.5%
Protein	20%	15%
Fat	10%	46.5%
Calorific value	3.8 kcal/g	5.4 kcal/g

Processing of samples

Tissue samples from the efferent ducts and epididymal segments were fixed in 10% formalin and kept in 70% alcohol; they were subsequently processed according to routine histological techniques for paraffin embedding. After dehydration in ascending alcohol series and diaphanization in xylene, the samples were embedded in paraffin and sectioned using semi-sections cuts in a Leica RM2245 microtome, 5 mm thick. They were then rapidly immersed in 30% aqueous ethanol, followed by immersion in a water bath ($47^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) for distention, and subsequently dried in an oven ($37^{\circ}\text{C} \pm 2$) for 12 h. These sections were mounted on silanized slides and intended for immunohistochemical reactions. The histological sections that were designed for morphological and morphometric analysis were sectioned at 6 mm thickness and were subsequently rapidly immersed in 30% aqueous ethyl alcohol, then immersed in a water bath ($47^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) for distention, and subsequently dried in an oven ($37^{\circ}\text{C} \pm 2$) for 12 h. The slides were stained with hematoxylin/eosin (H/E) or subjected to the histochemical reaction of periodic acid-Schiff (PAS) for morphological analysis.

Immunohistochemistry

AQP-1 and AQP-9

The expression of AQP-1 and AQP-9 in the efferent ducts and epididymal segments were investigated by immunohistochemical reactions. The sections were subjected to antigen retrieval, in which the slides, kept in sodium citrate buffer (pH 6.0), were placed in a microwave oven, three times (5 minutes each), washed with phosphate

buffered saline (PBS, pH 7.4 , 0.1 M) and blocked with bovine serum albumin (BSA) and H₂O₂ solution 0,3% to block endogenous peroxidase. The slides were incubated overnight in a humid chamber with the following primary antibodies: anti-AQP1 (Anti-Aquaporin 1, Rabbit polyclonal Lot: LV1567591, AB2219, Millipore Inc., Billerica, Massachusetts, USA) diluted 1:200; and anti-AQP9 (Anti-aquaporin, Anti-Rat AQP9 - Cat #AQP91-a, AFF, Pure Lot #3232^a 8.1, Lyophilized, Alpha Diagnostic Intl. Inc., Woodlake Center, San Antonio, USA) diluted 1:100. After washing in PBS, incubation was performed in a biotinylated secondary antibody (Anti-Rabbit IgG whole-molecule Biotin produced in goat, Spruce Street, St. Louis, Missouri, USA) diluted 1:70, for 1 hour at 37 °C, followed by washing in PBS and revelation with DAB. The slides were mounted with Permount® (Merck, Darmstadt, Germany) and analyzed using Olympus® Bx 60 and Zeiss Primo Star light microscopes.

Analysis of corporeal parameters

The animals were weighed at the 12th week of life and at the 52nd week, (date of death). The abdominal circumference and the naso-anal length were also measured on the date of death in order to calculate the Lee index. This index was calculated by dividing the cube root of body weight (g) by naso-anal length (cm) and multiplying the result by 1000. The retroperitoneal and perigonadal fats were individualized, and then evaluated for the percentage of weight in relation to the body weight of the animals at the time of death.

$$\frac{\sqrt[3]{P(g)}}{CNA(cm)} \times 1000$$

Morphological and morphometric analyses

The measurements of the luminal height and epithelial diameter of the efferent ducts and epididymal segments, as well as the quantification of the cell types of the epididymal segments, were made in 10 random sections of five animals from group CON and five animals from group CAF, using the Axivision Rel 4.3.2 Program and Image Pro Plus 6 software.

Statistical analysis

Data distribution was assessed using the D'Agostino-Pearson omnibus test. Data with normal distribution were compared by Student's t-test, and data with free distribution was compared using the Mann-Whitney test. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation using the GraphPad Prism 5.00 software.

Results

Analyses of bodily dimensions. The results showed that the cafeteria diet was effective in inducing obesity, noted by a significant increase in body mass at the end of 52 weeks in the animals from group CAF (Table 1).

Table 2 - Data of mean body mass (at the 12th week and the 52nd week of age), naso-anal length, abdominal circumference, Lee index and percentage of retroperitoneal and perigonadal fats in relation to the body weight of the animals in groups CON and CAF.

Parameters	CON (n=10)	CAF (n=10)
Body mass (g) - 12 weeks	389 $\pm$ 4.0	358 $\pm$ 5.2*
Body mass (g) - 52 weeks	488 $\pm$ 6.2	607 $\pm$ 21*
Naso-anal length (cm)	26.2 $\pm$ 0.2	26.1 $\pm$ 0.3
Abdominal circumference (cm)	20.4 $\pm$ 0.8	24.5 $\pm$ 0.6*
Lee index	301.0 $\pm$ 2.5	324.3 $\pm$ 3.6*
Retroperitoneal fat (%) €	1.18 $\pm$ 0.08	4.98 $\pm$ 0.27*
Perigonadal fat (%) €	1.34 $\pm$ 0.06	2.63 $\pm$ 0.13*

(€) Retroperitoneal and perigonadal fats presented in % relative to body mass.

Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. (*) Significantly different values, $p < 0.05$.

Quantitative analyses of the epithelia of the efferent and epididymal ducts.

Epithelial height. The results of the morphometric studies related to the epithelial height are shown in Figure 1. They show a significant reduction in the height of the epithelium of the initial segment, and the epididymal body and tail, of the animals in group CAF in relation to the animals in group CON. On the other hand, the data relating to the epithelial height of the efferent ducts and the epididymal head of the animals in the CAF group indicated that there was no statistically significant difference when compared with the results of the animals in the CON group (Fig. 1).

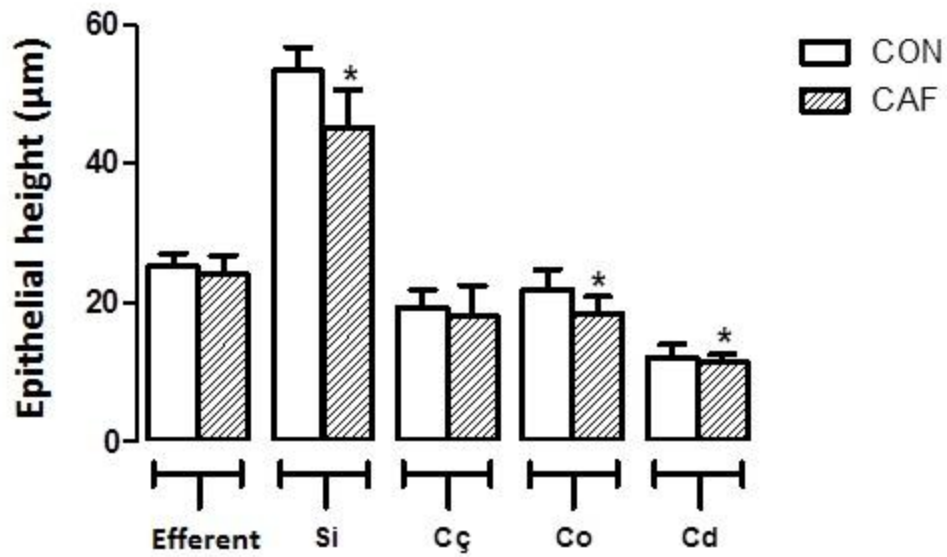


Figure 1 - Epithelial height of the efferent ducts (n = 3), (Si) initial segment, (Cç) head, (Co) body and epididymal (Cd) tail (n = 5). Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. (*) Significantly different values, $p < 0.05$.

Luminal diameter. The analysis results showed that only the efferent ducts of the animals from the CAF group had significant difference relative to the CON group (Fig. 2). There were no statistical differences in both experimental groups for the other segments (Fig. 2).

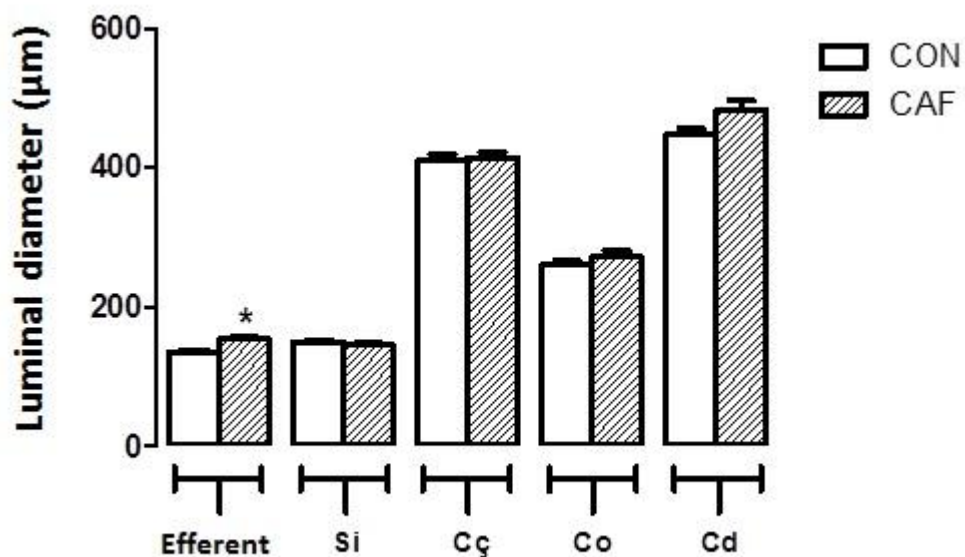


Figure 2 - Luminal diameter of the efferent ducts (n = 3), (Si) initial segment, (Cç) head, (Co) body and epididymal (Cd) tail (n = 5). Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. (*) Significantly different values, $p < 0.05$.

Relative distribution of cell types. The analysis of data relating to the distribution of principal, basal, apical, clear and halo cells in the formation of the epididymal epithelium showed a predominant distribution of principal cells in all segments of both the animal groups, with a lower contribution of other cell types (Figs. 3A-3D). The relative contribution of clear cells in the formation of the epithelium increased significantly in the distal segments of both groups (Figs. 3A-3D). In the region of the epididymal tail, in addition to the increase in the relative distribution of the clear and halo cells, a concomitant significant reduction in the principal cells of animals in the CAF group was observed (Fig. 3D). The analyses showed the following: a significant increase in halo cells in the head, body and epididymal tail (Figs. 3B-3D); a significant increase in clear cells, only in the body and tail segments (Figs. 3C and 3D); and a significant reduction in basal cells in the epididymal head of animals in the CAF group (Fig. 3B).

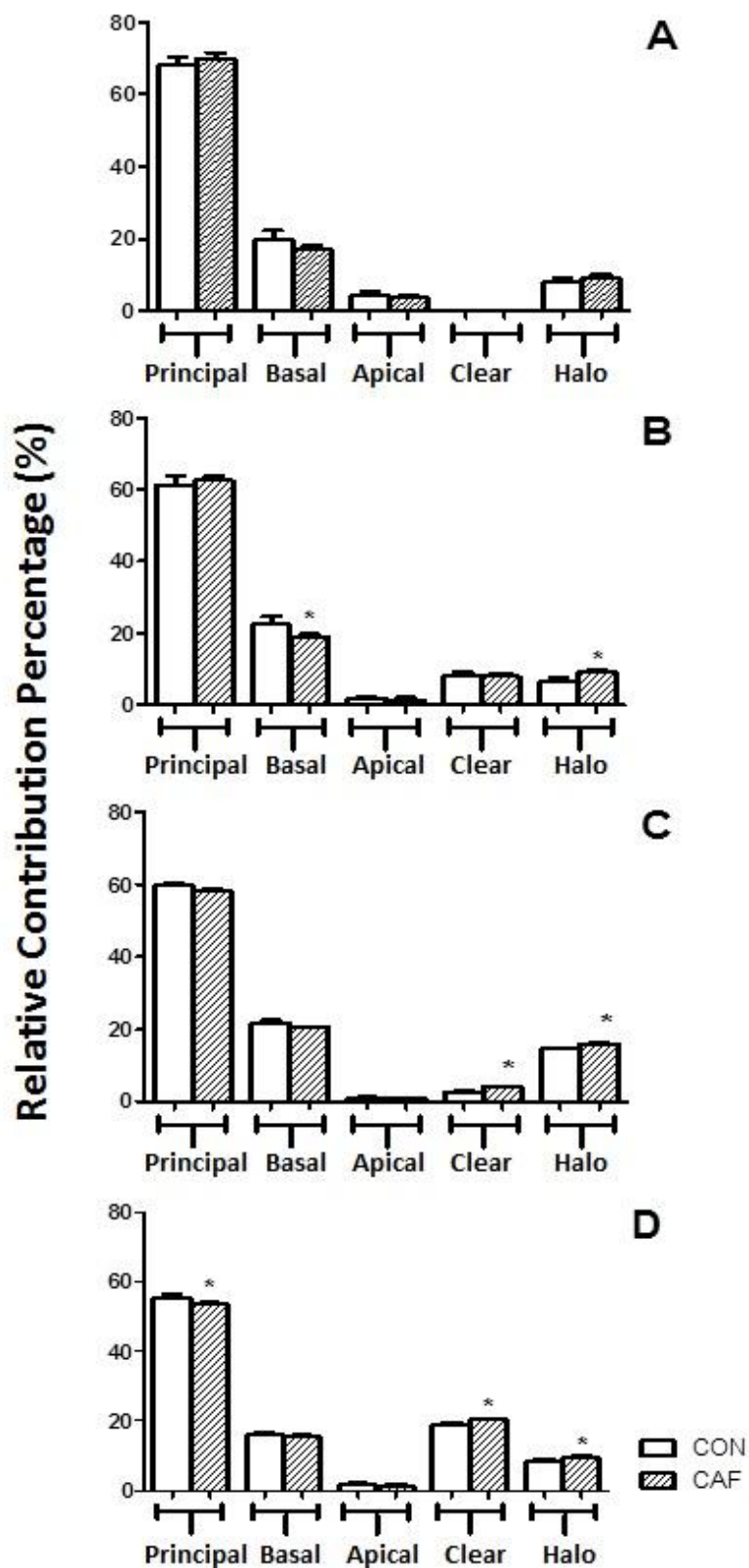


Figure 3 - Relative distribution of principal, basal, apical, clear and halo cells in the initial segment (3A), head (3B), body (3C) and epididymal tail (3D) of animals CAF x CON (% of total). Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. (*) Significantly different values, $p < 0.05$.

Qualitative analyses of epithelia of efferent and epididymal ducts.

Immunolocalization of AQP-1 in the efferent ducts. The results of the immunolocalization of the efferent ducts showed that AQP-1 was expressed in the epithelium of the animals of both groups (Figs. 4A and 4B), but with marked difference in intensity; the most intense expression was observed in the efferent ducts of CAF animals (Table 3, Figs. 4A and 4B). In the epithelial cells of the efferent ducts of CON animals, the intensity of the reaction ranged from weak to moderate in the apical membrane of the non-ciliated cells and it was weak in the basolateral membranes of the non-ciliated cells (Figs. 4A and 4C). In the epithelium of the efferent ducts of the CAF animals, the expression of AQP-1 was intense in the apical membrane, whereas in the basolateral membrane of the non-ciliated cells the intensity varied from strong to intense (Figs. 4B and 4D). Immunolocalization of AQP-1 in the vacuoles of non-ciliated cells was observed in the efferent ducts of both groups (Figs. 4C and 4D).

Table 3 - Expression of AQP-1 in the efferent ducts of CON and CAF animals*

	CON	CAF
	AQP1	
Non-ciliated cells	+/++	+++ (¥)
Ciliated cells	-	-
Cells of the vascular channels	++	+++

* The amount of signals is proportional to the intensity of the immunohistochemical reaction: (+) weak, (+/++) weak to moderate, (++) moderate, (+++) strong, and (-) absence of marking.

(¥) Intense marking in the apical membrane, and from strong to intense in the basolateral membrane.

Immunolocalization of AQP-1 and AQP-9 in the epididymis. No reaction was observed for AQP-1 in the epididymal epithelium in the initial segment, as well as in other regions of the epididymis, of both groups (Table 3). However, along the whole length of the epididymis and the efferent ducts, intense reactions were observed in the endothelial cells of the vascular channels of the CAF animals (Fig. 4B, Table 4).

The results of the immunolocalization of AQP-9 in the epididymal ducts showed that there were differences in intensity between the groups, with reactivity ranging from weak to moderate in both groups in the initial segment, head and epididymal body, and with less intense reactivity in the epididymal segments of the CAF animals (Table 3). In the distal region of the epididymal tail there was a reduction in the

intensity of the marking of the clear cells, as well as less intense marking in the stereocilia of the CAF animals (Figs. 4E and 4F).

Table 4 - Expression of AQP-1 and AQP-9 in the epididymis of the CON and CAF animals*

Cellular Types	AQP1						AQP9					
	CON			CAF			CON			CAF		
	P	C	CV	P	C	CV	P	C	CV	P	C	CV
Si	-	NP	+ / ++	-	NP	+++	+ / ++	NP	-	+	NP	-
Cç	-	-	++	-	-	+++	+	+	-	+	+	-
Co	-	-	++	-	-	+++	+	+	-	+	+	-
Cd	-	-	++	-	-	+++	+++	+++	-	+	+	-

* The amount of signals is proportional to the intensity of immunohistochemical reaction: (+) weak, (+ / ++) weak to moderate, (++) moderate, (+++) strong, and (-) absence of marking. P, principal cell C, clear cell, CV, the endothelial cells of the vascular channels, Si, initial segment; Cç Head Co, body, and Cd, epididymal tail. NP indicates the absence of cell type in the region.

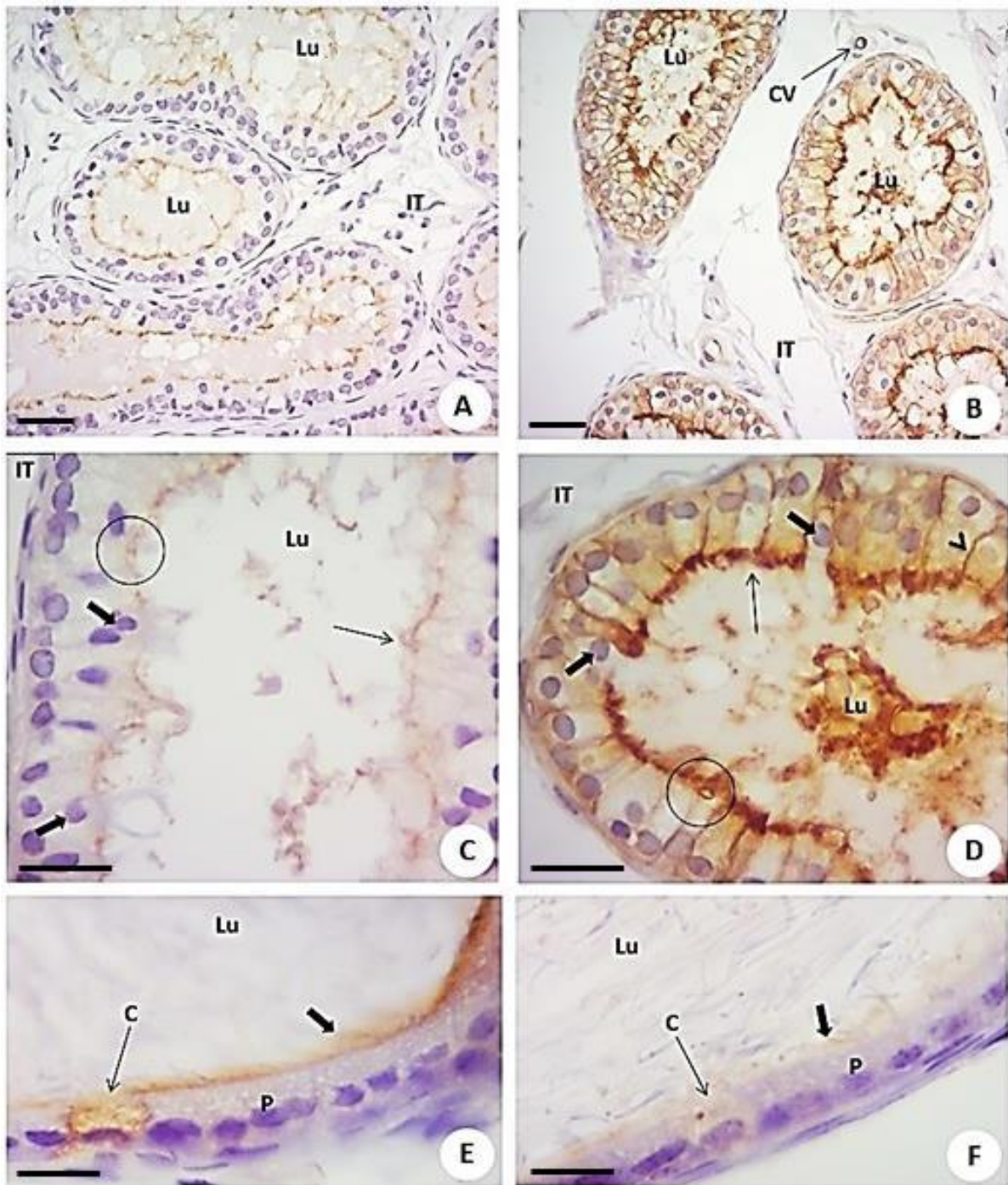


Figure 4 - Photomicrographs of the immunolocalization of AQP1 in the efferent ducts (**4A-4D**) and AQP9 in the epididymal tails (**4E-4F**) in Wistar rats. The following are indicated: the lumen (Lu), interstitium (IT) and vascular channels (VC) of the efferent ducts (**4A-4D**), and the lumen of the epididymal tail of the experimental animals (**4E-4F**); ciliated cells (thick arrow) and the weak to moderate reactions in the apical membrane (arrow), and weak reactions in the basolateral membrane of the non-ciliated cells; reactivity in the apical vacuoles of the of non-ciliated cells (circle) of the animals (**4C**); ciliated cells (thick arrow) and intense positive reaction in the apical and basolateral membranes of the non-ciliated cells (arrow) and reactivity in the vacuoles at the apex of the non-ciliated cells (circle) of the CAF animals (**4D**); principal cells (P), clear cells (C) and stereocilia (thick arrow) with intense reactivity in the epithelium of the epididymal tail (**4E**); principal cells (P), clear cells (C) and stereocilia (thick arrow) with weak reactivity in the epithelium of the epididymal tail (**4F**). Hematoxylin counterstain. Bar = 20 micrometres (**4A-4B**); Bar = 10 μ m (**4C-4F**).

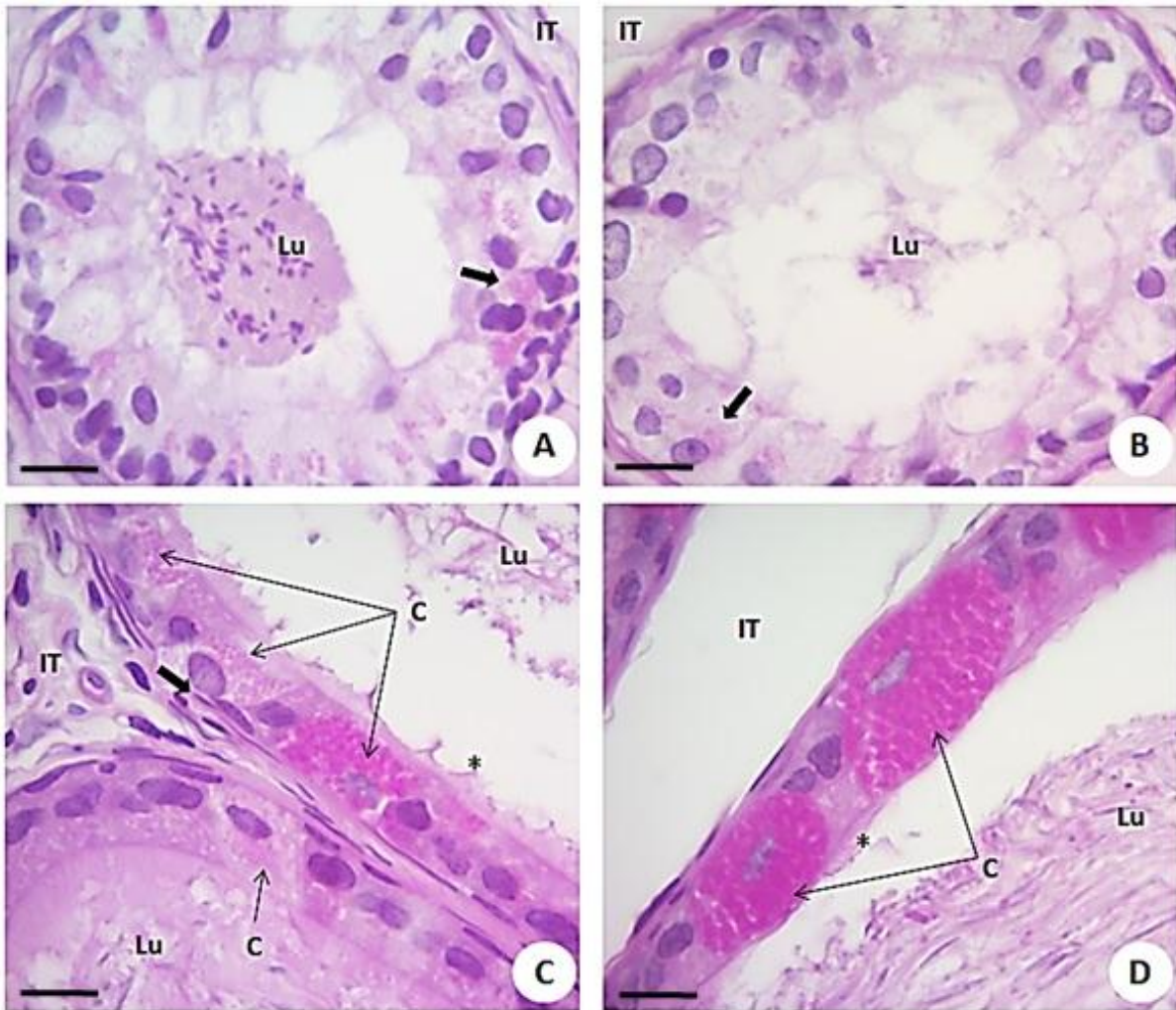


Figure 5 - Photomicrographs of the efferent ducts (**5A and 5B**) and the epididymal tails of Wistar rats (**5C and 5D**). The following are indicated: the lumen (Lu), and interstitium (IT) of the efferent ducts (**5A and 5B**) and of the epididymal tail (**5C and 5D**); PAS-positive reactive endocytic organelles (thick arrows) in the efferent ducts of the Wistar rats in the CON group (**5A**) and the CAF group (**5B**), clear cells (C), PAS-positives in the epididymal tail of animals in the CON group (**5C**) and the CAF group (**5D**); stereocilia (*) of the principal cells of the CON animals (**5C**) and the CAF animals (**5D**). PAS. Scale bar, 10 micrometers.

Reactivity to PAS. The analysis of the efferent ducts of the CAF animals showed a lower PAS-positive reactivity in the endocytic organelles dispersed in the apical region of the epithelial cytoplasm (Figs. 5A and 5B). The immunohistochemistry for PAS showed changes in all the epididymal segments of the CAF animals. Stereocilia clusters were observed with irregular, heterogeneous distribution and lower height in the epididymal head and tail compared to the CON animals (Figs. 5C and 5D). It was also possible to observe a greater amount of endocytic organelles, possible lysosomes in the cytoplasm of the light cells, along the proximal tail of the CAF animals; protrusions of the apical membrane of these clear cells were also observed (Figs. 5C and 5D).

Discussion

Obesity rates have increased rapidly and have now reached levels that cause concern in both developed and developing countries (Yang et al., 2005). This increase in obesity is due, among other factors, to the intake of foods with high concentrations of sugars and fats, and reduced consumption of foods rich in fiber and complex carbohydrates; the essential features of a cafeteria diet (Monteiro et al., 1995; Popkin et al., 2001).

Obesity causes systemic effects, including consequences for reproductive processes. Studies on obesity carried out in humans can present divergent data due to differences in lifestyles and individual behaviors (Bakos et al., 2011). Consequently, experimental models of obesity in rodents are good tools for studying biological processes related to its development. The model of diet-induced obesity is particularly desirable because obese rodents and humans have similar characteristics of obesity, including polygenic inheritance and hormonal changes (Vigueras-Villasenõr et al., 2011).

The cafeteria diet used in the present study (West et al., 1998; Estadella et al., 2004; Prada et al., 2005; Cesaretti et al., 2006; Von Diemen et al., 2006), resulted in an increase in body mass, characterized by the results of the Lee index and abdominal circumference ($p < 0.05$). The large accumulation of visceral fat, especially retroperitoneal and perigonadal fats, indicated that the induction of obesity by this diet helped, in large part, to produce changes in the energy metabolism of the CAF animals, who exhibited insulin resistance and pre-disposition to type II diabetes mellitus (Araujo et al., 2009, 2012).

The diet-induced obesity in the rats resulted in DNA-damaged sperm; reduced sperm motility and fertilization capacity; increased reactive oxygen species (ROS) (Bakos et al., 2011; Fernandez et al., 2011); apoptosis of the epididymal epithelium; and apoptotic bodies in the lumen (Vigueras-Villasenõr et al., 2011). Despite these findings, morphological studies linking obesity induced by cafeteria diet and reproductive processes are scarce.

The set of ducts that form the via sperm (rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens), is divided into luminal and epithelial compartments. In the latter, the constituents change as the fluid is moved through the efferent ducts, passing

through the epididymal segments and reaching the vas deferens. Thus, the formation and change in the luminal fluid, in which the spermatozoa are immersed, depends on the integrity of the epithelium and processes of absorption and secretion by the epithelia of the efferent and epididymal ducts (Oliveira et al., 2013; Robaire and Viger, 1995; Robaire and Hermo, 1988). Such changes are important to ensure that there is transportation, concentration, maturity, protection, storage, and maintenance to ensure the availability of sperm (Robaire and Hermo, 1988).

Trasler et al. (1988) were the first to use the quantitative assessment of different cell types in the epididymis of rats as a tool for evaluating morphologic changes in experimental conditions. The results presented in this present study, relating to the relative distribution of different types of epithelial cells, indicate that obesity affected the epithelial in a specific cell-segment way, shown by the significant differences observed for the distribution of basal and halo cells in the epididymal head and tails; the distribution of principal cells decreased only in the epididymal tails of the CAF animals. Trasler et al. (1988) reported significant changes in the distribution of principal and clear cells in the tail, and halo cells in the epididymal head, of animals treated with cyclophosphamide. Serre and Robaire (1998) studied aging in rats and they also reported segment-specific changes in the distribution of epithelial cells, which showed changes in all the epididymal segments and all the cell types of the studied animals. It is interesting to note that clear and halo cells are the types that suffer most change, in a segment-specific manner, even in different experimental treatments (Trasler et al., 1988; Serre and Robaire, 1998); a fact that was confirmed by the present study. Trasler et al. (1988) defined them as subtle changes, because they did not occur in a generalized way throughout the epididymis; similar to the results obtained in the present study. Although they are subtle, it is believed that these changes could significantly affect the physiology of the body and the quality of luminal contents, mainly affecting the function of storage, since the greatest change in the distribution of cell types occurred in the epididymal tail.

The increase in the relative contribution of halo cells in all the epididymal segments, except in the initial segment, of the CAF animals, can be considered to be a specific change. This type of cell increases in experimental conditions, such as treatment with cyclophosphamide (Trasler et al., 1998), androgen deprivation (Moore and Bedford, 1979a), and studies of aging (Serre and Robaire, 1998). The increase in halo cells, attributed to the apparent activation of the immune system, suggests

that this cell originates from lymphocytes and monocytes that are activated by macrophages, which migrate to the epithelium (Serre and Robaire, 1998). The position of the halo cells, close to the lumen, among the other epithelial cells, suggests that their lysosomal contents originate from the luminal material cell which reaches this cell by transcytosis (Serre and Robaire, 1998). The findings of the present study are due to increases in the amount of intraluminal cellular debris, which, in turn, are due to the change in androgens as a result of obesity; increased cellular debris was reported in chimpanzees that were deprived of androgens (Smithwick and Young, 2001). It is also not possible to rule out a relationship between the increase in halo cells and the activation of the immune system as a direct consequence of obesity, because obesity is a chronic inflammatory condition of low intensity, which produces cytokines and/or adipocytokines through adipose tissue (Lopes, 2007.)

The results related to the halo cells obtained in this study and other reports (Moore and Bedford, 1979a; Trasler et al., 1988; Serre and Robaire, 1998; Flickinger et al., 1990; Smithwick and Young, 2001) indicate that this cell type is a reliable parameter with which to study the effects of experimental conditions and/or treatments regarding the morphology of the epididymal epithelium.

The clear cells were also modified; they were distended and with large inclusion bodies in the CAF animals. Clear cells have also shown changes in different experimental conditions, such as castration (Moore and Bedford, 1979b), vasectomy (Flickinger, 1972), treatment with cyclophosphamide (Trasler et al., 1988) and cyproterone (Flickinger, 1976) and studies of aging (Serre and Robaire, 1998). In these studies, the clear cells showed changes in their functional capacity, number and morphology and included the following: protruding into the lumen (Serre and Robaire, 1998; Trasler et al., 1988); generally distended and with large vacuoles containing membranous material (Flickinger, 1972); increased lysosomes (Flickinger, 1976, 1977); and with changed absorptive capacity (Moore and Bedford, 1979b). Organelles which are characteristic of endocytic activity, such as lysosomes, vesicles, vacuoles, endosomes and multivesicular bodies, of clear cells, indicate a specialized role for endocytosis (Moore and Bedford, 1979b; Robaire and Hermo, 1988). This functional role supports the hypothesis that in the epididymis of the CAF rats, these cells probably increase, in number and volume, to make endocytosis of cellular debris, which occurs in adverse conditions (Flickinger, 1972, 1976; Trasler et

al. 1988; Smithwick and Young, 2001), as well as normally making endocytosis of the contents of the cytoplasmic droplet (Robaire and Hermo, 1988).

The analyses of epithelial height in the present study also indicated that obesity affected the epithelium of the initial segment, body and tail of the epididymal duct. Moore and Bedford (1979) reported that there was a regression in the epithelial height of the epididymal head and tail in rats, due to androgen deprivation following castration. TMF^{-/-} mice have exhibited morphological defects in the testes and epididymis, and apoptosis of epididymal cells, due to reduced serum concentrations of androgens (Elkis et al., 2013). The development, structure and function of the epididymis is androgen-dependent, so that when there is an androgen deficiency there is a decrease in size and a change in function of the epididymis. Chimpanzees deprived of androgen showed minor changes in the ciliated cells of the efferent ducts, with reduced epithelial height and general reduction of the epithelium along the epididymis. This reduction was primarily attributed to cytoplasmic regression, and secondarily to the degradation of the nucleus of the principal cells (Smithwick and Young, 2001). In the present study, in addition to the reduction in epithelial height, cellular disorganization, stereocilia loss, and changes similar to those reported in other species where androgen deprivation occurred (Setty et al., 1977; Rajalakshmi, 1990; Kaur et al., 1991; Goyal, 1994) were observed. Diet-induced obesity in rodents causes imbalance of the hypothalamic-pituitary-testicular axis (Vermeulen et al., 1993; Vermeulen, 1996; Castro-Fernandez et al., 2000; Hammoud et al., 2008a, b; Olivares et al., 2010; Viguera-Villasenõr et al., 2011) and has direct consequences on the concentrations of androgens; mainly testosterone (Vermeulen, 1996; Viguera-Villasenõr et al., 2011). Thus, it can be stated that the morphological results observed in the present study possibly resulted from the effects of obesity on androgens, because in the epididymis, which is an androgen-dependent organ, morphological changes were noted, which were related to the epithelial height and the distribution of cell types. Rats with diet-induced obesity had increased apoptosis and apoptotic bodies, specifically in the head of the epididymis, results that may have been related to decreased testosterone concentration or production of reactive oxygen species (ROS) (Viguera-Villasenõr et al., 2011).

The activities of reabsorption and secretion, which are essential for the formation and maintenance of the luminal environment suitable for sperm, depend on the movement of fluid and its constituents through the epithelium, which involves

essential proteins such as Na⁺ K⁺ ATPase, carbonic anhydrase and aquaporins in reabsorption (Oliveira et al., 2013; Robaire and Hermo, 1988; Pastor-Soler et al., 2002; Verkman, 2005).

AQPs 1 and AQPs 9 are expressed in the epithelial cells of the efferent and/or epididymal ducts (Arrighi et al., 2010; Badran and Hermo, 2002; Hermo and Smith, 2011; Domeniconi et al., 2007, 2008; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2013; Teixeira et al., 2012) and they exert transepithelial movements of water, glycerol and urea in the epithelium (Hermo and Smith, 2011).

The results of the present study address, for the first time, the ratio of the expression of AQPs 1 and AQPs 9 in the efferent and epididymal ducts with obesity induced by a cafeteria diet. The reactivity of AQP1 in non-ciliated cells of the efferent ducts was consistent with the literature; however, what is striking is the strong reactivity in the epithelium of the CAF animals. Undernourished rats showed no difference in reactivity for AQP1, compared to control rats (Arrighi et al., 2010). The reactivity of AQP1 in the epididymal epithelium and vascular channels, noted in the present study, is consistent with the literature data for rats (Arrighi et al., 2010; Hermo and Smith, 2011), bats (Oliveira et al., 2013) and dogs (Domeniconi et al., 2008).

The results of AQP9 reactivity in the present study are consistent with reports in the literature for rat (Badran and Hermo, 2002; Oliveira et al., 2005; Hermo and Smith, 2011) and other species, such as dogs (Domeniconi et al., 2007) and frugivorous bats (Oliveira et al., 2013), but with greater reactivity in the epithelium of the tail. The weak reactivity of AQP9 in the epithelium of the tails of the CAF animals was the most striking difference that was observed, indicating that the expression of AQP9 was affected by the obesity, which was induced by a cafeteria diet. Changes in the expression of AQP9 have been reported in natural conditions and other experimental conditions; undernourished rats showed marked differences in the expression of the epididymal body and tail (Arrighi et al., 2010). Teixeira et al. (2012) reported that UChA and UChB rats that were treated with alcohol resulted in differences in expression of AQP9, mainly in the tail, with greater reactivity in the control animals. Orchidectomy in rats (Badran and Hermo, 2002; Oliveira et al., 2005) resulted in decreased expression of AQP-9. In natural conditions, there is less expression of AQP9 in the epithelium of the tail of frugivorous bats during the regression period (Oliveira et al., 2013).

The modulation of the expression of AQP9 was initially attributed to androgens (Pastor-Soler et al., 2002; Da Silva et al., 2006); however, studies of bat epididymis (Oliveira et al., 2013) and orchidectomized animals, with linked efferent ducts and replacement of androgens and estrogens (Oliveira et al., 2005; Badran and Hermo, 2002; Hermo and Smith, 2011), suggest that AQP-9 is modulated by other luminal factors apart from androgens; thus its regulation is more complex than has been previously reported (Badran and Hermo, 2002; Belleannée et al., 2010; Oliveira et al., 2005).

The distribution pattern of AQP9 is distinct, probably due to the differences and requirement needs of the metabolites in the epididymal segments (Oliveira et al., 2013). The increased expression of AQP-9 in the epididymal tail, parallel to the increase in luminal osmolality (Cooper and Yeung, 2003), can be considered as an important mechanism for the maturation of sperm. Since there is a higher concentration of sperm in the tail, the higher expression of AQP9 may indicate that the AQP acts to maintain the hyperosmolar environment that is necessary to keep the spermatozoa quiescent (Oliveira et al., 2013). Another consideration regarding the increased expression of AQP-9 in the tail is the ratio of the functions of storage and protection of spermatozoa (Hermo and Robaire, 1988; Hermo and Smith, 2011), with high permeability to glycerol, urea, purines and other small uncharged solutes, apart from water. Thus, one possible role of AQP9, especially in the tail of the epididymis, is the transport of glycerol, a component of luminal fluid that is a substrate of energy for stored sperm (Oliveira et al., 2013). High concentrations of urea have been reported in the epididymis (Turner and Cesarini, 1983) so AQP9 must be involved in the transport of urea, removing it from the luminal environment and promoting detoxification of the latter (Oliveira et al., 2013). These functions attributed to AQP9, and its decreased expression in the tail, allow the speculation that the storage and maintenance of sperm in the CAF rats could have been impaired due to decreased transport of glycerol and the accumulation of urea in the lumen, thereby interfering in energy intake and the detoxification capacity of the luminal environment of the tail.

Thus, it is possible to infer that obesity induced by a cafeteria diet in rats, alters the expression of AQP9 in the epididymal tail; contributes to changes in the metabolic profile; alters the relative distribution of clear and halo cells; as well as promoting changes in the morphological parameters of part of the via sperm,

specifically, the efferent and epididymal ducts. The alterations in immunolocalization, and protein expression in the epithelia of the efferent and epididymal ducts, such as were observed in this study, could cause a profound impact on the luminal environment and interfere with the processes of maturation, maintenance, and protection of sperm from interference by osmolality and luminal content. Further studies are required to elucidate the specific mechanisms by which obesity induced by cafeteria diet affects the morphology and luminal environment of the via sperm, as well as influences on fertility.

Referências

- Araujo, A. C. F., S. L. Balbo, R. A. Ribeiro, M. L. Bonfleur and A. C. T. de Freitas, 2012: Duodenal-Jejunal by-pass surgery enhances glucose tolerance and beta-cell function in western diet obese rats. *Obesity Surgery*. **22**, 819-826.
- Araujo, A. C. F. Efeitos da derivação duodenojejunal em ratos wistar portadores de obesidade induzida pela dieta de cafeteria [Tese de Doutorado]. Curitiba, Paraná, Universidade Federal do Paraná UFPR, 2009.
- Arrighi, S., M. Aralla, P. Genovese, N. Picabea and A. Bielli, 2010: Undernutrition during foetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats. *Theriogenology*. **74**, 1661-1669.
- Attaman, J. A., T. I. Toth, J. Furtado, H. Campos, R. Hauser, et al. 2012: Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. *Human Reproduction*. **27**, 1466-1474.
- Bakos, H. W., M. Mitchell, B. P. Setchell and M. Lane, 2010: The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int. J. Androl*. **34**, 402-410.
- Bakos, H. W., M. Mitchell, B. P. Setchell and M. Lane, 2011: The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int. J. Androl*. **34**, 402-410.
- Bedford, J.M., 1966: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *J. Exp. Zool*. **163**, 319-329.
- Bedford, J. M. 1975: Maturation, transport, and fate of spermatozoa in the epididymis. In: (ed. by) Hamilton, D. W. and Greep, R. O.: *Handbook of physiology*, Sec. 7. Male reproductive system. American Physiological Society. Washington, D. C. **5**. 303-317.
- Belleannée, C., N. Da Silva, W.W. Shum, D. Brown and S. Breton, 2010: Role of purinergic signaling pathways in V-ATPase recruitment to apical membrane of acidifying epididymal clear. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. **298**, C817–C830.
- Bowman, T. S., T. Kurth, H. D. Sesso, J. E. Manson and J. M. Gaziano, 2007: Eight-year change in body mass index and subsequent risk of cardiovascular disease among healthy non-smoking men. *Preventive Medicine*. **45**, 436-441.
- Brow, C. R., K. I. Von Glos and R. Jones, 1983: Changes in plasma membrane glycoproteins of rat spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Cell Biol*. **96**, 256-264.
- Clulow, J., R.C. Jones, L.A. Hansen and S.Y. Man, 1998: Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. *J. Reprod. Fertil*. **53**, 1-14.
- Cornwall, G. A., J. J. Lareyre, R. J. Matusik, B. T. Hinton and M. C. Orgebin-Crist, 2002: Gene expression and epididymal function. In: Robaire B, Hinton BT, eds. *The*

Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 169–199.

Castro-Fernandez, C., A. Olivares, D. Soderlund, J.C. Lopez-Alvarenga, E. Zambrano, J.D. Veldhuis, A. Ulloa-Aguirre and J.P. Mendez, 2000: A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J. of Clin. Endo. and Metabol.* **85**, 4603–4610.

Catalano, P. M. 2009: Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction.* **140**, 365-371.

Chavarro, J. E., T. I. Toth, D. L. Wright, J. D. Meeker and R. Hauser, 2009: Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil. Steril.* **93**, 2222-2231.

Cooper, T. G., and C. H. Yeung, 2003: Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of cytoplasmic droplet. *Microscopy Research Technique.* **61**, 28-38.

Denison, F. C., K. A. Roberts, S. M. Barr and E. J. Norman, 2010: Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. *Reproduction.* **140**, 373-385.

Elkis, Y., Bel, S., T. Lerer-Goldstein, A. Nyska, D. M. Creasy, S. Shpungin and U. Nir, 2013: Testosterone deficiency accompanied by testicular and epididymal abnormalities in TMF^{-/-} mice. **365**, 52-63.

Fejes, I., S. Koloszar, J. Szollosi, Z. Zavaczki and A. Pal, 2005: Is semen quality affected by male body fat distribution? *Androl.* **37**, 155-159.

Fernandez, C. D. B., F. F. Bellentani, G. S. A. Fernandes, J. E. Perobelli, A. P. A. Favareto, A. F. Nascimento, A. C. Cicogna and W. D. G. Kempinas, 2011: Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod. Biol. and Endo.* **9**, 32-41.

Flickinger, C. J. 1972: Alterations in the fine structure of the rat epididymis after vasectomy, *Anat. Rec.* **173**, 277-300.

Flickinger, C. J. 1976: Fine structure of the testis and epididymis of rats treated with cyproterone acetate. *Am. J. Anat.* **146**, 359-384.

Flickinger, C. J. 1977: The influence of progestin and androgen on the fine structure of the male reproductive tract of the rat. II. Epididymis and sex accessory glands. *Anat. Rec.* **187**, 431-462.

Flickinger, C. J., J. C. Herr, D. Caloras, J. R. Sisak and S. S. Howards, 1990: Inflammatory changes in the epididymis after vasectomy in the Lewis rat. *Biol. Reprod.* **43**, 34-45.

Flickinger, C. J., J. C. Herr and K. L. Klotz, 1988: Immunocytochemical localization of the major glycoprotein of epididymal fluid from the cauda in the epithelium of the mouse epididymis. *Cell Tiss. Res.* **251**, 603-610.

Franco, M., P. Ordunez, B. Caballero, J. A. Tapia Granados, M. Lazo, J. L Bernal and R. S. Guallar Cooper, 2007: Impact of energy intake, physical activity, and population-wide weight loss on cardiovascular disease and diabetes mortality in Cuba, 1980-2005. *American J. of Epidemiology.* **166**, 1374-1380.

Goyal, H. O., V. Hutto and M. A. Maloney, 1994: Effects of androgen deprivation in the goat epididymis. *Acta Anatomica.* **150**, 127-135.

Hammoud, A.O., M. Gibson, C.M. Peterson, A.W. Meikle and D.T. Carrell, 2008a: Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fert. Steril.* **90(4)**, 897-904.

Hammoud, A.O., N. Wilde, M. Gibson, A. Parks, D.T. Carrell and A.W. Meikle, 2008b: Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fert. Steril.* **90 (6)**, 2222-2225.

Herak-Kramberger, C. M., I. Sabolic, M. Blanusa, J. S. P. Smith, D. Brown and S. Breton, 2000: Cadmium inhibits H⁺ ATPase-mediated acidification in the rat epididymis. *Biol. Of Reprod.* **63**, 599-606.

Hermo, L., and C. Morales, 1984: Endocytis in nonciliated epithelial cells of ductuli eferentes in teh rat. *Am. J. Anat.* **171**, 59-74.

Hermo, L., R. and Oko, C. Morales, 1994: Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturarion. *Int. Rev. Cytol.* **154**, 105-189.

Hess, R. A., 2002: Efferent ductules: structure and functions. In *The Epididymis from Molecules to Clinical Practice* (B. Robaire and B. T. Hinton, Eds.), 49–80. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Hib, J., and R. O. Ponzio, 1977: Effect of efferent duct ligation, gonadectomy and testosterone replacement on epididymal contracilly in the rat. *J. Reprod. Fert.* **50**, 327-329.

Jensen, T. K., A. M. Andersson, N. Jorgensen, A. G. Andersen, E. Carlsen, et al. 2004: Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormonesamong 1,558 Danish men. *Fertil. Steril.* **82**, 863-870.

Kaur, J., P. R. Ramakrishnan and M. Rajalakshmi, 1991: In vitro organ culture of the rhesus monkey epididymal tubules. *Contraception.* **43**, 295-303.

Kort, H. I., J. B. Massey, C. W. Elsner, D. Mitchell-Leef, D. B. Shapiro, et al. 2006: Impact of body mass index values on spem quantity and quality. *J. Androl.* **27**, 450-452.

- Lea, O. L., P. Petrusz and F. S. French, 1978: Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): A sperm coating protein secreted by rat epididymis. *Int. J. Androl.* **2** (suppl.), 592-607.
- Levine, N., and D.J. Marsh, 1971: Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J. Physiol.* **213**, 557–570.
- Lopes, F. 2007: Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. *Ver. Bras.Hipertens.* **14**, 239-244.
- Magnusdottir, K., T. Thorsterisson, S. Thorsteindottir, M. Heimisdottir and E. V. Olafsdottir, 2005: Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum. Reprod.* **20**, 208-215.
- Monteiro, C.A., 1995: Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil, in C.A. MONTEIRO. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e suas doenças. Sao Paulo: Hucitec Editor, 247- 255, 1995.
- Moore, H. D. M. 1980: Localization of specific glycoproteins secreted by rabbit and hamster epididymis. *Biol. Reprod.* **22**, 705-718.
- Moore, H. D. M., and J. M. Bedford, 1979a: Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.* **193**, 293-312.
- Moore, H. D. M., and J. M. Bedford, 1979b: The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. *Anat. Rec.* **193**, 313-328.
- National Center of Health Statistics. Health, United States, with special feature on death and dying. Hyattsville, Maylan, 2010.
- Nielsen, S., B. L. Smith, E. I. Christensen, M. A. Knepper and P. Agre, 1993: CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J. Cell. Biol.* **120**, 371–383.
- Olivares, A., J. P. Méndez, E. Zambrano, M. Cárrdenas, A. Tovar, G. Perena-Marín and A. Ulloa-aguirre, 2010: Reproductive axis function and gonadotropin. *General and Comparative Endocrinology.* **166**, 356–364.
- Oliveira R. L., G. H. Campolina-Silva, J. C. Nogueira, G. A. B. Mahecha and C. A. Oliveira, 2013: Differential expression. And seasonal variation on aquaporins 1 and 9 in the male genital system of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. **186**, 116-125.
- Oliveira, C. A., K. Carnes, L. R. França, L. Hermo and R. A. Hess, 2005: Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol. Cell.* **97**, 385-395.

Orgebin-Crist, M.C., 1976: Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature*. **216**, 816-818.

Pauli, E. M., R. S. Legro, L. M. Demers, A. R. Kunselman, W. C. Dodson, et al. 2008: Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil. Steril.* **90**, 346-351.

Pollanen, P., and T. G. Cooper, 1994: Immunology of the testicular excurrent ducts. *J. Reprod. Immunol.* **26**, 167-216.

Popkin, B. M., 2001: The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. *J. Nutr.* **131**, 871S-873S.

Qin, D. D., W. Yuan, W.J. Zhou, Y. Q. Cui, J. Q. Wu, et al. 2007: Do reproductive hormone explain the association between body mass index and sêmen quality? *Asian J. Androl.* **9**, 827-834.

Rajalakshmi, M., B. V. Kumar, P. R. Ramakrishnan and M. M. Kapur, 1990: Histology of the epididymis in men with obstructive infertility. *Androl.* **22**, 319-326.

Ritchie, A. W. S., T. B. Hargreave, K. James and G. D. Chilshom, 1984: Intraepithelial lymphocytes in the normal epididymis. A mechanism for tolerance to sperm antigen? *Br. J. Urol.* **56**, 79-83.

Robaire, B., and L. Hermo, 1988: Efferent ducts, Epididymis, and vas deferens: Structure, function, and their regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. et al (Eds). *The Physiolog of Reproduction*. Raven Press, New York, 999-1080, 1988.

Robaire, B., and R. S. Viger, 1995: Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. of Reprod.* **52**, 226-236.

Roth, M.Y. J.K . Amory and S.T. Page, 2008: Treatment of male infertility secondary to morbid obesity. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **4**, 415-419.

Setty, B. S., S. S. Riar and A. B. Kar, 1977: Androgenic control of epididymal function in rhesus monkey and rabbit. *Fertil. Steril.* **28**, 674-681.

Smithwick, E. B., and L. G. Young, 2001: Histological effects of androgen deprivation on the adult chimpanzee epididymis. *Tissue & Cell.* **33**, 450-461.

Teixeira, G. R., L. G. A. Chuffa, O. A. Martins, R. Kremer, P. F. F. Pinheiro, W. M. Junior, M. Martinez, F. E. Martinez and R. F. Domeniconi, 2012: The expression. The expression of aquaporins 1 and 9 in adult rat epididymis is perturbed by chronic exposure to etanol. *Tissue and Cell.* **44**, 47-53.

Trasler, J. M., L. Hermo and B. Robaire, 1988: Morphological changes in the epididymis of ratas treated with cyclophosphamide: A quatitativa approach. *Biol. Of Reprod.* **38**, 463-479.

Turner, T.T., and D.M. Cesarini, 1983: The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone. *J. Androl.* **4**, 197–202.

Van Furth, R. 1970: Origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice. In: Van Furth (ed.), *Mononuclear Phagocytes*. Oxford: Blackwell: 151-167.

Vermeulen, A., 1996: Decreased androgen levels and obesity in men. *Annals of Medicine*. **28**, 13–15.

Vermeulen, A., J.M. Kaufman, J.P. Deslypere and G. Thomas, 1993: Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *J. of Clin. Endo. and Metabol.* **76**, 1140–1146.

Vigueras-Villasenõer, R.M., J.C. Rojas-Castaneda, M. Cháves-Saldaña, O. Gutiérrez-Pérez, et al, 2011: Alterations in the spermatoc function generated by obesity in rats. *Acta. Histochemica*. **113**, 214–220.

Wang, Y. F., and A. E. Holstein, 1983: Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell Tissue Res.* **233**, 517-521.

Yang, A.J., H. Cui, Y. Cui, H.C. Ye and Y. Li, 2005: Effects on development of the testicle in diet- induced obesity rats. *Wei Sheng Yan Jiu*. **34**, 477–479.

9-APÊNDICE:

9.1 - Corante Hematoxilina–Eosina

Hematoxilina de Harris

- Hematoxilina 2,5g
- Álcool Absoluto 25 ml
- Alúmen de amônia ou potássio 50 g
- Água destilada 500 ml
- Óxido vermelho de mercúrio 1,25 g
- Ácido acético 20 ml

Preparo:

- Dissolver a hematoxilina em álcool, dissolver o alúmen na H₂O previamente aquecida;
- Misturar as duas soluções e aquecer até ferver;
- Adicionar o óxido de mercúrio e resfriar, mergulhando o frasco na H₂O fria;
- Adicionar à solução fria o ácido acético e filtrar.

Eosina

- Eosina Y 1 g solúvel em H₂O Destilada;
- H₂O Destilada 100 ml.

Preparo:

- Desparafinizar (Xilol III, II e I – 3 min);
- Hidratar (Xilol/álcool, álcool Absoluto III, II e I, álcool 95%, 90%, 80% e 70% de 2-3min);
- H₂O de torneira 10 min;
- H₂O Destilada 2x;
- Hematoxilina de 30 segundos a 1 minuto (padronizar);
- H₂O de torneira 10 min;
- Eosina de 5 a 7 min (padronizar);
- Lavar álcool 95%;
- Desidratar (passar na bateria de álcool e Xilol crescente).

9.2 - Reativo de Schiff

Corante:

- Levar a ebulição 200 ml de H₂O destilada e acrescentar 1g de fucsina básica;
- Agitar por 5 min;
- Deixar esfriar para 50 °C e filtrar;
- Adicionar 30 ml de HCl 1N e 3 g de metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅);
- Agitar por 1 min, acondicionar o frasco protegido da luz por 24 horas;
- Adicionar 4 g de carvão ativado, agitar por 10 min e filtrar;

- Estocar protegido da luz a 4 °C, o corante só deve ser usado após envelhecer 72 horas e dentro de um período de 2 semanas.

Água Sulfurosa: somente para o uso

- 5 ml de HCl 1N
- 5 ml de metabissulfito de Sódio 10% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$)
- 90 ml de H_2O destilada

O HCl sempre está PA (12N), para fazer 100 ml, diluir 8,3 ml em 92 ml de H_2O destilada.

Ácido periódico 0,5%:

- 0,5 g de ácido periódico em 100 ML de H_2O destilada

Preparo:

- Desparafinizar (Xilol III, II e I – 3 min);
- Hidratar (Xilol/álcool, álcool Absoluto III, II e I, álcool 95%, 90%, 80% e 70% de 2-3min);
- H_2O de torneira 10 min;
- H_2O destilada 2x;
- Lavar em ácido periódico 0,5 % por 10 min;
- Lavar em H_2O destilada;
- Passar no Reativo de Schiff por 30 min protegido da luz (cuba envolta em papel alumínio no escuro);
- Lavar 3x banhos água sulfurosa 3 min;
- Lavar H_2O torneira por 30 min;
- Hematoxilina 1 min (padronizar);
- Lavar álcool 95%;
- Desidratar.

9.3 - Tampão PBS (Salina tamponada)

- Cloreto de sódio – 9 g
- Tampão Fosfato (pH 7,2 a 7,3) - 100 ml/0,1M
- Completar para 1000 ml com H_2O destilada.

Preparo:

- Misturar Cloreto de sódio e tampão Fosfato com H_2O destilada;
- Armazenar a 4°C.

9.4 - Tampão TRIS-EDTA

- Tris-Cl - 10 ml/1M
- EDTA (pH 8.0) - 2ml/0.5M
- Completar para 1000 ml com H_2O Destilada

Preparo:

- Misturar Tris-Cl e EDTA com a H₂O destilada;
- Esterilizar no autoclave;
- Armazenar a 4°C.

9.5 - Solução de Formol 10%

- Formol 36-40% - 100 ml
- Completar para 1000 ml com H₂O Destilada

9.6 - Silanização de lâminas

Preparar 3 cubas de vidro com tampa:

- Acetona PA
- Solução APTS (Sigma A3648) a 4% em acetona
- Acetona PA
- 100 ml de Poly-L-lysina / 90 lâminas

Preparo:

- Imersão das lâminas em acetona (cuba 1) por 2 min, esgotar muito bem o excesso de acetona para não diluir a solução de APTS;
- Imersão em APTS a 4% (cuba 2) por 2 minutos, esgotar bem o excesso;
- Imersão em acetona (cuba3) por 4 vezes, esgotar bem o excesso;
- Secagem em estufa, deixar esfriar e guardá-las em caixas.

9.7 - DAB

Solução estoque: 25mg de DAB/10ml de H₂O destilada.
Preparar em frasco escuro e filtrar na hora de uso.

Preparo:

- Tampão 1000ml
- DAB (solução estoque) 24 ul
- H₂O₂ 1ul
- Lavar em H₂O corrente 5 min e H₂O destilada 3x

10- ANEXO A:

OUT-20-2009 07:32 AM SEC. DE COMPRAS-UNIOESTE 045+33242499

P. 01

**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 74680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



Estado do Paraná

Comitê de ética na experimentação animal e aulas práticas – CEEAAP/UNIOESTE

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 44/09, sob o título "EFEITO DA DERIVAÇÃO DUODENO-JEJUNAL EM RATOS WISTAR OBESOS INDUZIDOS PELA DIETA DE CAFETERIA", sob a responsabilidade de Allan Cesar Faria Araujo, tendo como período de realização início em 01/08/09 e término em 31/07/2010, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal a Aulas Práticas (CEEAAP/Unioeste) em reunião realizada em 10 de agosto de 2009, conforme Ata nº 072009.

Marechal Cândido Rondon, PR., 10/08/2009

Coordenadora do CEEAAP/Unioeste
PORTARIA Nº 2618/2008 - GRE

DRª PATRICIA BARCELLOS COSTA
Médica Veterinária
CRMV/PR 07950

11-ANEXO B:

Author Guidelines

NIH Public Access Mandate

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, [please visit our policy statement](#)

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Submission of Manuscripts, 3. Ethical Guidelines, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

Relevant Documents: [Colour Work Agreement Form](#)

Useful Websites: [Articles published in Anatomia, Histologia, Embryologia](#), [Author Services](#), [Blackwell Publishing's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#).

1. GENERAL

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Anatomia, Histologia, Embryologia*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

All papers must be submitted electronically
to <http://mc.manuscriptcentral.com/ahe>

The use of an online submission and peer review site speeds up the decision-making process, enables immediate distribution and allows authors to track the status of their own manuscripts. If assistance is needed (or if for some reason online submission is not possible), the Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

Editorial Office:

Iduna Haus

E-mail: iduna-haus@ethz.ch

2.1. Online Submission

To submit a manuscript, please follow the instructions below.

Getting Started

1. Launch your web browser (Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's ScholarOne Manuscripts homepage (<http://mc.manuscriptcentral.com/ahe>).
2. Log-in or click the "Create Account" option if you are a first-time user of Manuscript Central.
3. If you are creating a new account.
 - After clicking on "Create Account", enter your name and e-mail information and click "Next". Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click "Next."
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click "Finish".
4. If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system (<http://mc.manuscriptcentral.com/ahe>) and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
5. Log-in and select "Author Center."

Submitting Your Manuscript

5. After you have logged in, click the "Submit a Manuscript" link in the menu bar.
6. Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
7. Click the "Next" button on each screen to save your work and advance to the next screen.
8. You are required to upload your files.
 - Click on the "Browse" button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the "Upload Files" button.
9. Review your submission (in PDF format) before sending to the Journal. Click the "Submit" button when you are finished reviewing.

You may suspend a submission at any phase before clicking the "Submit" button and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation e-mail. You can also access Manuscript Central any time to check the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc, docx) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript

including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision.

3. ETHICAL GUIDELINES

Anatomia, Histologia, Embryologia adheres to the ethical guidelines below for publication and research.

3.1. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship and, except in the case of complex large-scale or multi-centre research, the number of authors should not exceed six.

Anatomia, Histologia, Embryologia adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under Acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

3.2. Ethical Approvals

Experimental Subjects: In experiments where animals were used, authors are

requested to give full details about the animals (source, breeding, pathogen-free, conventional conditions, etc.) and their maintenance (standard diet, environment, etc.). When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

3.3 Conflict of Interest and Source of Funding

Conflict of Interest: Authors are required to disclose any possible conflict of interest.

These include financial (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee). Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) will be published under a separate heading entitled 'Conflict of interest'.

Anatomia, Histologia, Embryologia requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. As of 1st March 2007, this information will be a requirement for all manuscripts submitted to the Journal and will be published in a highlighted box on the title page of the article. Please include this information under the separate headings of 'Source of Funding' and 'Conflict of Interest' at the end of your manuscript.

If the author does not include a conflict of interest statement in the manuscript then the following statement will be included by default: "No conflicts of interest have been declared".

Source of Funding: Authors are required to specify the source of funding for their research when submitting a paper. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. The information will be disclosed in the published article.

3.4 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

3.5 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

3.6 Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and

Conditions: http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services:

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

4. OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website

at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

5. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: Original papers should not exceed 30 DIN A4 typewritten pages including figures, tables and references. Summaries of original papers should not exceed 1200 characters.

Short Communications: Short communications should not exceed 5 DIN A4 typewritten pages including figures, tables and references. Summaries of short communications should not exceed 600 characters. Short communications may be given priority for publication.

Reviews: Due to their nature, reviews are not limited in length per se, however editors reserve the right to have them shortened for brevity during review.

6. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

6.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: All measurement specifications must follow the S.I. system. Solution concentrations are to be given in mol/l. All other concentrations are to be given in % (volume or weight). Abbreviations of biological,

chemical or other terms should only be employed when it is certain they are internationally known. The full name must be stated in brackets when an abbreviation is used for the first time in a paper.

Scientific Names: All biological, chemical, medical or other names are to be given according to the most recent international nomenclature. In the case of substances or reagents obtained commercially, the name and address of the manufacturer or supplier (as a footnote) should be given the first time the product is mentioned. Products with a trademark should be marked with ©. Names of bacteria should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses should be classified and named as recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

Font: Names of micro-organisms and zoological or botanical names should be given in italics.

6.2. Structure

All manuscripts submitted to *Anatomia*, *Histologia*, *Embryologia* should include: Summary, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, and References.

Title Page: The following information should be given on page one of the manuscript: the name of the institution where the work was carried out, the title of the manuscript, the name(s) of the author(s), the address(es) of the author(s), the e-mail address of the corresponding author, and the number of figures and tables accompanying the manuscript.

Summary: Summaries of original articles should not exceed 1200 characters, and those of short communications should not exceed 600 characters.

Optimizing Your Summary for Search Engines

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled [these guidelines](#) to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

6.3. References

Each original paper should have a list of references which should be restricted to a minimum. The references should be listed alphabetically according to the name of the first author.

Every reference should be structured as follows: author or author's surname and initials of the given name; year of publication (without brackets); title of paper; name of the journal; volume number (bold); page numbers, e.g.:

Gothe, R., Y. Gold and A. Kraiss, 1986: On the subspecific validity of *Rhipicephalus evertsi mimeticus* DÖnitz, 1910. J. Vet. Med. B 33, 47-59.

Books or separate publications should be quoted as follows:

Boch, J. and R. Supperer, 1977: Veterinary Medical Parasitology. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin.

Reference to the quoted literature in the text should be given by putting the name(s) of the author(s) in brackets, with the year of publication, e.g.: (Thein and Härtl, 1986).

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see www.doi.org/ for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

6.4. Tables, Figures and Figure Legends

The number and size of illustrations and tables should be kept to the minimum necessary.

Tables: Tables should be created using the table function.

Figures: Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. These figures should include a bar the size of which is defined in the caption of the photograph concerned. If a figure is to be cropped, please mark the lines on a photocopy or tracing paper. Printouts should be made with a laserprinter at the highest resolution (> 600 dpi). If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible.

Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units.

Preparation of Electronic Figures for Publication

Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and

Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of at least 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). Please submit the data for figures in black and white or submit a Colour Work Agreement Form (see Colour Charges below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; halftones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures:
<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it:
<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

Colour Charges: It is the policy of the *Anatomia*, *Histologia*, *Embryologia* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. However, in the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Anatomia*, *Histologia*, *Embryologia* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). Questions concerning colour figures should be directed to the Editorial Office, Iduna Haus (iduna-haus@ethz.ch). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office (iduna-haus@ethz.ch) to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF* from the Internet. The web address for the form is: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf. Please return the Colour Work Agreement Form upon acceptance of your manuscript to the production editor via post:

Masturah Salim
 Production Editor
 Journal Content Management
 Wiley
 1 Fusionopolis Walk
 #07-01 Solaris South Tower
 Singapore 138628
 E-mail: msalim@wiley.com

Figure Legends: Legends for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate

7. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

7.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html.

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

7.2 Early View (Publication Prior to Print)

Anatomia, Histologia, Embryologia is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is

allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

7.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

7.4 Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

7.5 Offprints and Extra Copies

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on this [link](#), fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields. If you have queries about offprints please e-mail offprint@cosprinters.com

Last update: April 2013