

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

PATRICIA TERRON GHEZZI DA MATA

**INFLUÊNCIA DA DIETA DE CAFETERIA SOBRE A
MORFOLOGIA E EXPRESSÃO DE IL6 E AQUAPORINAS 1 E
9 NO EPIDÍDIMO DE RATOS *WISTAR***

CASCAVEL-PR

Fevereiro/2014

PATRICIA TERRON GHEZZI DA MATA

**INFLUÊNCIA DA DIETA DE CAFETERIA SOBRE A
MORFOLOGIA E EXPRESSÃO DE IL6 E AQUAPORINAS 1 E
9 NO EPIDÍDIMO DE RATOS *WISTAR***

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: Prof^a. Dr^a. Célia Cristina

Leme Beu

CO-ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Raquel Fantin
Domeniconi

CASCADEL-PR

Fevereiro/2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRICIA TERRON GHEZZI DA MATA

INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA, SOBRE A MORFOLOGIA, MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E AQUAPORINAS, NO EPIDÍDIMO DE RATOS *WISTAR*

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.

Orientadora: Prof. Dr(a). Célia Cristina Leme Beu
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. (a) Elaine Manoela Porto Amorim
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. (a) Glaura Scantamburlo A. Fernandes
Universidade Estadual de Londrina

CASCAVEL-PR

Fevereiro/2014

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdemar da Mata e Maria Luiza Terron Ghezzi da Mata, e à minha filha Rafaela Ghezzi Abegg.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter abençoado, protegido e iluminado meu caminho.

À minha família, pela dedicação e tempo destinado no cuidado da minha amada filha, e pelo apoio nessa, e em todas as fases de minha vida. Pai, mãe e irmão, (Valdemar, Maria Luiza e André), tudo é graças a vocês e dedicado a vocês.

À minha filha Rafaela, obrigada por muitas vezes desviar minha atenção dos trabalhos e estudos acadêmicos e alegrar meu dia.

À minha orientadora e querida amiga, Célia Cristina Leme Beu, obrigada por compartilhar comigo seu conhecimento e experiência, além de seu apoio, paciência e dedicação.

Aos meus colegas de trabalho e alunos, pelo apoio e compreensão.

Ao corpo docente do Mestrado em Biociências e Saúde da UNIOESTE, pela contribuição direta para minha formação, e pelas valiosas sugestões que muito colaboraram para a elaboração desta tese.

À UNIOESTE pela oportunidade e por ser meio para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Mestrado em Biociências e Saúde; Leonardo Eduardo Ferreira e Heloísa Deola Confortim, obrigada pela amizade, votos de confiança e força dada durante a conclusão dessa jornada.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu, bem como aos funcionários técnicos e acadêmicos.

À Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi e ao Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, pelo apoio e atenção dispensada.

Ao colega MSc. Leonardo Oliveira Mendes, pelo apoio e valiosas sugestões.

Aos membros da banca de defesa desta dissertação: Professoras Doutoradas Elaine Manoela Porto Amorim e Glaura Scantamburlo A. Fernandes, por terem aceitado o convite para participar da banca.

A todos aqueles que por ventura foram injustamente esquecidos.

RESUMO GERAL

O aumento de tecido adiposo, na obesidade, pode ser associado a alterações fisiológicas, incluindo modificações importantes nas concentrações circulantes de hormônios, inclusive dos hormônios esteroides sexuais. O epidídimo, órgão do sistema genital masculino, é andrógeno-dependente, portanto, susceptível a modificações resultantes das alterações nas concentrações de hormônios esteroides sexuais, as quais podem comprometer suas principais funções: transporte, maturação, manutenção, proteção e armazenamento dos espermatozoides. O transporte de água, no epidídimo, é essencial para formar o ambiente luminal adequado para que as funções epididimárias e relativas aos espermatozoides sejam realizadas; assim, alterações das aquaporinas (AQPs), podem intervir na homeostase do ducto e, conseqüentemente, afetar negativamente a fertilidade. O acúmulo de gorduras pode aumentar a temperatura local e alterar as funções epididimárias e, ainda, influenciar na síntese e secreção de citocinas como a interleucina-6 (IL6), em razão do estado inflamatório crônico de baixa intensidade em consequência da obesidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da dieta de cafeteria sobre a morfologia do epitélio de revestimento do ducto epididimário de ratos e sobre a expressão de IL6 e de AQPs 1 e 9 no referido epitélio. As análises foram realizadas utilizando amostras teciduais do epidídimo de ratos *Wistar* dos grupos controle (CON, animais alimentados com dieta padrão) e cafeteria (CAF, animais alimentados com dieta de cafeteria), tratados pelo período experimental de 24 semanas. As amostras foram submetidas à rotina histológica e reações imunohistoquímicas para análises morfológica, morfométrica e da expressão de IL6 e AQPs 1 e 9. As análises evidenciaram uma modificação na distribuição celular relativa, com diminuição de células basais na região de corpo epididimário, e aumento significativo de células halo no segmento inicial, cabeça e cauda epididimária dos animais CAF. O diâmetro luminal e altura epitelial não

apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Houve aumento na expressão de IL6 no segmento inicial do epidídimo dos animais CAF. A expressão de AQP1 foi alterada nos animais do grupo CAF, em geral, com maior expressão nos canais vasculares, principalmente, do segmento inicial e cabeça; além de maior expressão nas células peritubulares do segmento inicial. A expressão de AQP9 foi diminuída apenas no segmento inicial do grupo CAF, cuja reatividade foi média, enquanto a reatividade foi intensa neste segmento dos animais do grupo CON. Os resultados obtidos indicam que a dieta de cafeteria promoveu alterações segmento-específicas na distribuição de células basais e halo e na expressão de IL6 e de AQPs 1 e 9. Estes resultados permitem inferir que o aumento de massa corpórea, induzido por dieta de cafeteria, pode promover alterações no ambiente luminal epididimário com possível prejuízo das funções de transporte, maturação, manutenção, armazenamento e proteção dos espermatozoides. A fim de esclarecer a extensão do prejuízo causado pelas alterações resultantes da dieta de cafeteria, novos estudos tais como alterações bioquímicas epididimárias, análises ultraestruturais dos tipos celulares epididimários; capacidade reprodutiva e morfologia e motilidade dos espermatozoides são necessários.

Palavras-chave: Epididimo; inflamação; obesidade; aquaporinas, epitélio epididimário, interleucina.

GENERAL ABSTRACT

The increase of fat tissue, in obesity, can be associated to physiological alterations, including important modifications in the concentration of circulating hormones, including the sexual steroid hormones. The epididymis, organ of the male genital system, is androgynous-dependent, therefore, susceptible to resulting modifications of sexual steroids hormones concentrations, which can compromise its main functions: transport, maturation, maintenance, protection and storage of the spermatozoids. The water transporting, in the epididymis, is essential to form the adequate luminal environment so the epididymal and spermatozoid related functions can happen; thus, alterations in aquaporins (AQPs), may intervene in the homeostasis of the duct and, consequently, negatively affect fertility. The accumulation of fat may increase the local temperature and alter the epididymal functions and, even, influence in the synthesis and secretion of cytokines such as the interleukin-6 (IL6), due to the chronicle inflammatory estate of low intensity as a consequence of obesity. The objective of this study was to evaluate the influence of the cafeteria diet over the morphology of the coating epithelium of the epididymal duct of rats and about the expression of IL6 and AQPs 1 and 9 in the mentioned epithelium. The analysis were made using tissue samples of the epididymis of Wistar rats of the groups control (CON, animals fed with the pattern diet) and cafeteria (CAF, animals fed with a cafeteria diet) treated throughout the experimental period of 24 weeks. The samples were submitted to a histological routine and immunohistochemical reactions for morphological, morphometric and the expression of IL6 and AQPs 1 and 9 analysis. The analysis evidenced a modification in the relative cellular distribution, with decrease of basal cells in the region of the epididymal body, and a significant increase of halo cells in the epididymal segments initial, head and tail of the CAF animals. The luminal diameter and the epithelial height didn't show significant differences between the animals. The intense

expression of IL6 in the initial segment of the CAF animals was the outstanding result for this interleukin. The expression of AQP1 was altered in the CAF group animals, in general, with bigger expression in the vascular channels, mainly, the initial segment and the head; besides the bigger expression in the peritubular cells in the initial segment. The expression of AQP9 was altered only in the initial segment of the CAF group, which reactivity was average, while the reactivity was intense in this segment in the animals of the CON group. The results obtained indicate that the cafeteria diet promoted segment-specific alterations in the distribution of basal cell and halo and expression of IL6 and AQPs 1 and 9. These results allow us to deduce that the increase of body mass, induced by a cafeteria diet may promote alterations in the epididymal luminal environment with possible damage in the transport, maturation, maintenance, protection and storage of the spermatozooids. In order to enlighten the extension of the damage caused by the alterations resulting from the cafeteria diet, new studies such as epididymal biochemical alterations, ultrastructural analysis of the epididymal cell types and morphology and motility of the spermatozooids are necessary.

Key-words: Epididymis, inflammation, obesity, aquaporins, epididimal epithelium, interleukin

SUMÁRIO

| | |
|--|--------|
| 1- LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... | Pág.1 |
| 2- LISTA DE TABELAS..... | Pág.4 |
| 3- LISTA DE ABREVIATURAS..... | Pág.5 |
| 4- INTRODUÇÃO GERAL..... | Pág.7 |
| 4.1- PROCESSO SAÚDE-DOENÇA..... | Pág.7 |
| 4.2- A OBESIDADE E SEUS DETERMINANTES SOCIAIS..... | Pág.9 |
| 4.3- OBESIDADE E POLÍTICAS DE SAÚDE..... | Pág.11 |
| 5- REVISÃO GERAL DE LITERATURA..... | Pág.14 |
| 5.1- OBESIDADE E OS DISTÚRBIOS METABÓLICOS..... | Pág.14 |
| 5.2- HORMÔNIOS ESTEROIDES SEXUAIS, OBESIDADE E REPRODUÇÃO | Pág.15 |
| 5.3- A DIETA DE CAFETERIA E A INFERTILIDADE MASCULINA..... | Pág.16 |
| 5.4- A VIA ESPERMÁTICA..... | Pág.18 |
| 5.5- EPIDÍDIMO E AS AQUAPORINAS..... | Pág.22 |
| 5.6- A OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E O EPIDÍDIMO..... | Pág.23 |
| 6- OBJETIVOS..... | Pág.28 |
| 7- REFERÊNCIAS..... | Pág.29 |
| 8- RESULTADOS..... | Pág.50 |
| 9- ARTIGO..... | Pág.51 |
| 10- APÊNDICES..... | Pág.72 |

1- LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS – REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Figura 1 – Representação do testículo e da via espermática, mostrando o túbulo seminífero contorcido, rede testicular, ductos eferentes, epidídimo e regiões, e ducto deferente. Figura adaptada de Robaire, B., and Hermo, L. [1988]. Efferent ducts, epididymis and vas deferens structure, functions and their regulation. In **The Physiology of Reproduction** [E. Knobil and J. D. Neill, Eds.], pp. 999–1080. Raven Press New York.....Pág.19

Figura 2 – Esquema representando secção do ducto epidimário de rato, com seus tipos celulares. Fonte: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3^a Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 22, O epidídimo.....Pág. 21

FIGURAS – ARTIGO

Figura 1 – Efeito do tratamento de 24 semanas com dieta de cafeteria, na distribuição celular relativa (% do total) das células principal, basal, halo, clara e delgada, no segmento inicial (A), cabeça (B), corpo (C) e cauda (D) epididimários de animais CON x CAF. Dados expressos em média \pm DP. Diferença significativa de (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ – comparado ao grupo CON.....Pág.58

Figura 2 – Diâmetro luminal (μm) dos segmentos inicial (Si), cabeça (Cç), corpo (Co) e cauda (Cd) epididimários dos animais dos grupos CON (n=5) e

CAF (n=5) após 24 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± DP.....Pág. 58

Figura 3 – Altura epitelial (μm) dos segmentos inicial (Si), cabeça (Cç), corpo (Co) e cauda (Cd) epididimários dos animais dos grupos CON (n=5) e CAF (n=5) após 24 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± DP.....Pág. 59

Figura 4 – Fotomicrografias da cabeça do epidídimo de ratos *Wistar* dos grupos CON (A) e CAF (B, C e D). São indicados: infiltrados leucocitários (*) adjacentes aos canais vasculares (V), lúmen (L), Interstício (IT) e células halo (h). H/E. Escala: 50 μmPág. 59

Figura 5- Fotomicrografias de imunolocalização de IL6 no segmento inicial e cauda do epidídimo de ratos *Wistar*, após 24 semanas de tratamento com ração padrão (A e C) e dieta de cafeteria (B e D). São indicados: lúmen (L), célula principal (P), interstício (IT) e célula clara (C). Escala: 50 μmPág. 60

Figura 6- Fotomicrografias de imunolocalização da AQP1 nos segmentos inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de ratos *Wistar*, após 24 semanas de tratamento com ração padrão (A, C, E e G) e dieta de cafeteria (B, D, F e H). São indicados: lúmen (L), túnica albugínea (TA), célula principal (P), célula halo (h), interstício (IT), célula clara (C) e a imunolocalização positiva para AQP1 (\rightarrow). Escala: 50 μmPág. 62

Figura 7 – Fotomicrografias de imunolocalização da AQP9 no segmento inicial do epidídimo de ratos *Wistar*, após 24 semanas de tratamento com ração padrão (Figura 7A) e dieta de cafeteria (Figura 7B). São indicados: lúmen (L), célula principal (P), célula halo (h), interstício (IT), estereocílios (E) e a imunolocalização positiva para AQP9 (\rightarrow). Escala: 50 μmPág. 63

2- LISTA DE TABELAS

TABELAS – ARTIGO

Tabela 1 – Valores de parâmetros corporais analisados no grupo CON e grupo CAF, após 24 semanas de tratamento com ração padrão e dieta cafeteria.....Pág. 57

Tabela 2 – Expressão de AQP1 e AQP9 no epidídimo de animais dos grupos CON e CAF*.....Pág. 63

3- LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| ABC | Complexo avidina-biotina |
| AQPs | Aquaporinas |
| AQP1 | Aquaporina 1 |
| AQP9 | Aquaporina 9 |
| CAF | Grupo Cafeteria |
| BMI | <i>Body Mass Index</i> |
| BSA | Solução Tampão Salina |
| Cç | Cabeça |
| Cd | Cauda |
| CAF | Cafeteria |
| CEEAAP | Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas |
| CNA | Comprimento Nasoanal |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de experimentação Animal |
| CON | Grupo Controle |
| Co | Corpo |
| CO₂ | Gás carbônico |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DP | Desvio Padrão |
| H-E | Hematoxilina – Eosina |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| ILs | Interleucinas |
| IL 1 | Interleucina – 1 |
| IL 1β | Interleucina 1 Beta |
| IL 1α | Interleucina 1 alfa |
| IL-6 | Interleucina – 6 |

| | |
|-----------------|---|
| IL6R | Receptor de Interleucina - 6 |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| JNK | <i>Jun N-terminal kinase</i> |
| Kg | Kilograma |
| LABEF | Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| MS | Ministério da Saúde |
| NfκB | <i>IjB nuclear factor j-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| NO | Óxido nítrico |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| P | Peso corporal |
| PBS | Solução tampão salina |
| PNSN | Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição |
| POF | Pesquisa Orçamentária Familiar |
| PPV | Pesquisa sobre Padrões de Vida |
| Si | Segmento Inicial |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TLR | Receptor <i>tool like</i> |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral – alfa |
| TNFR | Receptor de Fator de Necrose Tumoral |
| UNIOESTE | Universidade Estadual do Oeste do Paraná |
| UNESP | Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho |
| USA | <i>United States of America</i> |

4-INTRODUÇÃO GERAL

4.1-PROCESSO SAÚDE-DOENÇA

O ser humano evita, de modo instintivo, coisas que são prejudiciais à saúde. Rejeitamos substâncias de sabor amargo, alimentos com indício de putrefação, buscamos proteção contra frio e calor, contra chuva e contra o sol abrasador. Não obstante esses comportamentos, adoecemos. A doença, e sobretudo, a doença transmissível, é um antigo acompanhante da espécie humana, como revelam pesquisas paleontológicas (SCLIAR, 2002).

A doença não pode ser compreendida apenas por meio de medições fisiopatológicas, pois quem estabelece o estado da doença é o sofrimento, a dor, o prazer, enfim, os valores e sentimentos expressos pelo corpo subjetivo que adoece (BRÊTAS; GAMBÁ, 2006) e, considerando que ela ocorre num dado ambiente, ALMEIDA FILHO e ROUQUAYROL (2002) enfatizam que 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 (SCLIAR, 2007). Está relacionada também, à história do indivíduo e deste com a sociedade. Ela é uma perturbação experimentada pelo indivíduo, uma exceção que o afasta das suas relações vitais que ele estava habitualmente vivendo. Esta experiência, da doença, relaciona-se ao estado anterior da saúde, que estando “esquecida” ou não chamando a atenção impõe o estabelecimento de valores padronizados. Ora, a doença, então, não pode existir sem a saúde (PALMA, 2000).

O conceito de saúde reflete também essa conjuntura social, econômica, política e cultural, ou seja, não representa a mesma coisa para todas as pessoas. Dependerá da época, do lugar, da classe social, de valores individuais, de concepções científicas, religiosas e filosóficas (SCLIAR, 2007). Porém, conceituar “saúde” é sem dúvida uma tarefa árdua, pois os conceitos aparecem frágeis, não tão bem delimitados. GADAMER (1997) compreende este processo como um mistério. A definição tradicional de saúde é puramente negativa, considerada como a simples ausência de doenças. Visão puramente biológica e médica da questão da saúde, o que certamente não se aplica a

uma análise da determinação social da mesma. Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) (GENEVA, 1986), define saúde como um estado de perfeito bem estar. Uma concepção mais positiva, mas com alguns inconvenientes: a incapacidade de se especificar o objeto que se pretende definir, e o fato de se postular a saúde como um estado ideal de plenitude, nunca atingível (TEIXEIRA, 2009).

Muito se tem escrito sobre o Processo Saúde-Doença, no entanto, um novo instrumento intelectual para a apreensão da saúde e da doença deve levar em conta a distinção entre a doença, tal como definida pelo sistema da assistência à saúde – e a saúde, tal como percebida pelos indivíduos. Também, deve incluir a dimensão do bem-estar, um conceito maior, no qual a contribuição da saúde não é a única e nem a mais importante. O sofrimento experimentado pelas pessoas, suas famílias e grupos sociais não corresponde necessariamente à concepção de doença que orienta os provedores da assistência, como os profissionais do Programa Saúde da Família (VIANNA, 2011).

As condições sociais são efetivamente base para o padrão sanitário de um povo, assim como a posição de cada indivíduo na sociedade é uma base da própria saúde. Isso se comprova pelo fato de que, ao retrocedermos nas séries causais dos principais grupos de patologias e agravos daqueles que têm maior impacto negativo para a saúde de diversas sociedades, encontramos entre os determinantes finais e com grande peso, as condições sociais de vida (TEIXEIRA, 2009).

Células, tecidos e órgãos têm suas funções direcionadas em grande parte pelo determinismo biológico, um processo que se altera de forma relativamente lenta: o corpo humano tem o mesmo formato há milhões de anos; a variação ocorre ao longo de muito tempo. Já a sociedade é, relativamente mais dinâmica e mais mutável – as mudanças às vezes ocorrem sob forma verdadeiramente cataclísmica (SCLIAR, 2002). A transformação da sociedade resulta em novas condições de ser, novas condições de sua existência, inclusive psicofisiológica. A posição de cada indivíduo na sociedade é a base para a própria saúde, pois, pode determinar o seu acesso aos meios produzidos pela humanidade e a realização de suas potências naturais dentro das condições e possibilidades do meio social em que vive (TEIXEIRA, 2009).

Paralelamente ao avanço e sofisticação da biomedicina, foi sendo detectada sua impossibilidade de oferecer respostas conclusivas ou satisfatórias para muitos problemas ou, sobretudo, para os componentes psicológicos ou subjetivos que acompanham, em maior ou menor grau, qualquer doença (BARROS, 2002).

Na última década, a promoção da saúde tem se constituído num campo institucional próprio que reivindica para si um conjunto mais ou menos específico de ações. Essas ações buscariam, efetivamente, o incremento da saúde de um universo humano determinado (FLEURY-TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Do mesmo modo que as concepções sobre o processo saúde-doença variam de acordo com o contexto histórico e com a cultura dos indivíduos, os conceitos relativos à obesidade variaram ao longo do tempo, assim como a sua relação com o *status* de saúde ou doença (BARROS FILHO, 2004).

4.2 – A OBESIDADE E SEUS DETERMINANTES SOCIAIS

A obesidade é percebida, interpretada e influenciada pelo sistema social. Desde a antiguidade existem relatos e figuras de pessoas obesas. Em algumas sociedades, e até na sociedade ocidental, em alguns períodos, a obesidade chegou a ser considerado um sinal de saúde e beleza (BARROS FILHO, 2004).

A obesidade é uma doença crônica definida por acúmulo excessivo de gordura em um nível que compromete a saúde dos indivíduos, porém com etiologia não totalmente esclarecida. Até os anos de 1970, a obesidade era definida pela referência a um "peso ideal", derivado de tabelas elaboradas pela indústria de seguros de vida, e este seria um peso corporal dentro da faixa ideal de acarretar menor risco de morte prematura (CABALLERO, 2007). Atualmente, é definida e diagnosticada pelo parâmetro estipulado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) — o *Body Mass Index* (BMI) ou Índice de Massa Corporal (IMC), como é conhecido no Brasil, obtido pelo cálculo da relação entre peso corpóreo (kg) e estatura (m)² dos indivíduos. Através deste parâmetro, são considerados obesos indivíduos cujo valor do IMC é superior ou igual a 30 kg/m² (CONSULTATION, 2000). No entanto, existe consenso na literatura de que o desenvolvimento da obesidade é causado pela interação de

diferentes fatores, o que confere a essa enfermidade uma natureza multifatorial (PEÑA; BACALLAO, 2000).

Estudos apontam o ganho excessivo de peso corporal como um distúrbio da solidão e da desvalorização do cuidado nas relações interpessoais. O excesso de ingestão de alimentos pode ser entendido como uma forma eficiente de preencher vazios existenciais, tão comuns na sociedade mercantilista contemporânea, e esses aspectos não podem ser desconsiderados na condução do tratamento (ANJOS, 2006).

A obesidade é decorrente, também, de uma adaptação da sociedade ao processo de modernização e transição econômica que vem ocorrendo no mundo nas últimas décadas (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR, 2003). A globalização, cujo principal pilar é a formação de consumidores e centros comerciais, em substituição à formação de cidadãos e comunidades, alterou profundamente os valores, costumes, relações com o trabalho, vida familiar e lazer na sociedade contemporânea (ANJOS, 2006), assim como alterou os fatores ambientais, que resultam no aumento da prevalência dos casos de sobrepeso e obesidade, entre eles: a diminuição progressiva da energia gasta em atividade de trabalho, no cumprimento dos afazeres domésticos e nas necessidades diárias, além de promover importantes alterações na industrialização da produção alimentícia, com alimentos altamente palatáveis, que colaboram para o consumo de dietas ricas em proteínas e gorduras e baixa em carboidratos complexos. Portanto, existe maior quantidade de alimentos disponíveis, enquanto que a demanda energética diminuiu drasticamente. (BOUCHARD; HALPERN; DA COSTA, 2003; ROSINI; SILVA; MORAES, 2012).

Segundo a OMS (CONSULTATION, 2000), uma redução natural no gasto energético é observada com a modernização, ocasionando um estilo de vida mais sedentário, com transporte motorizado e equipamentos mecanizados, que diminuem o esforço físico de homens e mulheres, tanto no trabalho quanto em casa, favorecendo o desenvolvimento da obesidade, confirmando os dados anteriores. Embora sejam apontados tais aspectos como determinantes das taxas de obesidade e sobrepeso, a partir da década de 60, modificações nos padrões de morbimortalidade da população vêm sendo objetivamente estudadas e analisadas sob o enfoque dos processos de

transição demográfica, transição epidemiológica e de transição nutricional, com o objetivo de identificar os principais fatores que contribuem para o seu desenvolvimento (MALTA; CEZÁRIO; MOURA, 2006).

4.3 – OBESIDADE E POLÍTICAS DE SAÚDE

Atualmente no planeta, cerca de 1,6 bilhão de adultos (idade superior a 15 anos) têm sobrepeso (índice de massa corporal - IMC - entre 25 e 30 kg/m²) e 400 milhões estão obesos (IMC ≥ 30 kg/m²). Estima-se que, em 2015, 2,3 bilhões de pessoas, em todo o planeta, estarão com sobrepeso e 700 milhões, estarão obesos (STOTHARD *et al.*, 2009). Os brasileiros, também estão incluídos nestas estimativas, pois têm apresentado índices maiores de aumento de massa corporal, nos últimos anos. Dados disponíveis a partir da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) (2008-2009), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (ESTATÍSTICA, 2010) em parceria com o Ministério da Saúde (MS), mostraram que, em 2008-2009, o excesso de peso afetava cerca de metade dos homens e mulheres brasileiras. Em relação à prevalência de *déficit* de peso, o excesso de peso foi 28 vezes mais frequente entre os homens e 13 vezes mais frequente entre as mulheres. Tanto o sobrepeso quanto a obesidade, aumentaram 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. O excesso de peso foi mais evidente entre os homens com maior renda (61,8%), enquanto variou pouco entre as mulheres (45 – 49 %) em todos os grupos de renda (PEGO-FERNANDES; BIBAS; DEBONI, 2011). Esse fenômeno é atualmente um dos maiores desafios para as políticas públicas de saúde e exige um modelo de atenção à saúde, pautado na integralidade do indivíduo e com uma abordagem centrada na promoção da saúde (COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008).

Em seus estudos, GORAN (2001) apresentou dados que proporcionam forte evidência de que níveis mais elevados de IMC durante a infância podem favorecer o excesso de peso na vida adulta (OUDE LUTTIKHUIS *et al.*, 2009). O crescente número de crianças e adolescentes com excesso de peso e obesidade é tão preocupante quanto as taxas de obesidade entre a população adulta, pelas consequências que ocasionam. Maus hábitos alimentares,

especialmente, aqueles que acarretam a obesidade infantil, produzem problemas de saúde imediatos e, também a longo prazo, visto que cerca de 60 % de crianças obesas sofrem de hipertensão, hiperlipidemia e/ou hiperinsulinemia (FREEDMAN *et al.*, 1999).

O cenário epidemiológico brasileiro demonstra que, por força da diminuição em mais de 50% do tamanho da família economicamente dependente, e da participação crescente da mulher no mercado de trabalho, a renda *per capita* do brasileiro aumentou significativamente, principalmente, na década de 1970 (PATARRA; MONTEIRO, 1995). Porém, a distribuição social da renda não melhorou, mantendo-se ou até aumentando o diferencial entre ricos e pobres, de forma que o Brasil é um dos três países mais injustos do mundo no que se refere à partilha social das riquezas produzidas (IUNES, 1995). Análises realizadas pelo Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF, 1974), pela Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN, 1989), pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF, 2002-2003) (COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008) e pela Pesquisa sobre Padrões de Vida (PPV, 1997), apresentaram dados que confirmam a redução da desnutrição em crianças e aumento de sobrepeso e obesidade em adultos, ou seja, apontam para uma situação de “transição nutricional”, caracterizando mudança nas prevalências de doenças transmissíveis e não transmissíveis com diminuição e aumento das mesmas, respectivamente (ANJOS, 2006). A projeção dos resultados de estudos efetuados nas últimas três décadas é indicativa de um comportamento claramente epidêmico da obesidade, coexistindo na mesma comunidade, e muitas vezes, no mesmo domicílio, características marcantes do processo de transição nutricional que ocorre no Brasil e em outros países em desenvolvimento (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003; HAWKES, 2006). Ações como os Programas de Apoio Familiar, Fome Zero e Obesidade Zero, devem ser parte de uma mesma política que passa por um programa de educação nutricional e melhor distribuição de renda, para que as famílias possam ter melhor conhecimento e mais acesso aos alimentos de qualidade nutricional (ANJOS, 2006).

Apesar das consequências que acarreta, o problema do sobrepeso/obesidade ainda não tem sido devidamente considerado em nível das ações de saúde no Brasil, embora tenha sido enfaticamente valorizado no

documento sobre a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (SAÚDE, 2000). A alta prevalência e as comorbidades resultantes da obesidade levam a imensos custos para os serviços de saúde. Os danos acarretados pela obesidade são extensos, pois relaciona-se com diferentes enfermidades bem como, somam-se a prejuízos psicossociais, relacionados à questão da discriminação dos indivíduos sob esta condição patológica (FERREIRA; MAGALHÃES, 2006) e prejuízos financeiros, uma vez que estima-se que os gastos do MS com atendimentos ambulatoriais e internações em função das doenças crônicas não transmissíveis alcancem a cifra, aproximada, de R\$ 7,5 bilhões por ano (MALTA; CEZÁRIO; MOURA, 2006) e deste valor, cerca de R\$ 600 milhões de reais são disponibilizados pelo Governo Federal, via Sistema Único de Saúde (SUS), aos agravos da obesidade, (ANJOS, 2006) contribuindo para gerar no Brasil, uma sobrecarga do SUS (COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008).

5- REVISÃO GERAL DE LITERATURA

5.1- A OBESIDADE E DISTÚRBIOS METABÓLICOS

A obesidade e o sobrepeso, doenças integrantes do grupo de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis mais frequentes da atualidade, são decorrentes do acúmulo excessivo de gordura corporal, em extensão tal que acarreta prejuízos à saúde de pessoas de todas as idades (POIRIER *et al.*, 2006; SITORIUS, 1998; TUNC; BAKOS; TREMELLEN, 2010). A etiologia da obesidade é um processo multifatorial que envolve aspectos ambientais e genéticos. Atualmente, a obesidade é considerada um problema de saúde pública mundial (OMS, 1997), pois doenças associadas a ela estão entre os principais fatores de morbidade e mortalidade prematura no mundo, e tanto os países desenvolvidos como os em desenvolvimento apresentam elevação de sua prevalência (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004).

A adiposidade em excesso é um fator de risco para o desenvolvimento comorbidades, tais como *diabetes mellitus* tipo II, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial (FOGEL, 1986). A incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas, na população mundial, vem crescendo, e sua prevalência em indivíduos obesos tem despertado a atenção de pesquisadores da área médica (ROSINI; SILVA; MORAES, 2012). Além disso, o excesso de tecido adiposo, também provoca alterações metabólicas como as dislipidemias, a resistência à insulina e distúrbios endócrinos (ROSINI; SILVA; MORAES, 2012; SUBASHINI *et al.*, 2011). O risco de desenvolver câncer, distúrbios metabólicos, reprodutivos e doenças crônicas, tais como hipertensão e doenças cardíacas, aumenta em homens e mulheres com índices de sobrepeso elevados, particularmente, naqueles com predominância de acúmulo de gordura visceral. A obesidade está associada com múltiplas alterações do sistema endócrino, incluindo concentrações anormais de hormônios circulantes, devido a alterações no padrão de secreção e/ou metabolismo, transporte e/ou ação hormonal em nível dos tecidos-alvo, inclusive para hormônios esteroides sexuais que têm suas concentrações alteradas na obesidade (MAYES; WATSON, 2004; PASQUALI, 2006; MAH; WITTERT, 2009).

5.2 – HORMÔNIOS ESTEROIDES SEXUAIS, OBESIDADE E REPRODUÇÃO

O tecido adiposo contribui para regular inúmeras funções, tais como, balanço energético, apetite e ingestão de alimentos, imunidade, sensibilidade à insulina, pressão sanguínea e reprodução, liberando adipocinas, que têm efeitos biológicos sistêmicos e locais, assim o aumento de tecido adiposo pode ser associado a alterações fisiológicas, incluindo modificações importantes nas concentrações circulantes de hormônios esteroides sexuais, interferindo, desta forma, nos processos reprodutivos por diferentes mecanismos, em mulheres e em homens (FERNANDEZ *et al.*, 2011; MAMMI *et al.*, 2012; VIGUERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011).

Homens obesos apresentam concentrações plasmáticas aumentadas de estrógenos e concentrações diminuídas biodisponíveis de androgênios, devido à atividade aumentada da aromatase, fazendo a conversão periférica de androgênios a estrogênios. Estas evidências indicam que há similaridade morfofisiológica entre tipos celulares funcionalmente distintos, tais como os adipócitos uniloculares e células de Leydig, que sintetizam testosterona (CALLE; KAAKS, 2004; HAMMOUD *et al.*, 2008; MAMMI *et al.*, 2012)

O estradiol pode ter efeito direto no testículo, alterando a espermatogênese, motilidade e concentração de espermatozoides. Assim, o aumento de sua concentração, juntamente com a redução da concentração de testosterona, deve afetar negativamente a produção e a qualidade dos espermatozoides (AKINGBEMI, 2005; GOYAL *et al.*, 2003). Os andrógenos afetam, direta ou indiretamente, todos os compartimentos do corpo e órgãos reprodutivos (ISIDORI *et al.*, 2005), por isso, a deficiência de testosterona frequentemente resulta em perda de libido e disfunção erétil, que podem ser facilmente recuperados por terapia de substituição de andrógeno. A redução das concentrações de testosterona associada à obesidade é acompanhada pela diminuição intratesticular deste hormônio, alterando espermatozoides e reduzindo a quantidade dos mesmos em indivíduos obesos (HAMMOUD *et al.*, 2008).

A integridade morfológica e funcional do epidídimo é andrógeno-dependente, de maneira que com a regulação androgênica, as células do epitélio epididimário produzem diferentes proteínas, glicoproteínas, glicolípídios e fosfolípídios – componentes do fluido luminal necessário para maturação e sobrevivência dos espermatozoides (VIGUERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011). Em pacientes obesos, uma grande quantidade de gordura é depositada no escroto e esta gordura, ou seus produtos, podem causar estresse oxidativo (DANDONA *et al.*, 2005; DAVI; FALCO, 2005), oxidando lipídios, aminoácidos e carboidratos, podendo lesar o DNA por alterações diretas no epitélio de revestimento do epidídimo ou nos espermatozoides nele armazenados (KASTURI; TANNIR; BRANNIGAN, 2008). VIGUERAS-VILLASEÑOR *et al.* (2011) avaliaram os efeitos da obesidade, induzida por dieta hiperlipídica no epidídimo de ratos, e relataram que no epitélio da região de cabeça dos animais tratados pela referida dieta, assim como no lúmen, corpos apoptóticos estavam presentes, podendo esta ser uma evidência de que os defeitos nos espermatozoides possam ocorrer nesta região do ducto epididimário.

A relação entre a obesidade e o sucesso reprodutivo é matéria complexa, entretanto os efeitos negativos da obesidade na reprodução humana são amplamente discutidos: atraso para concepção espontânea, maior prevalência de infertilidade feminina e masculina, de abortos naturais, pior resposta aos tratamentos de infertilidade, efeitos sobre o desenvolvimento do embrião, implantação e tamanho fetal, além da maior predisposição a complicações obstétricas (BINDER; HANNAN; FLEMING, 2007; GARDNER, 2012; NELSON, 2007; PASQUALI, 2007).

5.3– A DIETA DE CAFETERIA E INFERTILIDADE

STUNKARD (2000) mostrou em seu estudo que a taxa de obesidade associada a fatores hereditários não é superior a 33%, deduzindo que 66% da variação do IMC é determinado pelo ambiente. Assim, parece correto afirmar que, mesmo que a obesidade evolua dentro das restrições genéticas, os determinantes ambientais desempenham um papel predominante no desenvolvimento desta doença, portanto, dietas contemporâneas são um

importante fator obesogênico na atualidade, e a obesidade humana, provavelmente, pode ser resultado desta dieta (ARCHER; MERCER, 2007).

A dieta de cafeteria é composta por alimentos altamente palatáveis, tais como biscoito *wafer*, salgadinhos comerciais e bolos industrializados, amendoim torrado, chocolate e refrigerante, e tem como objetivo simular na alimentação de ratos, o tipo de consumo alimentar feito pelas sociedades modernas, aonde grande parte das refeições é feita em cafeterias, lanchonetes e *fastfoods*, caracterizando uma ingestão com alto teor de gordura. Esta dieta, em animais experimentais, promove um acréscimo de peso corporal total de 30 - 40%, aproximadamente, além de produzir aumento na quantidade de gordura visceral (CONSULTATION, 2000; FRANCISCHI *et al.*, 1999; MARTIRE *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 1995; ROLLS; SHIDE, 1992).

Além da obesidade, a dieta de cafeteria promove em animais experimentais outras comorbidades como: alterações metabólicas e bioquímicas em ratos *Wistar* saudáveis (PEREIRA, 2002; PRADA *et al.*, 2005), permitindo assim, estudar as consequências fisiológicas deste consumo alimentar. Logo, modelos de roedores obesos por dieta de cafeteria são instrumentos valiosos para avaliar condições morfofisiológicas, e podem contribuir para a compreensão das possíveis alterações orgânicas e seus mecanismos de desenvolvimento, decorrentes da obesidade (LEVIN *et al.*, 2003ab). Em humanos, estudos sobre a obesidade podem apresentar dados divergentes, devido aos diferentes estilos de vida e comportamentos individuais (BAKOS *et al.*, 2011).

MANDENOFF *et al.* (1986) observaram que em ratos obesos, alimentados com dieta de cafeteria, houve diminuição no número de ejaculações. Em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, relatou-se diminuição da motilidade espermática, das taxas de fertilização, do número de cópulas e prenhez, bem como aumento nas taxas de danos ao DNA dos espermatozoides (BAKOS *et al.*, 2011; GHANAYEM *et al.*, 2010). Também foi relatada apoptose no epitélio epididimário e presença de corpos apoptóticos no lúmen epididimário (VIGUERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011). No entanto, há poucos estudos abordando os possíveis efeitos da obesidade masculina sobre a morfologia, elementos sintetizados, secretados ou expressados pelo epitélio

da via espermática, principalmente do ducto epididimário (BROWN *et al.*, 1993; FERNANDES *et al.*, 2011; VIGUERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2011).

5.4 – A VIA ESPERMÁTICA

O sistema genital masculino é composto pelos testículos, via espermática (rede testicular, ductos eferentes, ductos deferentes, ductos ejaculatórios e epidídimos), glândulas acessórias (próstata, glândulas seminais e glândulas bulbouretrais) e órgão de cópula (pênis). O testículo é o órgão cujas funções principais são a produção de espermatozoides (espermatogênese) e de hormônios androgênicos (esteroidogênese), enquanto os epidídimos, adjacentes aos testículos, são ductos únicos altamente enovelados com função de receber, transportar, proteger, maturar, manter e estocar os espermatozoides provenientes dos testículos via ductos eferentes (ROBAIRE; HERMO, 1988).

O epidídimo, em mamíferos, é dividido, anatomicamente, nas regiões de cabeça, corpo e cauda; é um túbulo altamente enovelado, cujo epitélio é formado por diferentes tipos celulares. Estudos histológicos permitiram observar diferenças regionais características na estrutura do epitélio epididimário de várias espécies de mamíferos, possibilitando estabelecer segmentos caracterizados, de acordo com o diâmetro tubular, altura epitelial e tipo celular predominante no epitélio de revestimento. Assim, estabeleceu-se uma divisão do epidídimo, com base em critérios histológicos, nas regiões de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda proximal e distal (Figura 1) (BENOIT, 1926; ROBAIRE; HERMO, 1988; SERRE; ROBAIRE, 1998). Possui composição variada de células por todo seu comprimento, incluindo células principais, basais, apicais, delgadas, células claras e células halo, responsáveis por funções distintas nesse processo, a cada região do ducto (SMITHWICK; YOUNG, 1997; TRANSLER *et al.*, 1998).

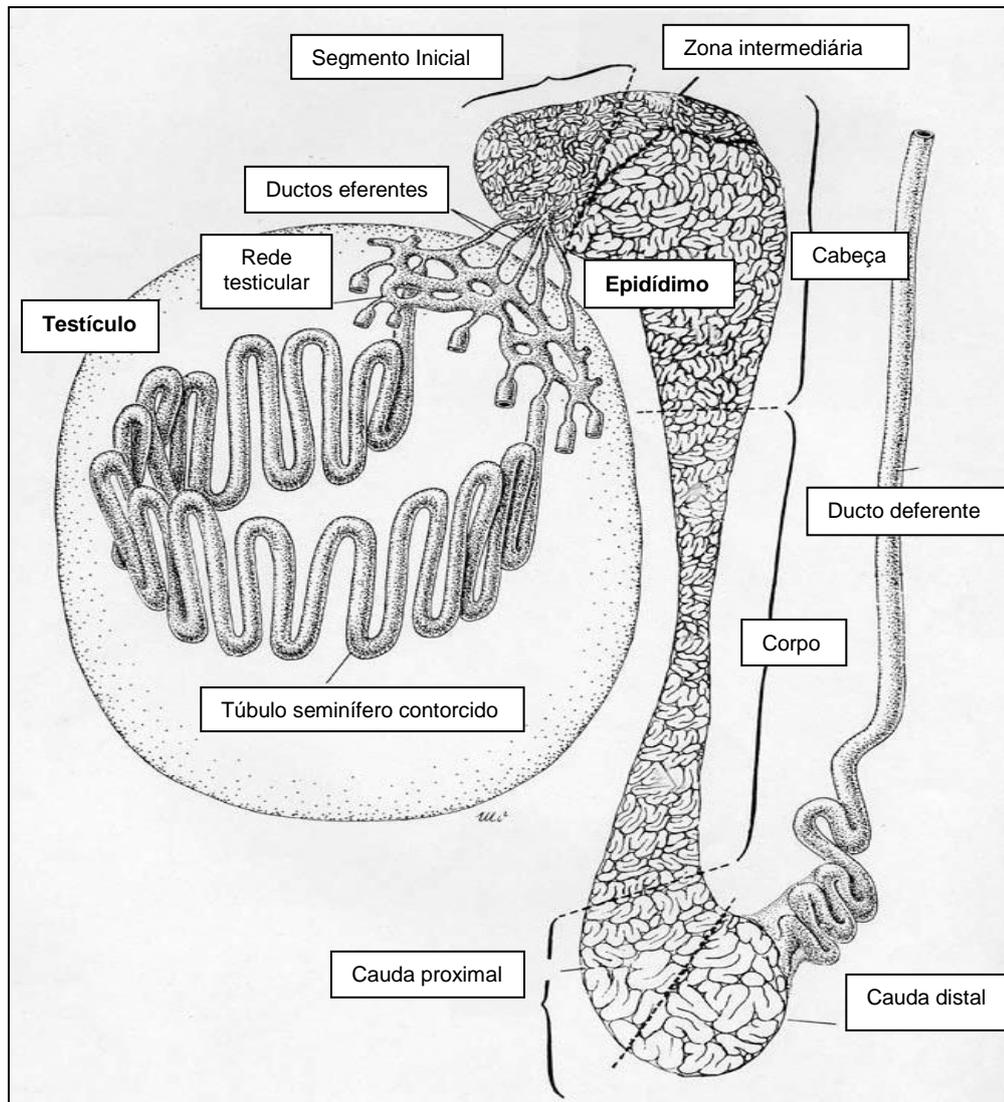


Figura 1 – Representação do testículo e da via espermática, mostrando o túbulo seminífero contorcido, rede testicular, ductos eferentes, regiões do epidídimo e ducto deferente.

Fonte: Figura adaptada de Robaire, B., and Hermo, L. [1988]. Efferent ducts, epididymis and vas deferens structure, functions and their regulation. In *The Physiology of Reproduction* [E. Knobil and J. D. Neill, Eds.], pp. 999–1080. Raven Press, New York.

As células principais compõem de 65% a 80% do epitélio epididimário, distribuídas de maneira segmento-específica e espécie-específica, com morfologia variável do tipo colunar a cuboide baixa, também dependente do segmento o qual a célula está localizada. Estas células realizam síntese,

secreção e absorção, por isso são responsáveis pela maior quantidade de proteínas presentes no lúmen epididimário (ABOUD-HAILA; FAIN-MAUREL, 1984; HERMO *et al.*, 1994; HERMO; ROBAIRE, 1988; TRASLER *et al.*, 1988).

Células delgadas estão presentes no epitélio do segmento inicial e zona intermediária do epidídimo, em contato com a membrana basal, localizadas entre células principais, sendo mais delgadas que estas. Possuem núcleo oval a esférico na região apical, com quantidade considerável de vesículas envolvidas no processo de endocitose de proteínas. Acredita-se que as células delgadas podem ser precursoras de células claras (ADAMALI; HERMO, 1996; HERMO; ROBAIRE; ORGEBIN-CRIST, 2006; SERRE; ROBAIRE, 1998).

Células apicais foram descritas inicialmente no segmento inicial e zona intermediária, embora também ocorram, ocasionalmente, em outros segmentos do epidídimo de ratos em envelhecimento (HERMO; ROBAIRE, 1988; HERMO; ROBAIRE; ORGEBIN-CRIST, 2006). Este tipo celular tem núcleo esférico localizado apicalmente e não contacta a membrana basal. As células apicais podem ser diferenciadas das células principais e delgadas pelo perfil de expressão de proteínas; contudo, pouco é conhecido sobre suas funções específicas atribuídas as células apicais (ADAMALI; HERMO, 1996; HERMO; ROBAIRE; ORGEBIN-CRIST, 2006).

As células claras estão presentes na região de cabeça, corpo e cauda do epidídimo de ratos; são células largas, com grande quantidade de vesículas cobertas, vesículas não-cobertas, endossomos, corpos multivesiculares e lisossomos em sua região apical, e uma região basal, que além do núcleo, está preenchida com quantidade variável de inclusões lipídicas. O conteúdo de organelas endocíticas presentes no citoplasma das células claras torna-as apropriadas para atuarem em atividade endocítica, a qual é maior na cauda do epidídimo (HERMO; ROBAIRE, 2002). Entre os elementos retirados do lúmen pelas células claras, pode-se citar o conteúdo das gotas citoplasmáticas. Também, atribui-se às células claras a função de acidificação do fluido luminal (DA SILVA, 2007; HERMO; ROBAIRE; ORGEBIN-CRIST, 2006).

Células basais contribuem de 15% a 20% para formar o epitélio epididimário; têm aspecto hemisférico, localizadas adjacentes à membrana basal sem, aparentemente, alcançar o lúmen. Porém, estudos em ratos

utilizando diferentes marcações e metodologias, mostraram que estas células possuem delgadas projeções que a ligam com o lúmen (SHUM *et al.*, 2008). Em relação a função dessas células, foi sugerido que possam fazer endocitose de fatores e/ou substâncias provenientes dos vasos sanguíneos ou das células principais, auxiliando na resposta imunológica, e também podem regular as funções das células claras e principais (CHEUNG *et al.*, 2005; HERMO; PAPP, 1996; SHUM *et al.*, 2008)

As células halo são pequenas células caracterizadas por apresentar núcleo, geralmente circular com pequena margem de citoplasma circundante. Estas células estão distribuídas ao longo de toda altura do epitélio, podendo estar localizadas próximas à membrana basal ou mais próximas ao lúmen, paradas na zona de oclusão. As células halo possuem quantidade variável de grânulos densos no citoplasma, e foram descritas como linfócitos ou monócitos, podendo atuar como barreira imunológica no epitélio do ducto epididimário (DYM; ROMRELL, 1975; WANG; HOLSTEIN, 1983; HERMO; ROBAIRE; ORGEBIN-CRIST, 2006; TRASLER; HERMO; ROBAIRE, 1988).

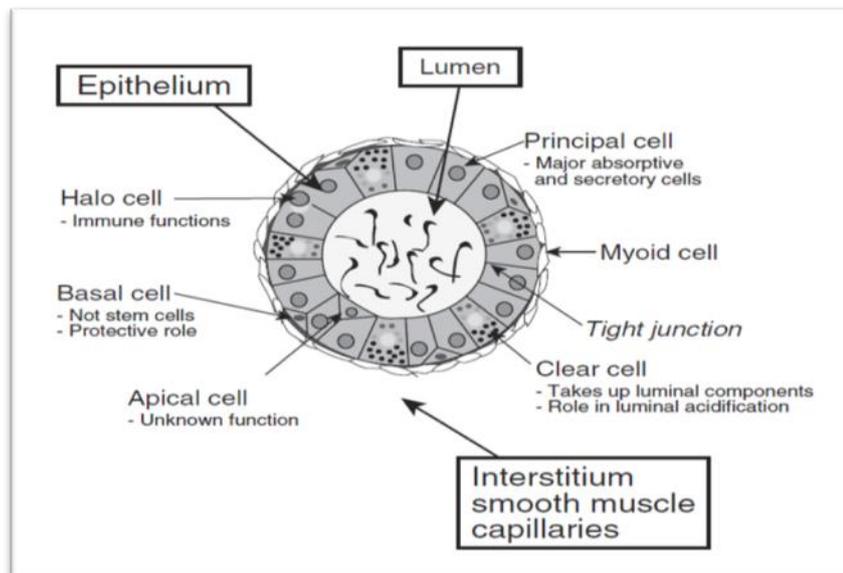


Figura 2 – Esquema representando secção do ducto epididimário de rato, com seus tipos celulares.

Fonte: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3ª Edition, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 2006, capítulo 22, O epidídimo.

5.5 –EPIDÍDIMO E AQUAPORINAS

No epidídimo, o transporte de água é essencial para a manutenção do ambiente luminal, propiciando condições para que haja concentração, maturação, transporte, proteção, e armazenamento dos espermatozoides, funções importantes para que espermatozoides íntegros participem do processo de reprodução e fertilidade (DA SILVA *et al.*, 2006; JOHNSON; HOWARDS, 1977; LEVINE; MARSH, 1971). A absorção e secreção de água no epitélio epididimário é intensa, sendo este processo responsável pela concentração de íons, solutos orgânicos e proteínas dentro e fora do lúmen (HERMO; ROBAIRE; ORGEBIN-CRIST, 2006). Estudos mostraram que o aumento da concentração de alguns solutos orgânicos presentes na cabeça e cauda do epidídimo de ratos (HINTON; SETCHELL, 1978; HINTON; WHITE; SETCHELL, 1980), não correspondem, necessariamente, ao aumento na secreção desses solutos, mas unicamente ao movimento de água, como acontece com a carnitina e o inositol, indicando os processos de secreção, absorção e reabsorção de água, como fatores que influem na concentração de substâncias no lúmen do ducto.

Canais proteicos de água, as aquaporinas (AQPs), estão envolvidas no rápido transporte de fluidos em diferentes epitélios e são essenciais para a regulação da homeostase hídrica (AGRE; KOZONO, 2003). Em mamíferos as AQPs estão classificadas em dois grupos: aquaporinas, canais altamente seletivos para transporte de água (AQP0, AQP1, 2, 4, 5, 6 e 8) e as aquagliceroporinas, que são canais de água permeáveis também a glicerol, ureia e outras pequenas moléculas (AQP3, 7, 9 e 10) (DA SILVA *et al.*, 2006; KING; KOZONO, 2004; ZHANG *et al.*, 2012).

A AQP1 não é expressa no epitélio epididimário de ratos, porém foi mostrada a expressão desse canal seletivo de água, nas células endoteliais de canais vasculares presentes no espaço intersticial do ducto. Essa AQP é também expressa nas células endoteliais dos canais vasculares dos ductos eferentes, bem como nas células não-ciliadas do epitélio destes ductos (BADRAN; HERMO, 2002). No espaço intertubular a AQP1 deve remover a água e assim manter seu equilíbrio neste sítio. A remoção de água

do lúmen dos ductos eferentes deve concentrar os espermatozoides no segmento inicial do epidídimo, afim de prover melhor interação da superfície dos espermatozoides com os produtos de secreção das células epiteliais, especialmente no segmento inicial onde os espermatozoides começam a adquirir as propriedades de maturação (BADRAN; HERMO, 2002).

A AQP9 é expressa no epitélio de todas as regiões do epidídimo, e certamente é a aquaporina mais predominante nesse tecido, com maior expressão na membrana apical e estereocílios das células principais do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do ducto (BADRAN; HERMO, 2002; DA SILVA *et al.*, 2006). No epidídimo, a água deve ser transportada do lúmen através da AQP9, expressada nas células principais e claras, sendo removida do espaço intertubular pela AQP1 dos canais vasculares e das células peritubulares. A remoção de água do lúmen do segmento inicial e cabeça deve concentrar os espermatozoides para aumentar sua capacidade de maturação; na cauda, deve permitir um espaço eficiente para a interação da imobilina, secretada pelas células principais, com os espermatozoides estocados neste segmento (BADRAN; HERMO, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

As AQPs 1 e 9 parecem ser diferencialmente reguladas e expressadas. A AQP1 não é regulada nem por andrógenos, nem por estrógenos no ratos, mas parece ser constitutivamente expressa. Diferentemente, a AQP9 é regulada por hormônios andrógenos na cabeça do epidídimo de rato, enquanto no epitélio dos ductos eferentes é modulada por estrógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

5.6- A OBESIDADE, A INFLAMAÇÃO E O EPIDÍDIMO

A Inflamação é outro fator que pode ser associado à obesidade, já que nesta se mantém um estado inflamatório crônico de baixa intensidade. Isso se deve ao fato do tecido adiposo unilocular produzir uma série de citocinas ou adipocitocinas que estão envolvidas no processo inflamatório (LOPES, 2007).

A obesidade prejudica a homeostase metabólica sistêmica e, assim, induz uma resposta de estresse (HOTAMISLIGIL, 2006), o qual é associado ao desenvolvimento de obesidade e, mais especificadamente, obesidade visceral.

O estresse crônico induzido por obesidade perturba o balanço entre as funções metabólicas e imunes.

A resposta inflamatória é uma ação biológica a uma variedade de injúrias teciduais, incluindo aquelas mediadas por patógenos, irritantes, disfunção celular e trauma físico. Quando bem sucedida, resulta em retenção inicial da injúria, seguida de maneira ideal por sua remoção e restauração da homeostase tecidual em um processo chamado de resolução. A própria inflamação é um processo altamente complexo envolvendo a ação coordenada de múltiplos tipos celulares, residentes e recrutados. Mudanças fisiológicas resultantes de alterações na perfusão vascular, na permeabilidade e na produção de mediadores locais de inflamação (esteroides, citocinas, quimocinas, fatores de crescimento e lipídios), promovem o influxo de células imunes (leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos). Estas células atuam como efetores e reguladores de inflamação, gerando e liberando espécies antimicrobiais reativas e enzimas líticas, assim como mediadores inflamatórios, resultando na fagocitose de patógenos e iniciando o processo de reparo e remodelação tecidual (KARALIS *et al.*, 2009).

A secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo pode atuar como um estímulo crônico adicional para ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. A secreção e a regulação destes fatores, por adiposidade crescente, fundamentam a hipótese de um processo inflamatório contínuo, de baixo-grau, durante obesidade (TSUKUMO *et al.*, 2007).

A principal contribuição da natureza inflamatória da obesidade foi a identificação do TNF- α (FEINSTEIN *et al.*, 1993), e da IL-6 (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003), citocinas expressadas no tecido adiposo. As citocinas atuam como moduladores imunes; são uma família complexa de proteínas, de massa molecular baixa, reguladoras do processo de recrutamento de leucócitos, importantes no processo inflamatório (GUAZZONE *et al.*, 2009). Além de citocinas pró-inflamatórias, expressadas no tecido adiposo, por adipócitos, macrófagos infiltrados ou células estromais, citocinas específicas, coletivamente chamadas adipocinas, são produzidas por adipócitos e têm efeitos biológicos locais (autócrino/parácrino) e sistêmicos (endócrino) (CAPRIO *et al.*, 2001; KERSHAW; FLIER, 2004). A identificação de alterações na expressão destes fatores, na circulação sistêmica, de pacientes com

obesidade, proporcionou mais incentivos para pesquisas sobre os mecanismos que formam a base da relação de desenvolvimento da inflamação e obesidade. Receptores imunes inatos tais como os receptores *toll-like* (TLR) 4 e TLR2 são expressados no tecido adiposo e têm expressão induzida em indivíduos obesos. Foi descoberto que ácidos graxos livres ligam-se aos receptores como TLR4, que estão diretamente ligados ao desenvolvimento de inflamação em estados de hiperlipidemia, como no caso da obesidade; a ligação dos ácidos graxos ao TLR4 leva à indução da cascata de eventos que resulta em ativação do fator do sistema *I κ B* nuclear factor *j-light-chain-enhancer of activated B cells* (NfjB) e *Jun N-terminal kinase* (JNK) e em indução, subsequente, de fatores pró-inflamatórios. Relatos de que camundongos deficientes em TLR4 não exibem qualquer sinal de inflamação após obesidade induzida por dieta (TSUKUMO *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 2008), suportam o significado deste processo.

Sabe-se que expressão de receptores para TNF- α em indivíduos obesos é duas vezes maior do que nos não-obesos, e há forte correlação entre a densidade de receptores de TNF- α , com o índice de massa corpórea e com a circunferência abdominal (KERN *et al.*, 1995), além disso, estímulos como excesso de alimentação, principalmente de alimentos ricos em gorduras saturadas, e influências ambientais como estresse crônico, podem somados, causar aumento de secreção de citocinas como Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL6) e Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF- α) (PICKUP; CROOK, 1998).

Há duas formas biologicamente ativas do TNF, sendo uma delas a proteína transmembrana tipo II de comprimento total, e a outra, uma forma solúvel resultante de clivagem proteolítica do TNF- α pela enzima conversora de TNF. Estas formas exercem seus efeitos pela ligação aos receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2). O TNFR1 contém um domínio citoplasmático de morte e pertence à família de receptores de morte responsáveis pela transdução de sinal de morte induzido por TNF- α através da ativação de caspases; sinais de sobrevivência e pró-inflamatórios também podem ser iniciados pela estimulação do TNFR1. Quais tipos de sinais predominam dependem do balanço de proteínas da adaptação intracelular interagindo com o TNFR1 (BLACK, 2002).

A IL6 é uma das citocinas mais potentes que promove eventos inflamatórios diretos de expansão e ativação de células T, diferenciação de células B e indução da resposta de fase aguda. As ações da IL-6 são mediadas pelo receptor (IL-6R), uma glicoproteína de 80 kDa (gp80) e uma subunidade alfa de IL-6R. Ligação de IL6 ao IL-6R leva à homodimerização de gp130, uma subunidade beta de IL6R, e à ativação das vias do sinal de transdução, gerando respostas opostas tais como crescimento e diferenciação celular ou apoptose e parada do crescimento (ORITANI *et al.*, 1999; KAMIMURA *et al.*, 2003).

Em ratos normais, IL6 é produzida pela maior parte das células somáticas testiculares: macrófagos intersticiais (KERN *et al.*, 1995; BRYNIARSKI *et al.*, 2005), células de Leydig (BOOCKFOR *et al.*, 1994), células de Sertoli (CUDICINI *et al.*, 1997; RIVAL *et al.*, 2006), células peritubulares e somáticas (POTASHNIK *et al.*, 2005). Os últimos autores demonstraram o envolvimento de gonadotrofinas e testosterona na regulação de IL-6 (POTASHNIK *et al.*, 2005).

Inflamação e infecção dos órgãos genitais masculinos são considerados importantes fatores etiológicos de infertilidade. Estima-se que 5 – 15 % dos fatores de infertilidade ou subfertilidade masculina de etiologia conhecida têm envolvimento inflamatório, infeccioso ou autoimune, que incluem formação de anticorpos antiespermáticos, orquite e epididimite (HEDGER, 2011; SCHUPPE; MEINHARDT, 2005).

Os efeitos de doenças sobre a reprodução são mais extensivamente estudados usando lipopolissacarídeos (LPS) para induzir inflamação sistêmica ou localizada, em animais experimentais (HEDGER, 2011). A observação mais comum é a diminuição de produção de andrógenos pelas células de Leydig, que pode ser atribuída a efeitos diretos de moléculas específicas de patógenos como LPS, bem como moléculas estimuladas por ele, tais como, citocinas pró-inflamatórias, interleucina - 1 β (IL1 β) e TNF, espécies reativas ao oxigênio, óxido nítrico (NO) e corticosteroides em vários níveis do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HEDGER; HALES, 2006). Além de causar efeitos sobre o testículo, com a redução na produção de androgênio, a inflamação sistêmica, por esse motivo, têm efeitos negativos sobre a função epididimária, bem como sobre a saúde geral (LIEW; MEACHEM; HEDGER, 2007).

Há relativamente poucos estudos sobre sinalização inflamatória no epidídimo. RODRIGUES *et al.* (2008) relataram que administração sistêmica de LPS induziu a ativação de *NfjB* e a superregulação de vários genes responsivos à inflamação, incluindo IL1 β , no epidídimo de rato. Contudo, expressão de TLR4 também foi localizada em macrófagos, no estroma epididimário, sendo talvez uma resposta do próprio epitélio. Estudos com administração de LPS mostraram que não há alterações morfológicas grosseiras do epidídimo, mas um aumento de espermátides redondas no lúmen epididimário como resultado de liberação precoce de células espermatogênicas (LIEW; MEACHEM; HEDGER, 2007; O'BRYAN *et al.*, 2000). Contudo, muitas alterações funcionais potenciais não podem ser facilmente detectáveis em microscopia de luz e este problema merece melhor esclarecimento. Injeção de LPS diretamente na cabeça do epidídimo causa aumento na expressão de IL1 β , hiperemia, edema e acúmulo de leucócitos intersticiais, junto com danos inflamatórios não específicos localizados no corpo do epidídimo, motilidade espermática reduzida e diminuição da expressão de várias, defensinas β , proteínas antimicrobianas produzidas endógenamente (HEDGER, 2011).

6- OBJETIVOS

6.1- OBJETIVO GERAL

Verificar o impacto da obesidade induzida por dieta de cafeteria sobre o epidídimo da via espermática de ratos *Wistar* adultos.

6.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as características epiteliais de segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do ducto epididimário de ratos *Wistar* adultos, com obesidade induzida por dieta de cafeteria, através de análises morfométricas;

Avaliar, através de reações imunohistoquímicas, a expressão de citocinas (Interleucina-6) e de aquaporinas (1 e 9), no epitélio do segmento inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo dos animais, tratados com dieta de cafeteria.

7- REFERÊNCIAS

ABOUD-HAILA, A., FAIN-MAUREL, M.A. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization.

The Anatomical Record. v. 209, p. 197-208, 1984.

ADAMALI, H.I., HERMO, L. Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution and functions in the adult rats epididymis.

Journal of Andrology. Montreal, v. 17, p. 208-222, 1996

ADAMAPOULOS, D.A. *et al.* Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977- 1993. **Human Reproduction**. Oxford, v.11, p.1936-1941, 1996.

AKINGBEMI, B. T. Estrogen regulation of testicular function. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 51, c.3, 2005.

ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M. Z. Introdução à epidemiologia; **Introduction to epidemiology**. 2002.

AMJAD, A.I., SODER, O., SULTANA, T. Role of testicular interleukin-1a in testicular physiology and disease. **Journal of the College of Physicians and Surgeons**. Pakistan, v.16, p. 55–60, 2006.

AMERICAN SOCIETY REPRODUCTION MEDICAL. Obesity and reproduction: an educational bulletin. **Fertility and Sterility**, v. 90, n.5, p. 21-29, 2008.

ANJOS, L. A. Obesidade e saúde pública. **Fiocruz**, 2006. ISBN 8575410822.

AGGERHOLM, A. S. *et al.* Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 3, p. 619-626, 2008.

AGRE, P., KOZONO, D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. **FEBS Letters**, v. 555, p. 72-78, 2003 [PubMed: 14630322]

ARCHER, Z. A.; MERCER, J. G. Brain responses to obesogenic diets and diet-induced obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 66, n. 1, p. 124-130, 2007. ISSN 0029-6651.

AUGER, J., KUNSTMANN, J.M., CZYGLIK, F., JOUANNET, P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **The New England Journal of Medicine**, France, v. 5, p. 332:281, 1995.

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, **Journal of Andrology**, Montreal, v. 23, p. 358–373, 2002.

BAKOS, H. *et al.* The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. **International Journal of Andrology**, v. 34, n. 5pt1, p. 402-410, 2011. ISSN 1365-2605.

BARROS, J. A. C. Pensando o processo saúde doença: a que responde o modelo biomédico. **Saúde e Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 67-84, 2002.

BARROS FILHO, A. A. Um quebra-cabeça chamado obesidade. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v. 80, n. 1, p. 1-2, 2004.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. Supl 1, p. 181-91, 2003.

BENOIT, J. Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétrices du testicule chez les mammifères. **Archives of Anatomy Histology and Embryology**, v.5, p.175-412, 1926.

BEU, C.; ORSI, A.; DOMENICONI, R. Structure of the lining epithelium of the cauda epididymis of the golden hamster. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 49-57, 2009.

BINDER, M. K., HANNAM, M. J., GARDNER, D. K. Paternal diet-induced obesity retards early mouse embryo development, mitochondrial activity and pregnancy health. **Plos One**, San Francisco, v.7 , p.1-10, 2012.

BOOCKFOR, F., WANG, D., LIN, T., NAGPAL, M. L., SPANGELO, B. L. Interleukin-6 secretion from rat Leydig cells in culture. **Endocrinology**, v. 134, n. 5, p. 2150-2155, 1994.

BORNSTEIN, S.R., RUTKOWSKI, H., VREZAS, I. Cytokines and steroidogenesis. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 215, p. 135–141, 2004.

BOUCHARD, C.; HALPERN, A.; DA COSTA, R. F. Atividade física e obesidade. **Manole**, 2003.

BLACK, R.A. Tumor necrosis factor- α converting enzyme. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1–5, 2002.

BRAY, G. A. Obesity and reproduction. **Human Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 26-32, 1997.

BRÊTAS, A.C.P.; GAMBA, M.A. Enfermagem e saúde do adulto. Barueri: **Manole**, 2006.

BRYNIARSKI, K., SZCZEPANIK, M., PTAK, M., PTAK, W. The influence of collagenase treatment on the production of TNF- α , IL-6 and IL-10 by testicular macrophages. **Journal of immunological methods**, v. 301, n. 1, p. 186-189, 2005.

BROWN, D., KATSURA, T., KAWASHIMA, M., VERKMAN, A.S., SABOLIS, I. Cellular Distribution of the aquaporins: a family of water channels proteins. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 104, n.1, p. 1-9, 1995.

CABALLERO, B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiologic reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 2007.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-591, 2004.

CAPRIO, M., FABBRINI, E., ISIDORI, A. M., AVERSA, A., FABBRI, A. Leptin in reproduction. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.12, n. 2, 2001.

CUDICINI, C., LEJEUNE, H., GOMEZ, E., BOSMANS, E., BALLEST, F., SAEZ, J., JEGOU, B. Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and-6. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 5, p. 1426-1433, 1997.

CHAN, J. *et al.* The central roles of obesity-associated dyslipidaemia, endothelial activation and cytokines in the metabolic syndrome-an analysis by structural equation modelling. **International journal of obesity**, v. 26, n. 7, p. 994-1008, 2002.

CONSULTATION, W. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **World Health Organization technical report series**, n. 894, 2000.

CORNWALL, G. A. New insights into epididymal biology and function. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 2, p. 213-227, 2009.

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. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. Supl. 2, p. 332-340, 2008.

CHEUNG, K. H., LEUNG, M.C., SHUM, W.W., ZHOU, W. L., WONG, P.Y. Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. **Journal of General Physiology**, v. 125, n. 443-454, 2005.

DA SILVA, N. *et al.* Relocalization of the V-ATPase subunit to the apical membrane of epididymal clear cells of mice deficient in the B1 subunit. **American Journal of Physiol Cell Physiol**, v. 293, p. 199-210, 2007.

DA SILVA *et al.* Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 427-438, 2006.

DANDONA, P. *et al.* Metabolic Syndrome A Comprehensive Perspective Based on Interactions Between Obesity, Diabetes, and Inflammation. **Circulation**, v. 111, n. 11, p. 1448-1454, 2005.

DAVI, G., FALCO, A. Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. **J Lupus**, v. 14, n. 9, p. 760-764, 2005. ISSN 0961-2033.

DE., S.K., CHEN, H.L, PACE, J.L., HUNT, J.S., TERRANOVA, P.F., ENDERS, G.C. Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. **Endocrinology**, v. 133, p. 389–396, 1993.

DIEMER, T., HALES, D.B., WEIDNER, W. Immune-endocrine interactions and Leydig cell function: The role of Cytokines. **Andrologia**, v. 35, p. 55–63, 2003.

DYM, M., ROMRELL, L. J. Intraepithelial lymphocytes in the reproductive tract of rats and rhesus monkeys. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, p. 1-7, 1975.

EDMONDS, E. S.; DALLIE, S. K.; WITHYACHUMNARNKUL, B. Reproductive system of the obese male zucker rat. Reproductive capacity, artificial insemination and plasma testosterone levels. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 4, p. 891-897, 1982.

ESTATÍSTICA, I. B. D. G. E. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios: Um panorama da saúde no Brasil. Acesso e utilização de serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde 2008. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Rio de Janeiro, 2010.

EZER, N.; ROBAIRE, B. Androgenic regulation of the structure and functions of the epididymis. **The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice**, p. 297-316, 2001.

FAZENDA, I. C. A. **Integração e interdisciplinaridade no ensino brasileiro: efetividade ou ideologia?** Edições Loyola, 2002.

FEINSTEIN, R., KANETY, H., PAPA, M. Z., LUNENFELD, B., KARASIK, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 35, p. 26055-26058, 1993.

FERREIRA, V. A.; MAGALHÃES, R. Obesidade no Brasil: tendências atuais. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 71-81, 2006.

FERNANDEZ, C. D. *et al.* Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reproductive of Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 32, 2011.

FOGEL, R.W. Nutrition and the Decline in Mortality since 1700: Some Preliminary Findings. **University of Chicago Press**, p. 439 – 556, 1986

FLEMING, R. F. The preconceptional contraception paradigm: obesity and infertility. **Human Reproduction**, v. 22, c. 4, p. 912-915, 2007.

FLEURY-TEIXEIRA, P. *et al.* Autonomia como categoria central no conceito de promoção de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. Supl 2, p. 2115-2122, 2008.

FREEDMAN, D. S. *et al.* The relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. **Pediatrics**, v. 103, n. 6, p. 1175-1182, 1999.

FRENOUX, J. *et al.* Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 33, n. 2, p. 361-375, 2004.

FRUNGIERI, M.B., CALANDRA, R.S., LUSTIG, L., MEINEKE, V., KÖHN, F.M., VOGT, H.J, MAYERHOFER, A. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 298–306, 2002a.

FRUNGIERI, M.B., WEIDINGER, S., MEINEKE, V., KÖHN, F.M.,
MAYERHOFER, A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by
PAR2 COX2, prostaglandins, and PPARg: Possible relevance to human fibrotic
disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, .v.99,
p.15072–15077, 2002b.

GADAMER, H. G. O mistério da saúde: o cuidado da saúde e a arte da
medicina. **Edições 70**, 1997.

GENEVA, W. 1. World Health Organisation: Ottawa charter for health
promotion. **Journal Health Promotion**, v. 1, p. 1-4, 1986.

GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. **São Paulo**, v. 4, 2002.

GORAN, M. I. Metabolic precursors and effects of obesity in children: a decade
of progress, 1990-1999. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p.
158-171, 2001.

GHANAYEM, B. I. *et al.* Diet-induced obesity in male mice is associated with
reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity.
Biology of reproduction, v. 82, n. 1, p. 96-104, 2010.

GUAZZONE, V.A., JACOBO, P., THEAS, M.S., LUSTIG, L. Cytokines and
Chemokines in Testicular Inflammation: A Brief Review. **Microscopy research
and Technique**, v. 72, p. 620–628, 2009.

HAFFNER, S.M., VALDEZ, R.A., STERN, M.P., KATZ, M.S. Obesity, body fat
distribution and sex hormones in men. **International Journal of Obesity and
Related Metabolic Disorders**, v. 17, p. 643-649, 1993.

HAKORVITA, H., SYED, V., JÉGOU, B., PARVINEN, M. Function of interleukin-
6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous
epithelium. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 108, p. 193–198, 1995.

HALES, D.B. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 3 –18, 2002.

HALES DB, DIEMER T, HALES KH. Roles of cytokines in testicular function. **Endocrine** v. 10, p. 201–217, 1999.

HAMMOUD, A. O. *et al.* Obesity and male reproductive potential. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 5, p. 619, 2006.

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. **Fertility and Sterility**, Utah, USA, v. 90, n. 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. **Fertility and Sterility**, Utah, USA, v. 90, n. 6, p. 2222-2225, 2008b.

HAWKES, C. Uneven dietary development: linking the policies and processes of globalization with the nutrition transition, obesity and diet-related chronic diseases. **Global Health**, v. 2, n. 1, p. 4, 2006.

HEDGER, M.P. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 625-640, 2011.

HEDGER, M.P., MEINHARDT, A. Cytokines and the immune-testicular axis. **Journal Reproduction Immunology**, v. 58, p. 1–26, 2003.

HEDGER, M. P., HALES, D.B. Immunophysiology of the male reproductive tract. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Amsterdam. The Netherlands: **Elsevier**; 1195-1286, 2006.

HERMO, L., OKO, R., MORALES, C.R., Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **International Review of Cytology**, v. 154, p.106-189, 1994.

HERMO, L., PAPP, S., Effects of ligation, orchidectomy, and hypophysectomy on expression of the Yf subunit of GST-P in principal and basal cell shape and overall arrangement. **The Anatomical Record**, v. 244, p. 59-69, 1996.

HERMO, L., ROBAIRE, B., Epididymis cell types and their function. **In The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice** (B. Robaire and B. T. Hinton, Eds) pp. 81-102. Kluwer Academic/Plenum, New York, 2002.

HERMO, L., SMITH, C.E. Thirsty business: cell, region, and membrane specificity of aquaporins in the testis, efferent ducts, and epididymis and factors regulating their expression. **Journal of Andrology**, v.32, n.6, p. 565-575, 2011.

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 excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract, **Journal of Andrology**, v. 18, p. 602–611, 1997b.

HINTON, B. T., SETCHELL, B. P. Fluid movement in the seminiferous tubules and the epididymal duct of the rat. **Journal of Physiology**, v. 284, p. 16-17, 1978.

HINTON, B. T., WHITE, R. W., SETCHELL, B. P. The concentration of free myo-inositol in the luminal fluid of mammalian testis and epididymis. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 58, p. 395-399, 1980.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

HUTCHINSON, J.P., RAJAGOPAL, S.P., SALES, K.J, JABBOUR, H.N. Molecular regulators of resolution of inflammation: potential therapeutic targets in the reproductive system. **Reproduction**, v. 142, p. 15-28, 2011

- ISIDORI, A. M. *et al.* Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis. **Clinical Endocrinology**, v. 63, n. 3, p. 280-293, 2005.
- IUNES, R.F. Mudanças no cenário político-econômico. Monteiro, CA, org. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. **São Paulo: Hucitec**, 1995.
- JOSEPH, A., SHUR, B.D., HESS, R.A. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 84(2), p. 207–217, 2011.
- JHONSON, A. L., HOWARDS, S. S. hyperosmolality in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis: a micropuncture study. **Science**, v. 195, p. 492-493, 1977.
- KAMIMURA, D., ISHIHARA, K., HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: The signal orchestration model. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v.149, p.1–38, 2003.
- KARALIS, K.P., GIANNOGONAS, P., KODELA, E., KOUTMANI, Y., ZOUMAKIS, M., TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, p. 5747–5754, 2009.
- KASTURI, S. S.; TANNIR, J.; BRANNIGAN, R. E. The metabolic syndrome and male infertility. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 3, p. 251-259, 2008. ISSN 1939-4640.
- KERN, P. A. *et al.* The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2111, 1995.
- KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

- KING, L.S., AGRE, P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. **Annual Review of Physiology**, v. 58, p. 619-648, 1996.
- KING, L.S., YASUI, M., AGRE, P. Aquaporins in health and disease. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p. 60-65, 2000.
- KING, L. S., KOZONO, D., AGRE, P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 687-698, 2004.
- KORT, H. I. *et al.* Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 3, p. 450, 2006.
- KYROU, I., TSIGOS, C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. **Hormones (Athens)**, v. 93, n. 4, p. 287, 20078
- LEE, M.O. **American Journal of Physiology**, v. 89, p. 24, 1929.
- LEVIN, B. E., DUNN-MEYNELL, A.A., McMINN, J.E., ALPEROVICH, M., CUNNINGHAM-BUSSEL, A., CHUA, Jr. A new obesity-prone, glucose-intolerant rat strain (F.DIO). **American Journal of Physiology**, v. 285, p. 1184–1191, 2003.
- LEVIN, B.E., DUNN-MEYNELL, A.A., RICCI, M.R., CUMMINGS, D.E. Abnormalities of leptin and ghrelin regulation in obesity-prone juvenile rats. **American Journal of Physiology**, v. 285, p. 949–957, 2003.
- LEVINE, N., MARSH, D.J. Micropuncture studies of eletrochemical aspects of fluid and eletrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deefrens in rats. **Journal of Physiology**, v.213, p. 557-570, 1971.
- LI, X., STRAUSS, L., KAATRASALO, A., MAYERHOFER, A., HUHTANIEMI, I., SANTTI, R., MÄKELÄ, S., POUTANEN, M. Transgenic mice expressing p450 aromatase as a model for male infertility associated with chronic inflammation in the testis. **Endocrinology**, v. 147, p. 1271–1277, 2006.

LIEW, S.H., MEACHEM, S.J, HEDGER, M.P. A stereological analysis of the response of spermatogenesis to an acute inflammatory episode in adult rats. **Journal of Andrology**, v. 28, p.176-185, 2007.

LOPES, F. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14, n. 4, p. 239-244, 2007.

LUI, W.Y., CHENG, C.Y. Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis. A molecular and biochemical perspective. **Cytokine Growth Factor Review**., v. 18, p. 299–311, 2007.

LYSIAK, J.J. The role of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1–10, 2004.

MAH, P.M., WITTERT, G.A. Obesity and testicular function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2009.

MALTA, D. C.; CEZÁRIO, A. C.; MOURA, L. A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, n. 3, p. 47-65, 2006.

MAMMI, C., CALANCHINI, M., ANTELMINI, A., CINTI, F., ROSANO, G. M. C., LENZI, A., CAPRIO, M., FABBRI, A. Androgens and adipose tissue in males: a complex and reciprocal interplay. **Internacional Journal of Endocrinology**, New York, p. 1-8, 2012.

MANDENOFF, A. *et al.* Action of naltrexone on the sexual impairment of obese cafeteria rats. **NIDA Res Monography**, v. 75, p. 489-492, 1986.

MARTIRE, S. I., HOLMES, N., WESTBROOK, R. F., MORRIS, M. J. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet; Increase snacking and its implications for development of obesity. **Plos One**, v. 8 (4): e60407, 2013.

MAYES, J.; WATSON, G. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. **Obesity Reviews**, v. 5, n. 4, p. 197-216, 2004.

MEINEKE, V., FRUNGIERI, M.B., JESSBERGER, B., VOGT, H.
MAYERHOFER, A. Human testicular mast cells contain tryptase: Increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. **Fertility Sterility**, v. 74, p. 239–244, 2000

N. DA SILVA *et al.* Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. **Biochimica et Biophysica Acta** 1758, p. 1025-1033, 2006.

NELSON, S.M., FLEMING, R. Obesity and reproduction: impact and interventions. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v.19, n. 4, p.384-389, 2007.

NGUYEN, R. H. *et al.* Men's body mass index and infertility. **Human Reproduction**, v. 22, n. 9, p. 2488-93, 2007.

O'BRYAN, M.K., SCHLATT, S., PHILLIPS, D.J., KRETZER, D.M., HEDGER, M. P. Bacterial lipopolysaccharide-induce inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. **Endocrinology**, v.141, p.238-246, 2000.

OUDE LUTTIKHUIS, H. *et al.* Interventions for treating obesity in children. **Cochrane Database System Review**, v. 1, n. 1, 2009.

OLIVEIRA, C.A., CARNES, K., FRANÇA, L. R., HERMO, L., HESS, R.A. Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. **Biology of the Cell**, Britain, v. 97, p. 385-395, 2005.

ORITANI, K., TOMIYAMA, Y., KINCADE, P.W., AOYAMA, K., YOKOTA, T., MATSUMURA, I., KANAKURA, Y., NAKAJIMA, K., HIRANO, T., MATSUZAWA, Y. 1999. Both Stat3-activation and Stat3-independent bcl-2 downregulation are important for interleukin-6-induced apoptosis of 1A9-M cells. **Blood**, v. 93, p.1346–1354, 1999.

PALMA, A. Atividade física, processo saúde-doença e condições sócio-econômicas: uma revisão da literatura. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 14, n. 1, p. 97-106, 2000.

PASQUALI, R. Obesity and androgens: facts and perspectives. **Fertility and Sterility**, v. 85 (5), p.1319-1340, 2006.

PASQUALI, R., PATTON, L., GAMBINERI, A. Obesity and infertility. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 14, n. 6, p. 482-487, 2007.

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. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 384-393, 2001.

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.

PATARRA, N. L.; MONTEIRO, C. Mudanças na dinâmica demográfica. **Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças**, v. 2, p. 61-78, 1995.

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

PEGO-FERNANDES, P. M.; BIBAS, B. J.; DEBONI, M. Obesity: the great epidemic of the 21st century? **Sao Paulo Medical Journal**, v. 129, n. 5, p. 283-284, 2011.

PEÑA, M.; BACALLAO, J. La obesidad en la pobreza: un nuevo reto para la salud pública. **Pan American Health Organization**, 2000.

PENTIKAINEN, V., ERKKILÄ, K., SUOMALAINEN, L., OTALA, M., PENTIKÄINEN, M.O., PARVINEN, M., DUNKEL, L. TNFa down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 4480–4488, 2001.

PEREIRA, L.O. Protocolo de indução de obesidade em ratas a partir do perfil de ingestão alimentar de mulheres obesas brasileiras. **Campinas**, 2002.

PEREIRA, L.O. FRANCISCHI, R.P., KLOPFER, M., SAWADA, L.A., SANTOS, R., VIEIRA, P. Obesidade e suas Implicações—Ação da Atividade Física e Controle Nutricional. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.14, p. 9-17, 1999.

PEREIRA, L.O., FRANCISCHI, R.P.D., LANCHETA JR, A.H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.47, p. 111-127, 2003.

PICKUP, J.; CROOK, M. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v. 41, n. 10, p. 1241-1248, 1998.

PINHEIRO, A. R. O., FREITAS, S. F. T., CORSO, A.C.T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, 2004 .

POTASHNIK, H. *et al.* Interleukin-6 expression during normal maturation of the mouse testis. **European Cytokines Network**, v. 16, n. 2, p. 161-165, 2005.

PRADA, P.O. *et al.* Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**. v.146, n. 3, p.1576-87. 2005.

RICCIOLI, A., STARACE, D., D’ALESSIO, A., STARACE, G., PADULA, F., DE CESARIS, P., FILIPPINI, A., ZIPARO, E. TNF- α and IFN- γ regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 743–749, 2000.

RIVAL, C., THEAS, M.S., GUAZZONE, V.A., LUSTIG, L. Interleukin-6 and IL6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 70, p. 43–58, 2006.

ROBAIRE, B., HINTON, B. T., ORGEBIN-CRIST, M.C. The Epididymis. **Physiology of Reproduction**. Elsevier, 3^o ed., c. 22, p. 1071-1148, 2006.

ROBAIRE, B., HERMO, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. **The physiology of reproduction**, v. 1, p. 999-1080, 1988.

RODRIGUES, A., QUEIRÓZ, D. B., HONDA, L., SILVA, E. J., HALL, S. H., AVELLAR, M. C. Activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by in vivo and in vitro exposure of rat epididymis to lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 1135-1147, 2008.

RODRÍGUEZ, C. M. *et al.* The development of the epididymis. **The Epididymis-from molecules to clinical practice**, p. 251-268, 2001.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S.; MORAES, C. D. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. **Revista da Associação Medica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45777-45784, 2003.

SAEZ, F. *et al.* Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. **Journal for Asian Society of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 574-582, 2007.

SALLMEN, M. *et al.* Reduced fertility among overweight and obese men. **Epidemiology**, v. 17, n. 5, p. 520-523, 2006.

SERRE, V., ROBAIRE, B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 497-513, 1998.

SIU, M.K., LEE, W.M., CHENG, C.Y. The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- α , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. **Endocrinology**, v. 144, p. 371–387, 2003.

SCHELL, C., ALBRECHT, M., MAYER, C., SCHWARZER, J.U., FRUNGIERI, M.B., MAYERHOFER, A. Exploring human testicular peritubular cells: Identification of secretory products and regulation by TNF α . **Endocrinology**, v. 149, p. 1678–1686, 2008.

SCHUPPE, H.C., MEINHARDT, A. Immune privilege and inflammation of the testis. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 88, p. 1–14, 2005.

SCHUPPE, H.C., MEINHARDT, A., ALLAM, J.P., BERGMANN, M., WEIDNER, W., HAIDLG. Chronic orchitis: A neglected cause of male infertility? **Andrologia**, v. 40(2), p. 84–91, 2008.

SCLIAR, M. **Do mágico ao social: trajetória da saúde pública**. Senac, 2002.

SCLIAR, M. História do conceito de saúde. **Physis**, v. 17, n. 1, p. 29-41, 2007.

SHUM, W.W., DA SILVA, N., BRETON, S. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1753-1761, 2009.

SHUM, W.W. *et al.* Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. **Cell**, v. 135, p. 1108-1117, 2008.

SMITHWICK, E. B., YOUNG, L. G. Sequential histology of the adult chimpanzee epididymis. **Journal Tissue and Cell**, Atlanta, v. 29, c. 4, p. 383–412, 1997.

SPIESS, A.N., FEIG, C., SCHULZE, W., CHALMEL, F., CAPPALLO-OBERMANN, H., PRIMIG, M., KIRCHHOFF, C. Cross-platform gene expression signature of human spermatogenic failure reveals inflammatory-like response. **Human Reproduction**, v. 22, p. 2936–2946, 2007.

STÉPHAN, J.P., SYED, V., JÉGOU, B. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 134, p. 109–118, 1997.

STOTHARD, K. J. *et al.* Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies. **Journal of the American Medical Association**, v. 301, n. 6, p. 636-650, 2009.

STRAUB, R. H., HENSE, H. W., ANDUS, T., SCHOLMERICH, J., RIEGGER, G. A. J., SCHUNKERT, H. Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 3, p. 1340-1344, 2000.

STUNKARD, A. J. Factores determinantes de la obesidad: opinión actual. *In: La obesidad en la pobreza: un novo reto para la salud pública.* Washington DC: **Organização Panamericana da Saúde**, v. 576, p.27-32, 2000.

SUOMINEN, J.S., WANG, Y., KAIPIA, A., TOPPARI, J. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) promotes cell survival during spermatogenesis, and this effect can be blocked by infliximab, a TNF- α antagonist. **European Journal of Endocrinology**, v. 151, p. 629–640, 2007.

SVECHNIKOV, K.V., SULTANA, T., SÖDER, O. Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 182, p. 193–201, 2001.

TEIXEIRA, P. F. Uma introdução conceitual à determinação social da saúde. **Saúde em Debate**. v. 33, n. 83, p. 380 – 387, 2009.

TEIXEIRA, G. R., CHUFFA, L. G. A., MARTINS, O. A., KREMER, R., PINHEIRO, P. F. F., MELLO JR, W., MARTINEZ, M., MARTINEZ, F. E., DOMENICONI, R. F. The expression of aquaporins 1 and 9 in adult rat epididymis is perturbed by chronic exposure to ethanol. **Tissue and Cell**, v. 44, p. 47-53, 2012.

TIMM, L. L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231-9, 2005.

TUNG, K.S., YULE, T.D., MAHI-BROWN, C.A., LISTROM, M.B. Distribution of histopathology and Ia positive cells in actively induced and passively transferred experimental autoimmune orchitis. **Journal of Immunology**, v. 138:, p.752–759, 1987.

TUNG, K.S.K., FUSI, F., TEUSCHER, C. Autoimmune disease of spermatozoa, ovary and testis. In: Theofilopoulos AN, Boma AC, editors. The molecular pathology of autoimmune diseases. **USA: Routledge**, p. 1031–1045, 2002.

THEAS, S., RIVAL, C., LUSTIG, L. Germ cell apoptosis in autoimmune orchitis: Involvement of the Fas-Fas L system. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, p. 166–176, 2003.

THEAS, M.S., RIVAL, C., JARAZO-DIETRICH, S., JACOBO, P., GUAZZONE, V.A., LUSTIG, L. Tumor necrosis factor- α released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. **Human Reproduction**, v. 23, p.1865–1872, 2008.

TRASLER, J.M., HERMO, L., ROBAIRE, B. Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. **Biology of Reproduction**, v. 38, p.463-479, 1998.

TRIOLA, M. F. Introdução à estatística. **Rio de Janeiro: LTC**, v. 9, 1999.

TSUKAGUCHI, H., SHAYAKUL, C., BERGER, U.V., MACKENZIE, B., DEVIDAS, S., GUGGINO, W. B., van HOEK, A. N., HEDIGER, M. A. Molecular

characterization of a broad selectivity neutral solute channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24737-24743, 1998.

TSUKUMO, D. M. *et al.* Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1986-1998, 2007.

VIANNA, L. A. C. Processo Saúde-Doença. **Curso de Especialização em Saúde da Família–UNA-SUS| UNIFESP**, 2011.

VIGUERAS-VILLASENOR, R. M, ROJAS-CASTANEDA, J. C., CHÁVEZ-SALDANA. M., GUTIÉRREZ-PÉREZ, O., GARCÍA-CRUZ, M. E., CUEVAS-ALPUCHE, O., REYES-ROMERO. M. M., ZAMBRANO, E. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. **Acta Histochemica**, Jena, v.113, p. 214-220, 2011.

YAN, H.H.N., MRUK, D.D., LEE, W.M., CHENG, C.Y. Blood testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. **FASEB J.**, v. 22, p.1945–1959, 2008.

YEUNG, C. H., COOPER, T.G., BERGMANN, M., SCHULZE, H. Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. **American Journal of Anatomy**, v.191 , c.3 ,p. 261-79, 1991

WANG, Y.F., HOSLSTEIN, A. F. Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. **Cell Tissue Res.**, v. 233, p. 517-521, 1983.

WU H, WANG H, XIONG W, CHEN S, TANG H, HAN D. Expression patterns and functions of Toll-like receptors in mouse Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 149, p. 4402–4412, 2008.

ZHANG, F. *et al.* Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1453-1463, 2004.

ZHANG, D., TAN, Y. -J., QU, F., SHENG, J.- Z., HUANG, H. -F. Functions of water channels in male and female reproductive systems. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 676-690, 2012.

8- RESULTADOS

As análises realizadas forneceram: dados de massa corpórea e de desenvolvimento de obesidade nos grupos experimentais; bem como, dados morfométricos dos epidídimos (diâmetro luminal e altura epitelial), distribuição relativa dos tipos celulares, e expressão de IL6, AQPs 1 e 9 nos epidídimos dos animais estudados. Os resultados são descritos e apresentados, a seguir, na forma de artigo científico.

9- ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO: Obesidade induzida por dieta de cafeteria altera a expressão de interleucina 6 e de aquaporinas 1 e 9 no epidídimo de ratos *Wistar*

Obesidade induzida por dieta de cafeteria altera a expressão de interleucina 6 e de aquaporinas 1 e 9 no epidídimo de ratos *Wistar*

P.T.G. Mata^{1*}, S. L. Balbo¹, L.O. Mendes^{2,3}, R.F. Domeniconi², W.R. Scarano⁴, C.C.L. Beu⁵

1 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil;

2 Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil;

3 Programa de Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

4 Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil;

5 Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil;

* Autor Correspondente: Célia Cristina Leme Beu (C.C.L. Beu); Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Rua Universitária, 2069, CEP 85819-110, Cascavel, PR, Brasil; Tel: (045) 3220-7371, 3220-7409; e-mail: Celia.Beu@unioeste.br, celiabeu@yahoo.com

Palavras-chave

Epidídimo; Inflamação; Obesidade; Dieta hipercalórica; Aquaporinas, Epitélio epididimário

Título abreviado

Dieta de cafeteria altera IL6 e AQPS 1 e 9 epididimárias

Resumo

A ingestão de dietas hipercalóricas, como a dieta de cafeteria, pode resultar em excesso de gordura corporal e modificações do sistema endócrino que alteram as concentrações de hormônios, incluindo esteroides sexuais, podendo afetar a morfofisiologia de órgãos andrógeno-dependentes, como o epidídimo. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos dieta de cafeteria, sobre a morfologia epitelial e expressão de interleucina 6 (IL6) e aquaporinas (AQPs) 1 e 9 no ducto epididimário de ratos Wistar. Os segmentos epididimários dos ratos que receberam dietas padrão (grupo CON) e de cafeteria (CAF), durante 24 semanas, foram coletados e submetidos à rotina histológica e reações imunohistoquímicas para análise da expressão de IL6 e AQPs 1 e 9. As análises mostraram diminuição de células basais no corpo epididimário, e aumento significativo de células halo no segmento inicial, cabeça e

cauda dos animais CAF. A expressão de IL6 foi maior no segmento inicial dos animais CAF. A expressão de AQP1 nas células endoteliais dos canais vasculares aumentou no segmento inicial e cabeça do epidídimo dos animais CAF; houve diminuição da expressão da AQP9 no segmento inicial dos animais CAF. Os resultados obtidos indicam que a dieta de cafeteria alterou, de maneira segmento-específica, a distribuição relativa de células halo e basais, bem como a expressão de IL6 e AQPs 1 e 9. Tais alterações podem prejudicar as principais funções epididimárias, alterando o ambiente luminal no qual os espermatozoides estão imersos e os processos que levam a sua maturação.

Introdução

A dieta de cafeteria é composta por alimentos altamente palatáveis, ricos em gorduras, açúcar e proteínas, e reproduz experimentalmente a dieta moderna consumida por grande parte da população de países desenvolvidos (1). O consumo desta dieta, associado ao estilo de vida atual, tem contribuído para o aumento de pessoas com sobrepeso e obesidade (1). A obesidade é um problema epidêmico significativo da sociedade moderna e está associada com numerosos problemas de saúde, incluindo doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer e infertilidade, entre outros (2). Embora alguns estudos confirmem a relação entre aumento de massa corpórea e infertilidade masculina, outros estudos não. Os estudos que mostram a relação entre sobrepeso/obesidade e fertilidade masculina relacionam vários mecanismos envolvidos (3).

O tecido adiposo pode ser considerado um órgão endócrino que sintetiza e libera hormônios e citocinas que podem agir em várias partes do corpo (3); o tecido adiposo humano produz quantidades elevadas de interleucina 6 (IL6), cerca de 10 a 30% da concentração circulante (4). Em condições de sobrepeso ou obesidade, as concentrações de citocinas e adipocinas podem aumentar e resultar em distúrbios da homeostase (3). As concentrações circulantes de hormônios, incluindo os esteroides sexuais, também são modificadas pelo aumento de tecido adiposo, que dessa forma pode interferir nos processos reprodutivos (5).

O epidídimo, órgão andrógeno-dependente, é um ducto único, altamente enovelado, constituído por vários tipos celulares (células principais, basais, apicais, delgadas, células claras e células halo), responsáveis pela criação de ambientes luminiais variados ao longo de sua extensão e tem as funções de receber, transportar, proteger, maturar, manter e estocar os espermatozoides provenientes dos testículos via ductos eferentes (6, 7, 8). As integridades funcional e morfológica do epitélio

epididimário garantem que sejam produzidas diferentes proteínas, glicoproteínas, glicolipídios e fosfolipídeos que interagem e modificam os espermatozoides que sofrem maturação no lúmen epididimário (5, 6). O epitélio também regula o processo de concentração dos espermatozoides através da manutenção do ambiente luminal, controlando o transporte, absorção e secreção de água (9, 10). As aquaporinas (AQPs), canais proteicos de água, estão envolvidas no transporte rápido de fluidos em diferentes epitélios (11), incluindo o epitélio epididimário; assim, as AQPs estão envolvidas com o movimento de água que é um passo crucial para o estabelecimento da fertilidade masculina (9). Alterações das AQPs e do próprio epidídimo, que tem um papel crítico na maturação dos espermatozoides e em outras funções relacionadas, podem levar diretamente à infertilidade.

A hipótese desse estudo foi que a obesidade, induzida por dieta de cafeteria, afeta a função epididimária, alterando a morfologia e expressão de AQPs e IL6 no epidídimo de ratos Wistar. A distribuição dos tipos celulares que constituem o epitélio epididimário e a morfologia do ducto foram avaliadas, bem como a expressão de IL6 e de AQPs 1 e 9 em ratos que receberam dietas controle e de cafeteria.

Material e Métodos

Animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com 21 dias de idade, foram separados aleatoriamente em dois grupos (controle e cafeteria), que passaram a receber as respectivas dietas pelo período de 24 semanas. O grupo controle (CON, n = 7) recebeu dieta padrão (3,8 kcal/g, com 70% de carboidrato, 20% de proteína e 10% de gordura) e água *ad libitum*. O grupo cafeteria (CAF, n = 7) recebeu dieta de cafeteria (5,4 kcal/g, com 38,5% de carboidratos, 15% de proteínas e 46,5% de gordura) e refrigerante sem gás e água. Todos os animais foram mantidos em condição padrão de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas) e temperatura de 21°C (+/- 1°C). Os procedimentos experimentais foram aprovados (protocolo 6110/2011) pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal e Aulas Práticas (CEEAAP), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), de acordo com o Conselho Nacional de Controle de experimentação Animal (CONCEA).

Dados biométricos

Ao final das 24 semanas de experimento, os animais foram pesados e medidos para obtenção da massa corpórea (g) e do comprimento nasoanal (CNA), respectivamente. Após a morte dos animais, por decapitação, realizou-se a coleta e pesagem das gorduras retroperitoneal e perigonadal para calcular a porcentagem relativa à massa corpórea total.

Fixação, processamento e Inclusão

Após a morte dos animais, os epidídimos foram removidos e reduzidos em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. As amostras foram fixadas em solução de Methacarn (12) por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram mantidas em álcool 70 e submetidas à rotina histológica para inclusão em Paraplast Plus™ (Oxford Labware, St. Louis, MO, USA). Secções semisseriadas de 5 µm (LEICA® RM 2245, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) foram utilizadas para análises morfométricas e imunohistoquímicas.

Análises morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas utilizando 15 secções histológicas, coradas em hematoxilina/eosina (H/E), de cada segmento de cinco animais de cada grupo. A análise da distribuição quantitativa dos tipos celulares epiteliais (células principal, basal, clara, delgada e halo) do epidídimo foi realizada pela contagem da frequência em cada secção tubular e pela morfometria do diâmetro luminal e altura epitelial em ambos os grupos (7). As análises foram realizadas em microscópio de luz Zeiss Primo Star, utilizando objetiva de 40x (Carl Zeiss Microscopy®, Oberkochen, Germany).

Imunohistoquímica para detecção de IL-6 e AQPs 1 e 9

Para imunolocalização da citocina inflamatória IL6, as secções histológicas foram submetidas à recuperação antigênica em micro-ondas com tampão citrato de sódio (10 min). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 0,3% em metanol (15 min) ao abrigo de luz, e em seguida, as lâminas foram lavadas com phosphate-buffered saline (PBS), e incubadas em soro de cabra 1% e soro albumina bovino (BSA) 3%, por 1 h, para evitar reação inespecífica. Após,

as secções foram incubadas *overnight* (4°C), com os anticorpos primários anti-IL6 (1: 200, *anti-IL6 antibody*, ab6672, *Abcam Incorporation*). As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com os anticorpos secundários (polímero): anti- rabbit IgG (ref. RMR 622L, lot. 052212, *HRP-Polymer*), a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS, e reveladas com diaminobenzidina (DAB) por 50 segundos, para então serem contracoradas com Hematoxilina de Harris.

A imunolocalização de AQPs 1 e 9 foi feita em secções histológicas submetidas à recuperação antigênica, em tampão citrato de sódio em micro-ondas (15 min). Para evitar reações inespecíficas, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% em metanol (15 min) ao abrigo de luz, e em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas em BSA 3%. Após, as secções foram incubadas *overnight* em câmara úmida com os anticorpos primários anti-AQP1 (1: 200, Anti-Aquaporin 1, AB2219, Millipore Inc.) e anti-AQP9 (1:100, Anti-Rat AQP9, Alpha Diagnostic Intl. Inc.) e, em seguida, lavadas em PBS. A incubação foi feita com anticorpo secundário biotilado (1:70, Anti-Rabbit IgG whole molecule-Biotin produced in goat, Spruce Street, St. Louis, Missouri-USA), por 1 h a 37° C, seguida de lavagem em PBS para posterior revelação com DAB (40 segundos). As secções foram contracoradas com Hematoxilina de Harris.

As imagens foram capturadas em microscópio de luz Zeiss Primo Star (Carl Zeiss Microscopy® , Oberkochen, Germany) conectado a câmara Axiocam ERc 5S (Carl Zeiss Microscopy®), e as imagens digitalizadas, analisadas utilizando o *software* Image Pró-plus 6.0 – Axiovision 4.8 (Carl Zeiss®).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). A avaliação estatística foi realizada com *software* *GraphPad Prism 5*, e utilizou-se o teste *T de Student*, e quando f foi significativo, as diferenças entre as médias foram avaliadas com valor de p corrigido para *Mann-Whitney*. O nível de significância avaliado foi de $p < 0.05$.

Resultados

Análise dos Parâmetros Corporais

As análises dos parâmetros corporais mostraram que os animais tratados com dieta de cafeteria tiveram aumento de massa corpórea (33,41%) e massa das gorduras retroperitoneal (266%) e perigonadal (43,79%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de parâmetros corporais analisados no grupo CON e grupo CAF, após 24 semanas de tratamento com ração padrão e dieta cafeteria.

| Parâmetros | CON (n=7) | CAF (n=7) |
|-----------------------------------|------------|---------------|
| Massa corpórea (g) | 460,9±4,32 | 614,9±20,1*** |
| Gordura Retroperitoneal (% de MC) | 1,21±0,07 | 4,44±0,31*** |
| Gordura Perigonadal (% de MC) | 1,50±0,11 | 2,20±0,10*** |
| Comprimento nasoanal (cm) | 24,00±1,00 | 25,90±1,0 |

Os valores foram expressos em média ± Desvio Padrão. O *n* indica o número de animais experimentais. % de MC: porcentagem das gorduras em relação à massa corpórea. Diferença significativa de (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ – comparado ao grupo CON.

Distribuição Celular Relativa

A distribuição dos tipos celulares do epitélio epididimário é mostrada na figura 1. As células principais são o tipo celular predominante no epidídimo e não há diferença significativa em sua distribuição entre os grupos CON e CAF. Nos animais do grupo CAF, há aumento das células halo no segmento inicial, corpo e cauda e diminuição das células basais apenas no corpo do epidídimo (Figura 1).

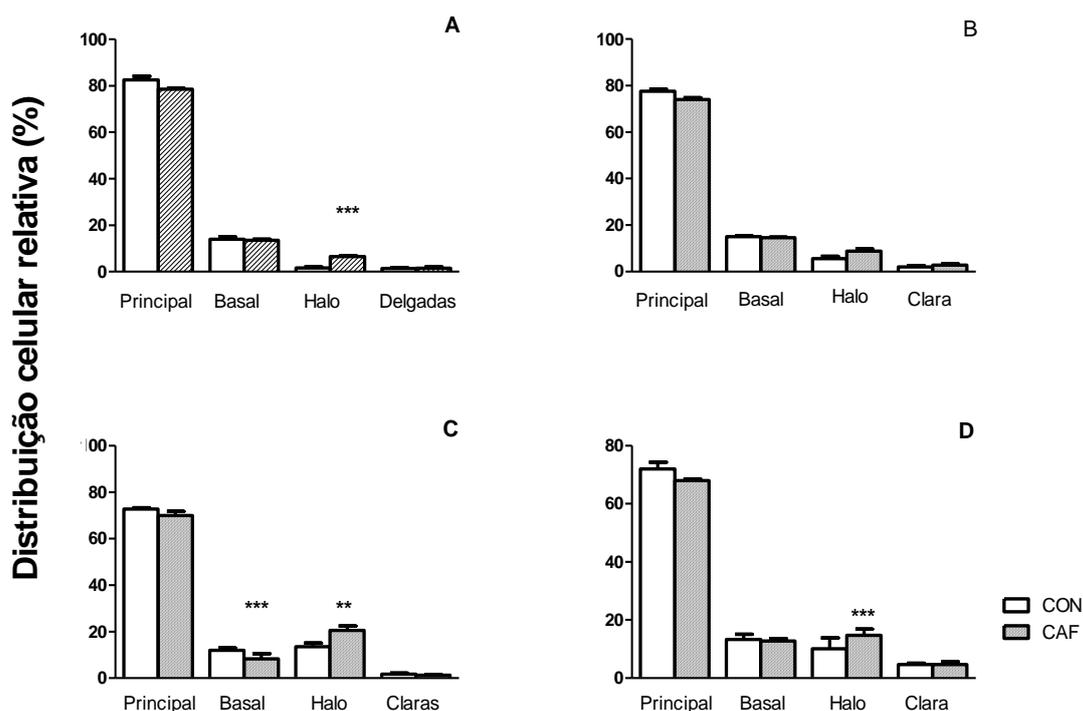


Figura 1 – Efeito do tratamento de 24 semanas com dieta de cafeteria, na distribuição celular relativa (% do total) das células principal, basal, halo, clara e delgada, no segmento inicial (A), cabeça (B), corpo (C) e cauda (D) epididimários de animais CON x CAF. Dados expressos em média ± DP. Diferença significativa de (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ – comparado ao grupo CON.

Diâmetro Luminal e Altura Epitelial

Os resultados obtidos de mensurações de diâmetro luminal (Figura 2) e altura epitelial (Figura 3) mostram que não há diferenças significativas, entre os grupos CON e CAF.

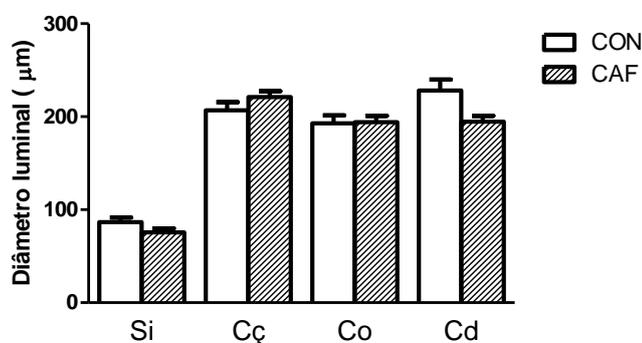


Figura 2 – Diâmetro luminal (µm) dos segmentos inicial (Si), cabeça (Cç), corpo (Co) e cauda (Cd) epididimários dos animais dos grupos CON (n=5) e CAF (n=5) após 24 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± DP.

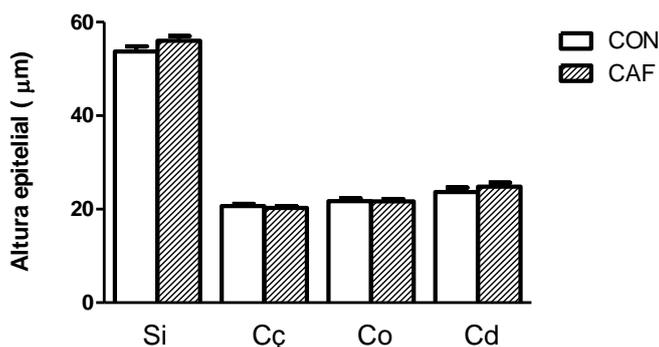


Figura 3 – Altura epitelial (µm) dos segmentos inicial (Si), cabeça (Cç), corpo (Co) e cauda (Cd) epididimários dos animais dos grupos CON (n=5) e CAF (n=5) após 24 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± DP.

Análise histológica

As análises histológicas mostram que não há alterações morfológicas marcantes e generalizadas no epitélio do ducto epididimário após tratamento com

dieta de cafeteria. No entanto, infiltrados de leucócitos, adjacentes aos canais vasculares da cabeça do epidídimo, foram observados nos animais grupo CAF (Figuras 4B, 4C e 4D); estas características não ocorrem nos segmento epididimários dos animais do grupo CON (Figura 4A).

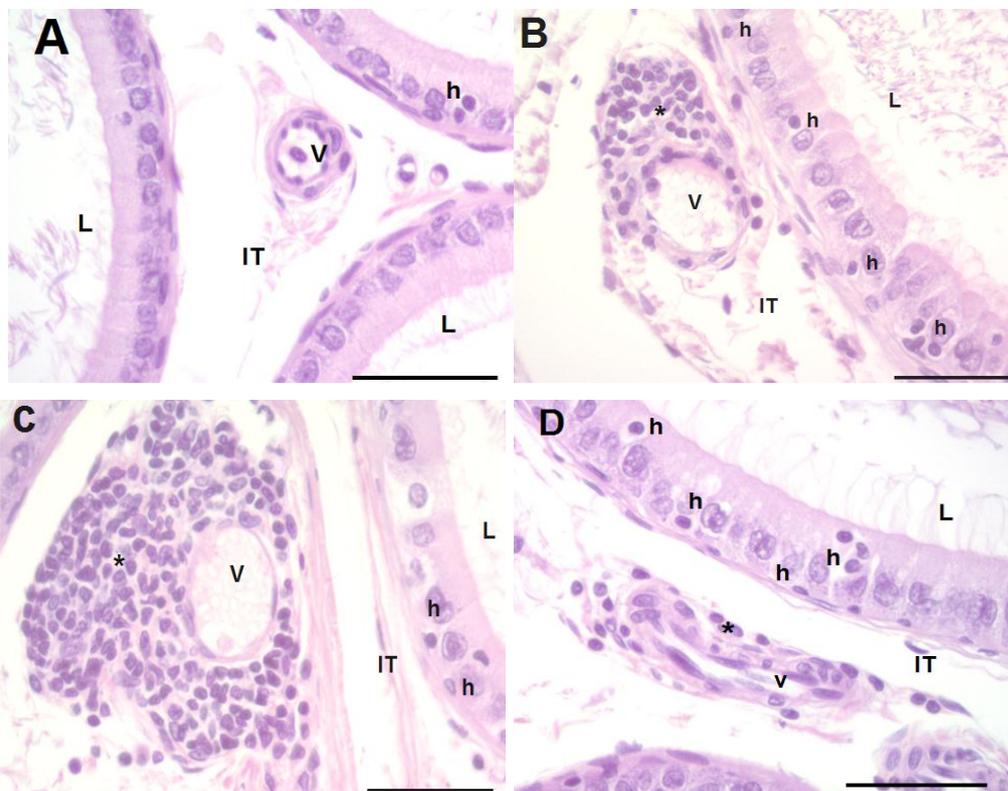


Figura 4 – Fotomicrografias da cabeça do epidídimo de ratos *Wistar* dos grupos CON (A) e CAF (B, C e D). São indicados: infiltrados leucocitários (*) adjacentes aos canais vasculares (V), lúmen (L), Interstício (IT) e células halo (h). H/E. Escala: 50 μ m.

Imunohistoquímica de IL6 e AQPs 1 e 9

A expressão de IL6 no epitélio epididimário é segmento-específica com reatividades: forte no segmento inicial do grupo CAF (Figuras 5A e 5B), moderada na cabeça epididimária de ambos os grupos (não mostrado), forte no corpo (não mostrado) e forte na cauda de ambos os grupos (figuras 5C e 5D). Maior expressão de IL6 ocorre nas organelas endocíticas das células claras da cauda epididimária dos animais CAF, com menor reatividade de tais organelas localizadas apicalmente nas células claras dos animais CON (Figuras 5C e 5D).

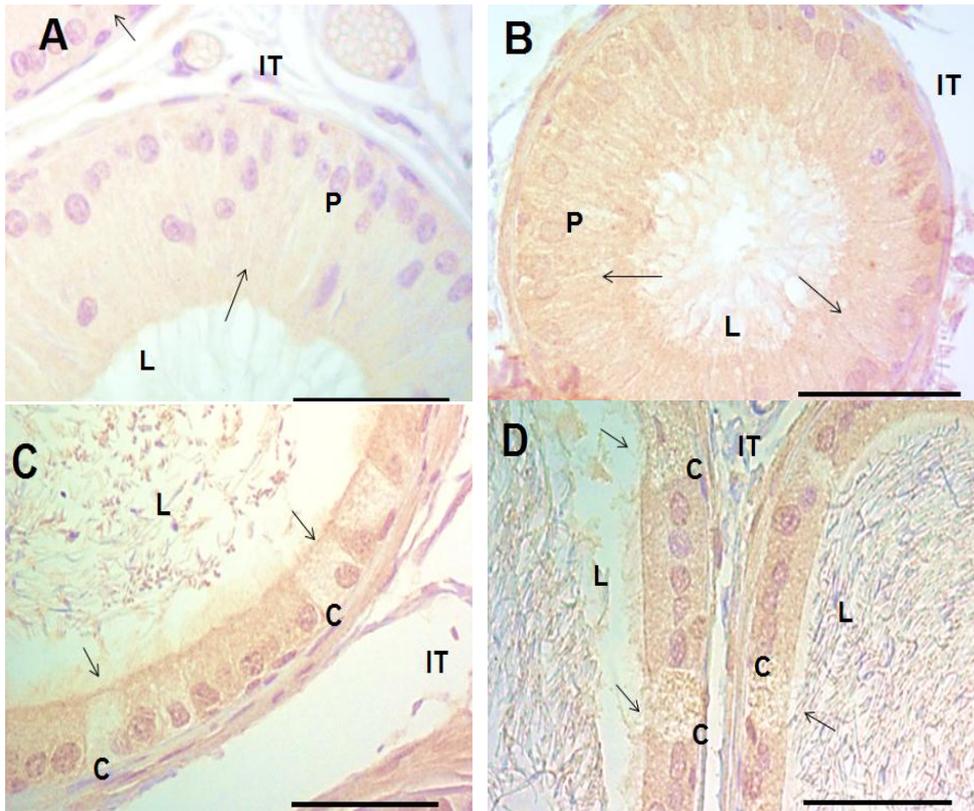


Figura 5- Fotomicrografias de imunolocalização de IL6 no segmentos inicial e cauda do epidídimo de ratos Wistar, após 24 semanas de tratamento com ração padrão (A e C) e dieta de cafeteria (B e D). São indicados: lúmen (L), célula principal (P), interstício (IT) e célula clara (C). Escala: 50 μ m.

A AQP1 pode ser imunolocalizada ao longo do interstício do ducto epididimário dos animais de ambos os grupos (Tabela 2), sendo que a intensidade de reação é forte nas células endoteliais dos canais vasculares do segmento inicial, cabeça e corpo dos animais do grupo CAF (Figuras 6B, 6D e 6F) e moderada nos animais do grupo CON nos mesmos segmentos (Figuras 6A, 6C e 6E), além de fraca na cauda dos animais de ambos os grupos (Figuras 6G e 6H). Nas células peritubulares, há forte intensidade de marcação de AQP1 no segmento inicial dos animais do grupo CAF (Figura 6B) e moderada no referido segmento dos animais grupo CON (Figura 6A), enquanto que na cabeça do epidídimo a reatividade é fraca nos animais do grupo CAF e ausente no grupo CON (Figuras 6D e 6C, respectivamente).

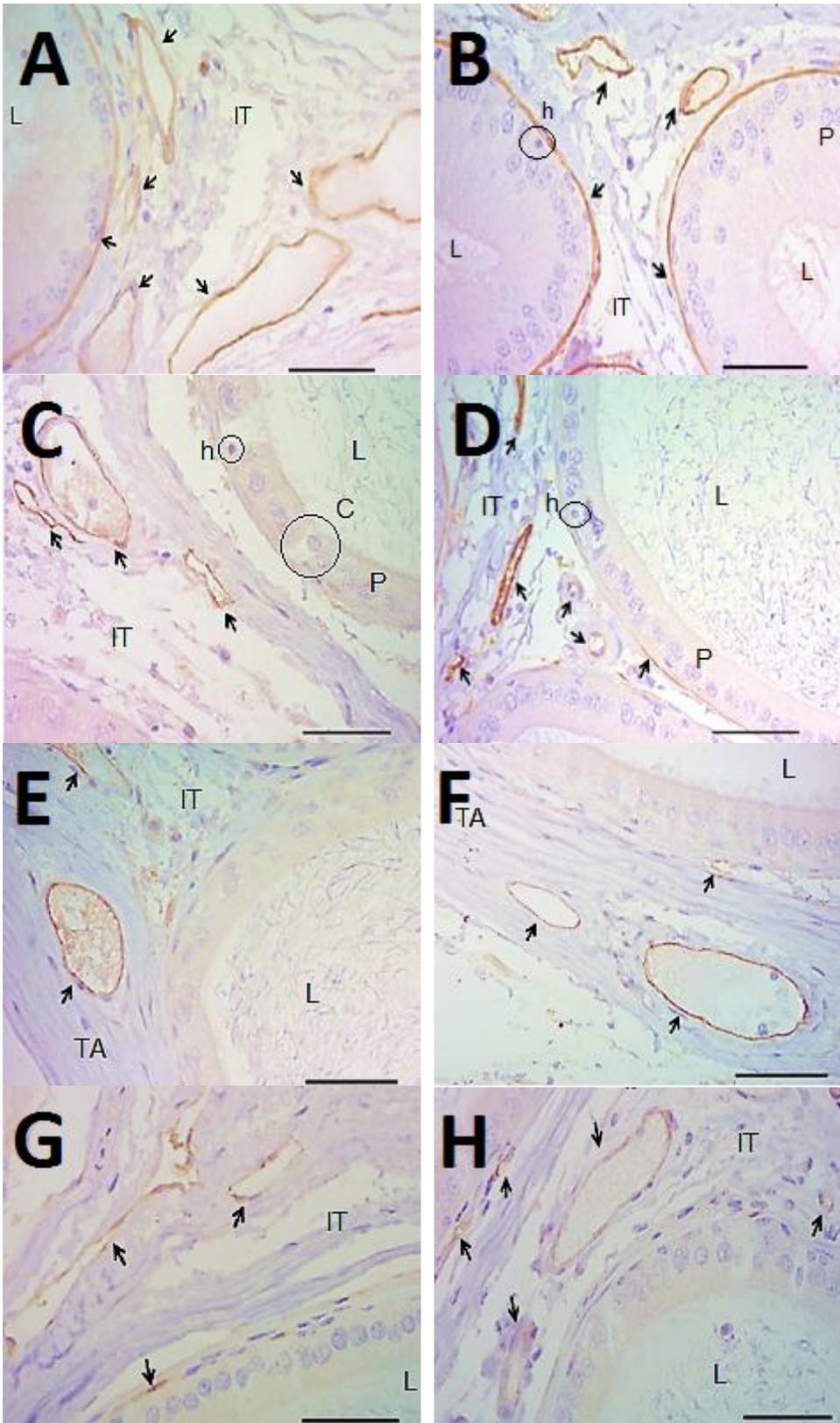


Figura 6- Fotomicrografias de imunolocalização da AQP1 nos segmentos inicial, cabeça, corpo e cauda do epidídimo de ratos *Wistar*, após 24 semanas de tratamento com ração padrão (A, C, E e G) e dieta de cafeteria (B, D, F e H). São indicados: lúmen (L), túnica albugínea (TA), célula principal (P), célula halo (h), interstício (IT), célula clara (C) e a imunolocalização positiva para AQP1 (→). Escala: 50 µm

Tabela 2 – Expressão de AQP1 e AQP9 no epidídimo de animais dos grupos CON e CAF*.

| | AQP1 | | | | AQP9 | |
|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|
| | CON | | CAF | | CON | CAF |
| | CP | CV | CP | CV | P | P |
| Si | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ |
| Cç | - | ++ | -/+ | +++ | ++ | ++ |
| Co | - | ++ | -/+ | ++ | ++ | ++ |
| CdP | -/+ | -/+ | -/+ | + | ++ | ++ |
| CdD | -/+ | -/+ | -/+ | + | +++ | +++ |

*A quantidade de sinais é proporcional à intensidade de reação imunohistoquímica: (-) ausência de reação, (+) fraca, (-/+) positiva intermitente, (++) moderada, (+++) intensa. (Si) segmento inicial; (Cç) cabeça; (Co) corpo; (CdP) cauda proximal; (CdD) cauda distal; (CP) células peritubulares; (CV) células endoteliais dos canais vasculares; (P) células principais do epidídimo.

A AQP9 pode ser imunolocalizada nos estereocílios das células epiteliais do ducto epididimário (Tabela 2), sendo que a intensidade de reação é forte nos estereocílios das células epiteliais do segmento inicial dos animais do grupo CON (Figura 7A) e fraca nos estereocílios do referido segmento dos animais do grupo CAF (Figura 7B). Nos demais segmentos do ducto, não foram observadas diferenças significativas de intensidade de expressão da AQP9 entre os animais dos grupos experimentais (não mostrado).

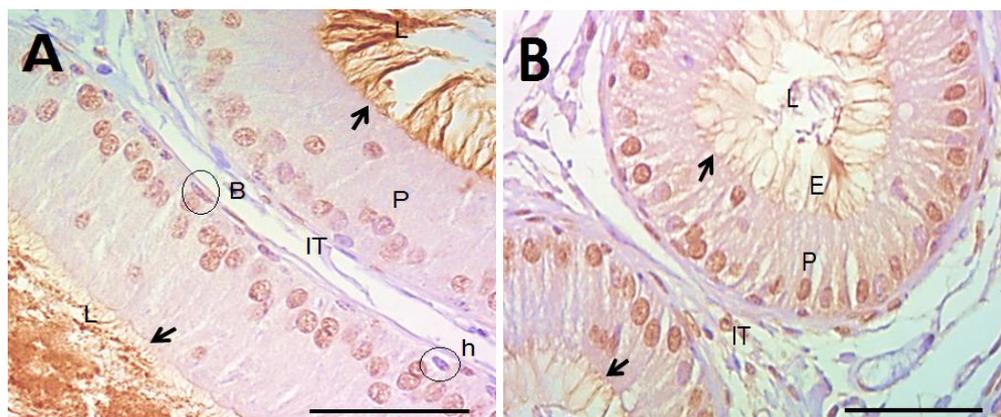


Figura 7 – Fotomicrografias de imunolocalização da AQP9 no segmento inicial do epidídimo de ratos *Wistar*, após 24 semanas de tratamento com ração padrão (Figura 7A) e dieta de cafeteria (Figura 7B). São indicados: lúmen (L), célula principal (P), célula halo (h), interstício (IT), estereocílios (E) e a imunolocalização positiva para AQP9 (→). Escala: 50 µm.

Discussão

No presente estudo, assim como em outros relatos utilizando dietas hipercalóricas (1, 13, 14, 15), pode-se constatar que a dieta de cafeteria é eficiente em produzir aumento da massa corpórea (33,41%). Ratos alimentados com dieta hiperlipídica por um período relativamente longo (180 dias) tiveram aumento de 26% de massa corpórea e apresentaram perfil metabólico e função do eixo hipofisário-testicular alterados, indicando que a dieta hiperlipídica *per se* pode alterar a função reprodutiva em animais com obesidade induzida experimentalmente (16). Similarmente, acredita-se que as alterações que ocorrem nos animais alimentados com dieta de cafeteria devem ser consequência da dieta e do tempo de tratamento e, possivelmente, alteram o eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, como estabelecido na literatura (16).

A obesidade causa alterações metabólicas, hemodinâmicas e hormonais que podem resultar em efeitos adversos complexos. Anormalidades reprodutivas são comuns em indivíduos obesos e foi demonstrado que a obesidade altera o eixo reprodutivo em animais experimentais e humanos (17, 18). Olivares *et al.* (2010) analisaram os efeitos da obesidade e relataram alterações metabólicas (hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e dislipidemia) além de diminuição das concentrações séricas de testosterona total e LH que resultaram em hipogonadismo hipogonadotrófico nos animais obesos

O aumento de tecido adiposo resulta em deposição excessiva de gordura no escroto (gordura perigonadal), coxas e abdome entre outras regiões do corpo; distribuição que pode aumentar a temperatura dos testículos e epidídimos (19). O aumento da gordura perigonadal dos animais CAF (43,79%) é um resultado significativo que deve influenciar a temperatura do epidídimo com possíveis consequências no trânsito ao longo do ducto e no armazenamento dos espermatozoides. A temperatura é um fator importante para o trânsito e manutenção dos espermatozoides no epidídimo; Bedford (20, 21) sugeriu que a força motriz principal para a formação do escroto, evolutivamente, foi a necessidade de localização da cauda do epidídimo em um compartimento de temperatura menor do que a do corpo. Também foi relatado que o aumento da temperatura do escroto resultou em elevação da frequência e da propagação da atividade elétrica das células musculares peritubulares, resultando em aumento significativo da velocidade de transporte ao longo do epidídimo e em efeitos deletérios potenciais sobre a maturação e fertilidade dos espermatozoides (22). Fernandez *et al.* (23) relataram que os espermatozoides de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica eram de baixa qualidade e com concentração alterada,

provavelmente, devido ao aumento do tempo de trânsito dos espermatozoides ao longo do ducto epididimário (23). Por tratar-se de modelo de obesidade induzida por dieta, acredita-se que a provável alteração, no presente estudo, seja o aumento do tempo de trânsito dos espermatozoides.

O ducto epididimário é constituído de maneira que seu epitélio pseudoestratificado propicia microambientes apropriados à maturação dos espermatozoides; além das demais funções de proteção, manutenção, armazenamento e transporte de espermatozoides (6, 22). Avaliações histológicas do epidídimo devem ser realizadas para identificar alterações epiteliais e lesões tais como infiltração leucocítica (inflamação), tipos celulares aberrantes no lúmen ou ausência de células claras na cauda epididimária (26). Os resultados das análises morfológicas sugerem que a dieta de cafeteria não tem efeitos deletérios severos sobre a morfologia do epitélio epididimário, uma vez que as alterações observadas são restritas a algumas regiões do epidídimo e podem ser consideradas como sutis, a exemplo do que Trasler *et al.* (8) relataram no epitélio epididimário de ratos tratados com ciclofosfamida. Porém alterações marcantes foram observadas no interstício dos animais do grupo CAF, caracterizadas pela presença de grandes infiltrados de leucócitos. Smithwick and Young (27) relataram presença de agregados de leucócitos, adjacentes ao epitélio, e espalhados no interstício do epidídimo de chimpanzé adulto privado de andrógeno e sugeriram que esta é uma evidência de resposta inflamatória aguda. Infiltração linfocítica focal foi associada com ativação do sistema imune, devido à diminuição de testosterona no envelhecimento, e caracterizada por aumento expressivo do número de células halo no epidídimo de rato Brown Norway (7). Nesse estudo, Serre e Robaire (7) observaram grupos de células imunes, dispostas como “trilhas”, saindo dos vasos sanguíneos para alcançar o epitélio, indicativo de migração ativa de células halo; por isso estes autores sugeriram que as células halo são monócitos e que uma parte delas, no epidídimo, é ativada em macrófagos devido à diminuição de testosterona.

Trasler *et al.* (8) relataram, pela primeira vez, os efeitos de um tratamento experimental, utilizando a avaliação quantitativa das células epiteliais epididimárias para análise morfológica. Estes autores relataram que a contribuição relativa das células halo aumentou na cabeça do epidídimo dos animais tratados, diferentemente da observação feita no presente estudo, no qual a contribuição relativa desta célula aumenta significativamente no segmento inicial, corpo e cauda do epidídimo dos animais do grupo CAF. O relato supracitado, bem como os resultados obtidos no presente estudo, indicam que a célula halo é um parâmetro confiável para estudar alterações epiteliais do epidídimo em diferentes tratamentos ou condições experimentais.

As células basais podem: atuar como células imunes devido a sua capacidade de responder à presença de autoantígenos espermáticos no lúmen (28); fazer endocitose de fatores derivados do sangue ou das células principais; regular o transporte de eletrólitos e água pelas células principais (22, 28). O tratamento com dieta de cafeteria diminui o número de células basais no corpo do epidídimo. Este resultado e as funções atribuídas a este tipo celular suportam a hipótese que sua diminuição pode alterar a fisiologia do epidídimo e a qualidade do conteúdo luminal; no entanto, estudos ultraestruturais para analisar as organelas citoplasmáticas são necessários para confirmar se há alteração das mesmas.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a dieta de cafeteria influencia a expressão de IL6 somente no segmento inicial do epidídimo, com maior expressão nos animais do grupo CAF. Não foram encontradas, na literatura consultada, referências específicas à expressão de IL6, nas células do epitélio epididimário, correlacionando a expressão desta interleucina e tratamentos experimentais, tais como com dietas hipercalóricas. Considerando que a obesidade é uma condição inflamatória crônica de baixa intensidade (4), esperava-se obter resultados mais marcantes de alterações da expressão da IL6 no epidídimo dos ratos do grupo CAF. Diferentemente do que ocorre para o testículo, há relativamente poucos estudos sobre a sinalização inflamatória no epidídimo ou os efeitos da inflamação sistêmica sobre as funções epididimárias. Atribui-se ao epidídimo um privilégio imunológico que tem sido pouco estudado; no entanto, evidências experimentais indicam que o epidídimo pode ser muito mais susceptível à inflamação com posterior infiltração de leucócitos do que o testículo (29). Os resultados de expressão de IL6 e de infiltração de leucócitos, no interstício, indicam que novos estudos devem ser realizados para elucidar a relação entre sinalização inflamatória e a presença de elementos celulares do sistema imune no epidídimo, na obesidade.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com dieta de cafeteria altera a expressão das AQPs 1 e 9. Os resultados da expressão de AQP1, no endotélio dos canais vasculares e nas células peritubulares do epidídimo, são concordantes com os relatos da literatura para o rato e cão (30, 31, 32) e condizentes com a função de remoção da água do interstício para os vasos, após ser absorvida do lúmen (30, 31, 32). No entanto, a maior reatividade desta AQP no epidídimo dos animais do grupo CAF deve ser destacada. Condições experimentais como ingestão de álcool por ratos UChA e UChB (bebedores voluntários de etanol) resultaram em alteração da expressão de AQPs com maior reatividade de AQP1 (33). Oliveira *et al.* (34) relataram que castração, ligação ou tratamento com antiestrógenos, em ratos, induziu aumento da expressão de AQP1 no tecido peritubular do segmento inicial do epidídimo. Enquanto não houve alteração da expressão de AQP1 no

epidídimo de ratos submetidos à subnutrição (35). Não é possível inferir como o tratamento com dieta de cafeteria influencia a expressão de AQP1 no epidídimo de ratos. Sabe-se que expressão desta AQP não é regulada por andrógenos ou estrógenos no trato reprodutivo masculino mas parece ser constitutivamente expressa (32, 34). Dessa forma outros estudos são necessários para esclarecer a alteração da expressão da AQP1 em ratos tratados com dieta de cafeteria.

A expressão da AQP9 no epitélio do epidídimo, no presente estudo, é concordante com relatos para ratos (30, 37), cão (31), morcego (36) e equino (38). O tratamento com dieta de cafeteria altera a expressão da AQP9, apenas no segmento inicial, com diminuição de sua expressão. A expressão de AQP9 diminuiu, acentuadamente, no corpo e cauda do epidídimo de ratos subnutridos (35) e, também, no corpo do epidídimo de ratos UChB e cauda epididimária de ratos UChA e UChB (33). Embora a regulação da expressão da AQP9 seja complexa (34), acredita-se que a diminuição de sua expressão, no segmento inicial, possa estar relacionada com o período de ingestão da dieta de cafeteria, o consequente aumento de massa corpórea (33,41%) e concomitante alteração das concentrações de andrógenos. Obesidade induzida por dieta hiperlipídica, em ratos *Wistar*, provocou alteração do perfil metabólico e da função do eixo hipofisário-testicular com consequências diretas sobre as concentrações de testosterona (18).

A regulação da expressão da AQP9 é complexa porque em diferentes condições experimentais, tais como orquidectomia, ligação dos ductos eferentes e reposição com diidrotestosterona, houve alteração da sua expressão sugerindo que sua regulação, no segmento inicial, pode ser feita por testosterona e fatores luminiais (30), diidrotestosterona (33) ou envolver maior complexidade (36) do que previamente relatada (30, 34). Não nos parece improvável que os resultados obtidos no presente estudo, são em parte consequência da alteração hormonal resultante da dieta de cafeteria. No entanto, em face da diversidade de relatos sobre a regulação da expressão da AQP9, novos estudos devem ser desenvolvidos.

Os resultados mostram que o aumento de massa corpórea, induzido por dieta de cafeteria, provoca as seguintes modificações segmento-específicas no ducto epididimário: i) alteração da distribuição de células basais e halo; ii) infiltração de leucócitos no interstício; iii) alteração das expressões de IL6 e AQPs1 e 9. Tais alterações devem influenciar o ambiente luminal e interferir nas funções de receber, transportar, maturar, manter, proteger e armazenar os espermatozoides; assim, sugere-se que a obesidade prejudica os processos reprodutivos mais por aumentar a predisposição para problemas de fertilidade do que por causar infertilidade. Desta maneira, novos estudos são necessários para investigar a relação

das alterações resultantes da obesidade causada por dieta de cafeteria e a fertilidade/infertilidade masculina.

Bibliografía

- 1- Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet; Increase snacking and its implications for development of obesity. *Plos One* 2013; 8(4): e60407.
- 2- Binder NK, Hannan NJ, Gardner DK. Paternal diet-induced obesity retards early mouse embryo development, mitochondrial activity and pregnancy health. *Plos One* 2012; 7(12): e52304.
- 3- Teerds KJ, Rooij DG, Keijer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update* 2011; 17(5): 667-683.
- 4- Chandalia M, Abate N. Metabolic complications of obesity: inflated or inflamed? *J Diab Complic* 2007; 21: 128-136.
- 5- Viguera-villaseñor RM, Rojas-Castaneda JC, Chávez-Saldana M, Gutiérrez-pérez O, García-cruz ME, Cuevas-Alpuche O, et al. . Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem* 2011; 113: 214-220.
- 6- Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. *Physiol reproduction* 1988; 1: 999-1080.
- 7- Serre V, Robaire B. Segment-specific morphological changes in aging brown norway rat epididymis. *Biol Reproduction* 1998; 58: 497-513.
- 8- Trasler JM, Hermo L, Robaire B. Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach. *Biol Reproduction* 1998; 38: 463-479.
- 9- Da silva *et al.* Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. *Biol Reproduction* 2006; 74: 427-438.
- 10- Johnson A L, Howars SS. hyperosmolality in intraluminal fluids from hamster testis and epididymis: a micropuncture study. *Science* 1977; 195: 492-493.

- 11- Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, et al. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* 1993; 265(4 Pt 2): F463-76. .
- 12- Puchtler H, Waldrop FS., Neloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (Methanol-Carnoy) fixation. *Histochemistry* 1970; 21: 97 – 116.
- 13- Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AAH. et al. .Antropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals* 2007; 41:111 – 119.
- 14- Ribeiro DL, Pinto ME, Rafacho A, Bosqueiro JR, Maeda SY, Anselmo-Franci JA. et al. . High- fat obesity associated with insulin resistance increases cell proliferation, estrogen receptor, and PI3K proteins in rat ventral prostate. *Androl J* 2012; 33 (5): 854 – 865.
- 15- Sagae SC, Lubaczeuski C, Zacharias P, Bonfleur ML, Franci CR, Sanvitto GL. Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. *Physiol Behav* 2013; 119: 1- 8.
- 16- Olivares A, Méndez JP, Zambrano E, Cárdenas M, Tovar A, Perena-Marín G, Ulloa-Aguirre A .Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat of diet-induced obesity. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166:356–364.
- 17- Cano P, Jimenez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP, Esquifino AI. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroidstimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 2008; 33: 118–125.
- 18- Gromadzka-Ostrowska J, Przepiorka M, Romanowicz K. Influence of dietary fatty acids composition, level of dietary fat and feeding period on some parameters of androgen metabolism in male rats. *Reproductive Biology* 2002; 2: 277–293.
- 19- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 2008a; 90(4): 897-904.

- 20- Morre, HDM., Bedford, JM. Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec* 1979a; 193: 293-312.
- 21- Morre HDM, Bedford JM. The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymus before and after castration. *Anat. Rec* 1979b; 193: 313-328.
- 22- Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The Epididymis. *Physiol reproduction* 2006; 22:1071-1148.
- 23- Fernandez CD. et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol and Endocrinol* 2011; 9:32, 2011. ISSN 1477-7827 (Electronic)
- 24- Fernades GSA, Arena ACA, Campos KE, Volpato GT, Anselmo-Franci JA, Damasceno DC. et al. . Glutamate- induces obesity leads to decrease sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reprod Biol and Endocrinol* 2012;10:105.
- 25- Morakinyo, A. O., Iranloye, B.O., Daramola, A. O., Adegoke, O.A. Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress. *Adv Med Sci* 2011; 56 (1): 95-105.
- 26- Health Effects Test Guidelines. Reproduction and Fertility Effects. EPA 712; 98: 208.
- 27- Smithwick EB, Young LG. Sequential histology of the adult chimpanzee epididymis. *J Tissue and Cell* 1997; 29(4): 383–412.
- 28- Leung GPH, Cheung KH, Leung T, Tsabg MW, Wong PYD. Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol* 2004; 216: 5–13.
- 29- Hedger MP. Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. *Androl J* 2011; 32 (6): 625-640.
- 30- Badran HH, Hermo LS. Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. *Androl J* 2002; 23: 358–373.

- 31- Domeniconi RF, Orsi AM, Justulin LA, Beu CCL, Felisbino SL. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. *Cell Tissue Res* 2008; 332: 329-335.
- 32- Hermo L, Smith CE. Thirsty business: cell, region, and membrane specificity of aquaporins in the testis, efferent ducts, and epididymis and factors regulating their expression. *Androl J* 2011; 32(6): 565-575.
- 33- Teixeira GR, Chuffa LGA, Martins OA, Kremer R, Pinheiro PFF, Mello JR, W. et al. The expression of aquaporins 1 and 9 in adult rat epididymis is perturbed by chronic exposure to ethanol. *Tissue and Cell* 2012; 44: 47-53.
- 34- Oliveira CA, Carnes K, França LR, Hermo L, Hess RA. Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol Cell* 2005; 97: 385-395.
- 35- Arrigui 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. *Theriogenology* 2010; 74(9): 1661-1669.
- 36- Oliveira RL, Campolina-Silva CA, Nogueira JC, Mahecha GAB, Oliveira CA. Differential expression and seasonal variation on aquaporins 1 and 9 in the male genital system of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. *Gen Comp Endocrin* 2013; 186:116-125.
- 37- Pastor-Soler NM, Fisher JS, Sharpe R, Hill E, VanHoek A, Brown D, Breton S. Aquaporin 9 expression in the developing rat epididymis is modulated by steroid hormones. *Reproduction* 2010; 139: 613–621.
- 38- Klein C, Troedsson MHT, Rutlant J. Region- specif expression of aquaporin subtypes in equine testis, epididymis and ductus deferens. *Anat rec* 2013; 296(7): 1115-1126.

ANEXO A:

