

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE
NÍVEL MESTRADO

SUELLEN RIBEIRO DA SILVA SCARTON

**ESTUDO MORFOLÓGICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E TRATADOS COM
SERICINA**

SUELLEN RIBEIRO DA SILVA SCARTON

**ESTUDO MORFOLÓGICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E TRATADOS COM
SERICINA**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação 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 da saúde.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Célia Cristina Leme Beu

Cascavel – Paraná
Fevereiro de 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas – UNIOESTE - Campus Cascavel)

Scarton, Suellen Ribeiro da Silva.

S312e Estudo morfológico e do estresse oxidativo em testículos e epidídimos de camundongos c57bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com sericina / Suellen Ribeiro da Silva Scarton. --- Cascavel (PR), 2017.

45 f.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Cristina Leme Beu

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017.

Programa de Pós-Graduação em Biociências.
Inclui bibliografia

FOLHA DE APROVAÇÃO

SUELLEN RIBEIRO DA SILVA SCARTON

**ESTUDO MORFOLÓGICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
TESTÍCULOS E EPIDIDÍMOS DE CAMUNDONGOS C57BL/6
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E TRATADOS COM
SERICINA**

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



Orientador: Prof.ª Dra. Célia Cristina Leme Beu
UNIOESTE



Prof. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão
UNIOESTE



Prof. Dra. Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana
UEM

CASCADEL-PR
(fevereiro/2017)

A minha avó Dona Coralina França da Silva, certamente a pessoa que ensinou-me as lições mais importantes da vida...

*Ao meu marido Leandro Scarton amigo e companheiro de todas as horas, meu porto seguro onde acalmo as aflições da alma... Obrigada por não tolher os meus sonhos e por apoiar as minhas decisões mesmo às vezes sendo o maior afetado por elas, obrigada por não desistir dessa louca, mas linda vida que compartilhamos!
Ti amuuuuuu!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos tios, primos, irmãos e “agregados”, cada vitória conquistada eu divido com vocês! Em especial agradeço a minha mãe Dona Sueli pelo seu carinho, dedicação e amor... Não existem palavras para descrever a sua importância em minha vida! Com toda a sua simplicidade e fé carregou comigo o peso dos momentos mais difíceis, suas orações me fortaleceram e seu colo me abrigou! Tudo que posso deixar registrado aqui é que te amo muito e que sou grata a Deus por tê-la como mãe, muito obrigada!

Ao meu irmão Helton praticamente “meu motorista particular”, repito as palavras que me falou quando eu estava indo apresentar meu projeto do doutorado... *Nós sempre estaremos juntos!* Obrigada pela sua disposição, te amo!

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Célia, pela confiança, amizade e dedicação! Suas palavras, sempre tão bem colocadas me levaram além do que eu mesma imaginava e sonhava para mim... Não orientou apenas uma dissertação de mestrado, ensinou-me a ser alguém que sempre busca fazer o melhor, não tenho como expressar a alegria de ter te encontrado nessa vida!

A Prof^a. Dr^a. Lucinéia, minha tutora no estágio em docência, agradeço por fazer despertar em mim a confiança que às vezes me faltava, obrigada pelos conselhos e pela amizade que ultrapassou os portões da universidade!

Ao Prof. Dr. Marcelo, quanta dedicação aos seus alunos eu enxerguei nas aulas de Anatomia que dividia com a Prof. Célia, obrigada por me aceitar em suas aulas enquanto eu ainda era apenas aluna especial desse programa!

A Profa. Dra. Rose Meire, obrigada por estar sempre disposta a ajudar, é lindo ver e ouvir descrição de qualquer estrutura quando está ao microscópio! Eu sentia o carinho que passava enquanto estava me ensinando e também notava como ficava feliz com as nossas conquistas! Nunca me esquecerei dos seus conselhos sobre a maternidade e das risadas e dos momentos de descontração que passamos juntas!

A Prof. Dra. Ana Tereza, como não rir contigo? E como não aprender Bioestatística contigo? Toda simplicidade humana do mundo se resume a “você”! Obrigada por toda a sua contribuição para a realização dessa pesquisa, pelas oportunidades que me deu e por me fazer sentir como uma verdadeira filha da ProfAna!!!

Aos meus companheiros de LABEM, Lana, Ana Caroline, Adriana, Maria Luiza, Pâmela, Camila, Caroline, Matheus e Wellington, não esquecerei as cuias de chimarrão, as compras em dia de promoção no Beal, o café doce do “restaurantinho” em que almoçávamos e principalmente as histórias da Judith, obrigada pelos momentos de alegria que compartilhamos!

As grandes amigas que fiz e que certamente serão pra toda vida Marília e Thaís, tão improvável esse nosso encontro, tantas diferenças entre nós, mas também tanta energia que se complementa, tanto silêncio e respeito pelo espaço e pelos defeitos de cada uma! Obrigada por todos os momentos que passamos juntas!

A todos os colegas que participaram das coletas ou que de alguma forma ajudam durante o período experimental em especial Regina, Cristiane e Giovani meus agradecimentos!

Aos técnicos que muitas vezes me “salvaram”: Celeste, José Carlos e Odete, com ajuda de vocês tudo ficou mais fácil! Obrigada!

A todos os Professores que de alguma maneira participaram da minha formação durante esse período, todos dividiram comigo um pouco do seu conhecimento e amizade! Muito obrigada!

Agradeço a esta instituição pela oportunidade de qualificar-me profissionalmente, a Fundação Araucária e a Capes pela bolsa recebida. Entendo que muitos não terão a mesma chance, mas ainda assim é preciso ressaltar que a educação é o caminho, e o conhecimento é libertador!

RESUMO GERAL

O estilo de vida das sociedades modernas propicia que os indivíduos tornem-se sedentários e desenvolvam o hábito de consumir, em excesso, dietas hipercalóricas, as quais podem resultar em alterações metabólicas que influenciam no desenvolvimento de doenças crônicas. Estas têm impacto negativo sobre a qualidade de vida dos indivíduos. Altas concentrações de gordura saturada na dieta são metabolicamente prejudiciais à saúde, inclusive relativamente aos aspectos reprodutivos, visto que há relação negativa entre consumo excessivo de gordura saturada e diminuição da função reprodutiva masculina. Tal função depende da integridade dos espermatozoides e de órgãos do sistema genital masculino, tais como epidídimo. O acúmulo de gordura perigonadal favorece a ocorrência de estresse oxidativo (EO) e resulta em lesão do testículo e epidídimo ou alteração do DNA dos espermatozoides. A suplementação alimentar com antioxidantes pode diminuir o impacto negativo do EO sobre os parâmetros reprodutivos. A sericina, uma proteína extraída do casulo do bicho-da-seda, tem sido demonstrada como potente antioxidante e apresenta grande potencial para utilização como suplemento alimentar. Assim esse estudo teve como objetivo verificar se a dieta hiperlipídica e o tratamento oral com sericina influenciam a morfologia testicular, a fragmentação do DNA e expressão de biomarcadores do estresse oxidativo. Para isso camundongos da linhagem C57BL/6 (76 dias de idade) foram distribuídos em quatro grupos: i) Controle (C, n = 5); ii) Sericina (S, n = 5); iii) *High fat* (HF, n = 5); iv) *High fat* + sericina (HFS, n = 5). A dieta hiperlipídica foi ofertada aos animais HF e HFS, por 14 semanas, enquanto C e S receberam dieta padrão Nuvilab® (Curitiba, PR, Brasil) nesse mesmo período. Nas últimas 04 semanas os animais S e HFS foram tratados com 1.000 mg/kg/peso corporal de sericina por gavagem, e os animais C e HF foram gavados com salina 0,8%. A sericina foi efetiva na redução do ganho de peso, pois, animais HFS obtiveram apenas 10% de ganho peso enquanto que os HF obtiveram 33%, a massa das gorduras retroperitoneal e perigonadal também foi diminuída em HFS em comparação à HF. Foi observado aumento da lipoperoxidação nos testículos de HF, o que não ocorreu em HFS. No segmento inicial do epidídimo a atividade da CAT esteve diminuída em HF e HFS, enquanto que na cauda a atividade da GST foi menor em HFS do que em HF. O diâmetro dos túbulos seminíferos foi alterado entre os grupos C e HF, e o tratamento com sericina em HFS fez com que esse parâmetro se igualasse ao do S, a análise morfológica revelou secções com túbulos em estado de degeneração em HF, sendo que esses achados também foram atenuados em HFS. A partir do teste de TUNEL foi possível identificar diminuição da ocorrência de apoptose em HFS em relação à HF. Em conclusão pode-se inferir que a dieta hiperlipídica associada ao tratamento oral com sericina melhorou a morfologia do epitélio germinativo, diminuiu a ocorrência de lipoperoxidação e de apoptose.

Palavras-chave: Fertilidade masculina, célula de Sertoli, apoptose, dieta hipercalórica, antioxidação, proteína da seda.

GENERAL ABSTRACT

MORPHOLOGICAL STUDY AND OXIDATIVE STRESS IN TESTES AND EPIDIDYMIS OF C57BL/6 MICE FED WITH HYPERLIPIDIC DIET AND SERICIN-TREATED

The lifestyle of modern societies allows individuals to become sedentary and develop the habit of overeating hypercaloric diets, which can result in metabolic changes that influence the development of chronic diseases. These have a negative impact on the quality of life of individuals. High concentrations of saturated fat in the diet are metabolically detrimental to health, including reproductive aspects, since there is a negative relationship between excessive consumption of saturated fat and a decrease in male reproductive function. Such function depends on the integrity of sperm and organs of the male genital system, such as epididymis. The accumulation of perigonadal fat favors the occurrence of oxidative stress (OS) and results in lesion of the testis and epididymis or alteration of spermatozoa DNA. Food supplementation with antioxidants may decrease the negative impact of EO on reproductive parameters. Sericin, a protein extracted from the cocoon of the silkworm, has been shown to be a potent antioxidant and has great potential for use as a food supplement. Thus, this study aimed to verify if the hyperlipidic diet and the oral treatment with sericin influence testicular morphology, DNA fragmentation and expression of biomarkers of oxidative stress. For this, mice of the C57BL/6 (76 days of age) were divided into four groups: i) Control (C, n = 5); ii) Sericin (S, n = 5); iii) High fat (HF, n = 5); iv) High fat + sericin (HFS, n = 5). The hyperlipid diet was offered to the HF and HFS animals for 14 weeks, while C and S received a standard diet of Nuvilab® (Curitiba, PR, Brazil) during the same period. In the last 4 weeks S and HFS animals were treated with 1,000 mg / kg / body weight of sericin by gavage, and C and HF animals were treated with 0.8% saline. Sericin was effective in reducing weight gain, as HFS animals obtained only 10% of weight gain while HF obtained 33%, the mass of retroperitoneal and perigonadal fat was also decreased in HFS compared to HF. Increased lipoperoxidation was observed in the testes of HF, which did not occur in HFS. In the initial segment of the epididymis CAT activity was decreased in HF and HFS, while in the tail the GST activity was lower in HFS than in HF. The diameter of the seminiferous tubules was changed between groups C and HF, and treatment with sericin in HFS made this parameter equal to that of S, the morphological analysis revealed sections with tubules in the state of degeneration in HF, and these findings were also attenuated in HFS. From the TUNEL test it was possible to identify a decrease in the occurrence of apoptosis in HFS in relation to HF. In conclusion, it can be inferred that the hyperlipid diet associated with oral sericin treatment improved the morphology of the germinal epithelium, decreased the occurrence of lipoperoxidation and apoptosis.

Keywords: Male fertility, Sertoli cell, Apoptosis, Hypercaloric diet, Antioxidation, Silk protein.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REVISÃO GERAL DE LITERATURA.....	14
Dietas <i>high fat</i> e fertilidade.....	14
Função testicular e epididimal.....	16
Apoptose de células germinativas.....	24
A Sericina com antioxidante.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
ARTIGO CIENTÍFICO.....	35
“SERICIN EXERTS ANTIOXIDATION ON TESTIS AND EPIDIDYMS OF C57BL/6 MICE FED HIGH FAT DIETS”	
ANEXOS.....	44
ANEXO I – Parecer Cômite de Ética.....	44
ANEXO II – Normas para publicação in: International Journal of Development Research.....	45
ANEXO III – Certificado de publicação in: International Journal of Development Research.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Esquema mostrando as estruturas do sistema genital masculino.....	16
FIGURA 2 Esquema representando os túbulos seminíferos contorcidos, separados pelos septos do testículo dando origem aos lóbulos.....	17
FIGURA 3 Esquema representando a barreira hematotesticular formada pelas junções de oclusão.....	18
FIGURA 4 Esquema representando o testículo.....	19
FIGURA 5 Esquema adaptado de fotomicrografia eletrônica de transmissão da cabeça do epidídimo.....	20
FIGURA 6 Esquema representando células encontradas no epitélio do segmento inicial do epidídimo, conforme visualização em microscopia eletrônica de transmissão.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA	Hidroxianisol butilado
BHE	Barreira hemato-epididimária
BHT	Barreira hematotesticular
BHT¹	Hidroxitolueno butilado
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ES	Estresse oxidativo
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LH	Hormônio luteinizante
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDA	Quantidade dietética diária recomendada
T	Testosterona
UVB	Raio ultravioleta de onda média
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

INTRODUÇÃO GERAL

Uma das principais características da população mundial tem sido o processo permanente de intensas mudanças na sua composição demográfica, com aumento na expectativa de vida e na proporção de idosos na população, queda da fertilidade, e diminuição dos óbitos devido a causas infecciosas, assim a prevenção e o diagnóstico precoce das doenças, em geral, são importantes para a promoção da saúde por interferir na duração e na qualidade de vida do indivíduo (BRASIL, 2006).

Desta maneira, para que a promoção da saúde ocorra plenamente, é fundamental que não se restrinja ao setor saúde, devendo ser construída por meio de ações intersetoriais do poder público juntamente com os diversos setores da sociedade (ONU, 2005). Uma das ações necessárias para a promoção da saúde da população é a promoção de hábitos saudáveis. Em vista do atual contexto epidemiológico da população, destacam-se as ações de promoção da alimentação saudável e da prática regular de atividade física (BRASIL, 2006). Entretanto, o comportamento alimentar atualmente desenvolvido pela sociedade está voltado para alto consumo de dietas hipercalóricas, resultantes de alimentos processados, altamente palatáveis, pobres em nutrientes e com altas concentrações de açúcares e de gorduras saturadas (RATO et al., 2014).

Altas concentrações de gordura, na dieta, são metabolicamente prejudiciais à saúde. Vários distúrbios cardiometabólicos, tais como obesidade, hiperlipidemia, diabetes mellitus têm sido associadas com alto consumo de dietas hipercalóricas (CHOI et al., 2015). Estudos demonstraram a relação entre consumo elevado de gordura saturada e efeitos negativos sobre processos reprodutivos masculinos que resultaram em alterações da função testicular, da concentração de espermatozoides, da qualidade do sêmen e da fertilidade masculina (JENSEN et al., 2013; PADRÓN et al., 1989). O consumo de dietas hipercalóricas perturba a função reprodutiva

masculina em nível central ou testicular (RATO et al., 2014), a qual está sob o controle da rede neuro-hormonal, operada pelo eixo hipotálamo–hipófise-testículo (eixo reprodutivo), cuja disfunção pode levar à infertilidade (SHARPE, 1994), resultante da alteração do eixo funcional e acúmulo de tecido adiposo. No eixo reprodutivo o hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que controla a liberação dos hormônios hipofisários luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) que atuam no espaço intersticial e nos túbulos seminíferos contorcidos do testículo, respectivamente (KAKAR et al., 2004). O acúmulo de tecido adiposo no escroto propicia o aumento da temperatura local que favorece a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROS) tendo como consequência a ocorrência de estresse oxidativo (EO) (JARA et al., 2002; MAGNUSDOTTIR et al., 2005; SHAFK; OLFAT, 1981).

Assim, o EO pode ser estabelecido como uma das principais causas de infertilidade masculina (SAJJADIAN et al., 2014; TREMELLEN, 2008), sendo indicado como um dos principais facilitadores da fragmentação do DNA das células germinativas imaturas e do espermatozoide (AITKEN; DE IULIIS, 2010; TWIGG; IRVINE; AITKEN, 1998). O EO é o resultado de altas concentrações de EROS que superam a capacidade dos mecanismos antioxidativos da célula e podem alterar o espermatozoide e a expressão de proteínas seminais (AGARWAL et al., 2014). A maior parte da energia produzida por metabolismo aeróbico utiliza fosforilação oxidativa na mitocôndria e, assim a produção de EROS é uma etapa normal do metabolismo celular (KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009; VIGUERAS-VILLASEÑOR et al., 2011). Para eliminar possíveis danos celulares significativos, vias antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas eliminam o excesso de EROS para atingir um balanço entre a geração benéfica de oxidantes e EO prejudicial (KEFER; AGARWAL; SABANEKH, 2009).

Antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias naturais ou sintéticas formadas por vitaminas, minerais, pigmentos e, ainda, enzimas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Dentre as substâncias com ação antioxidante, podemos citar a sericina, uma mistura de macromoléculas e polipeptídios de peso molecular variável entre 10 e 300 KDa (ZHANG, 2002). É uma proteína comestível e biocompatível, com potencial para utilização na forma de suplemento alimentar (JUNG et al., 2013). Entre as atividades biológicas da sericina foram descritas: antioxidação, inibição da tirosinase, proteção

contra tumorigênese hepática causada pelo álcool, injúrias gástricas e injúrias induzidas por UV que levaram à apoptose de queratinócitos (KATO et al., 1998; ZHAORIGETU; SASAKI; KATO, 2007; ZHAORIGETU et al., 2003; LI et al., 2008; DASH et al., 2008).

Estudos demonstraram que a suplementação dietética com sericina e fibroína, proteínas extraídas do casulo do bicho-da-seda, suprimiu significativamente o ganho de peso, reduziu a quantidade de gordura corporal e melhorou o perfil metabólico em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (SEO et al., 2011) e, também, foi verificado que a sericina, na dieta, reduziu as concentrações de colesterol e triglicérides em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas (OKAZAKI et al., 2010).

Dessa maneira este estudo teve como objetivo verificar se a dieta hiperlipídica e o tratamento oral com sericina influenciam a morfologia testicular, a fragmentação do DNA e expressão de biomarcadores do estresse oxidativo.

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Dietas *high fat* e fertilidade

Seguindo padrão mundial, o Brasil tem passado por uma transição nutricional, na qual se pode perceber a redução da desnutrição, acompanhada pelo aumento de excesso de peso em diferentes fases da vida, determinado frequentemente pela má alimentação (COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008). Doenças crônicas como a obesidade, a hipertensão e o diabetes são propiciadas pelo perfil alimentar encontrado entre as famílias brasileiras, em que há uma participação crescente de gorduras em geral, gorduras de origem animal e alimentos industrializados ricos em açúcar e sódio e a diminuição de cereais, leguminosas, frutas, verduras e legumes (IBGE, 2004), combinação esta que resulta na ingestão de dietas hipercalóricas.

Os dados da pesquisa Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico - VIGITEL (2012) permitiram conhecer os hábitos alimentares dos brasileiros e apontaram que a ingestão de dietas hiperlipídicas é cada vez maior na população. Segundo estes dados, apenas 22,7% da população ingerem a porção diária de frutas e hortaliças recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2015). Ainda, estes dados mostram que a população consome excessivamente gordura saturada, pois 31,5% não dispensam carne gordurosa e mais de 53,8% dos brasileiros ingerem leite integral regularmente (BRASIL, 2015). Os índices de ingestão de alimentos gordurosos são ainda maiores quando se considera homens jovens, entre 18 a 24 anos, dos quais 48% consomem regularmente carne com excesso de gordura, porcentagem que é reduzida a 27% em homens com mais de 65 anos (BRASIL, 2015).

Evidências sugerem que o consumo de dietas hipercalóricas, tais como as dietas hiperlipídicas, não é compatível com a função reprodutiva masculina eficiente

e pode comprometer a saúde reprodutiva da prole (RATO et al., 2014). Há preocupação crescente com a capacidade reprodutiva dos indivíduos porque as taxas totais de fertilidade diminuíram 2% nos países em desenvolvimento (HAMILTON et al., 2013). Outro aspecto preocupante é a infertilidade, fenômeno universal, que atinge cerca de 15% dos casais do planeta. Desse total, ao menos, 50% dos casos estão relacionados a fatores masculinos, enquanto que em 25% dos casos de infertilidade considera-se que as causas são idiopáticas (World Health Organization, 2015). Magnusdottir et al. (2005) sugeriram que a diminuição da qualidade do sêmen humano nas últimas décadas pode ser relacionada com a mudança dos hábitos de vida, caracterizado por um estilo de vida sedentário associado ao alto consumo de energia.

A relação negativa entre o consumo de gordura total e a contagem diminuída de espermatozoides, parece ser determinada principalmente pelo consumo de gordura saturada. Conforme observado em homens, houve diminuição de 38% dos espermatozoides quando o consumo de gordura saturada foi aumentado em 5%, enquanto que não houve correlação entre a contagem de espermatozoides e o aumento (5%) de consumo de gordura mono ou poli-insaturada (ATTAMAN et al., 2012).

A má qualidade do sêmen foi associada a homens que consumiram grande quantidade de carnes processadas, especialmente aquelas com alta concentração de gordura saturada, como as embutidas. Esses produtos podem incorporar xenobióticos, principalmente xenoestrógenos e alguns esteroides anabolizantes. A utilização desses compostos pela indústria alimentícia leva ao aumento significativo da exposição diária a essas substâncias. Xenoestrógenos são substâncias altamente lipofílicas que se acumulam em alimentos ricos em gordura como carne ou leite, e suspeita-se que são parcialmente responsáveis pelo declínio na qualidade do sêmen (TOPPARI, 1996). Ao contrário, o consumo de frutas, verduras e legumes foi associado à melhora da qualidade do sêmen, pelo fato de proporcionar maior quantidade de antioxidantes e micronutrientes que podem ter influência positiva em manter ou melhorar a qualidade do sêmen (MENDIOLA et al., 2009).

Função testicular e epididimal

O sistema genital masculino em mamíferos é composto por testículos, ductos eferentes, epidídimos, ductos deferentes, glândulas acessórias (próstata, glândula seminal e bulbouretral) e pênis (**Fig. 1**) (SETCHELL; BREED, 2006). As principais funções atribuídas ao testículo, espermatogênese e esteroidogênese, dependem de hormônios para serem iniciadas e mantidas (HOLDCRAFT; BRAUN, 2004).

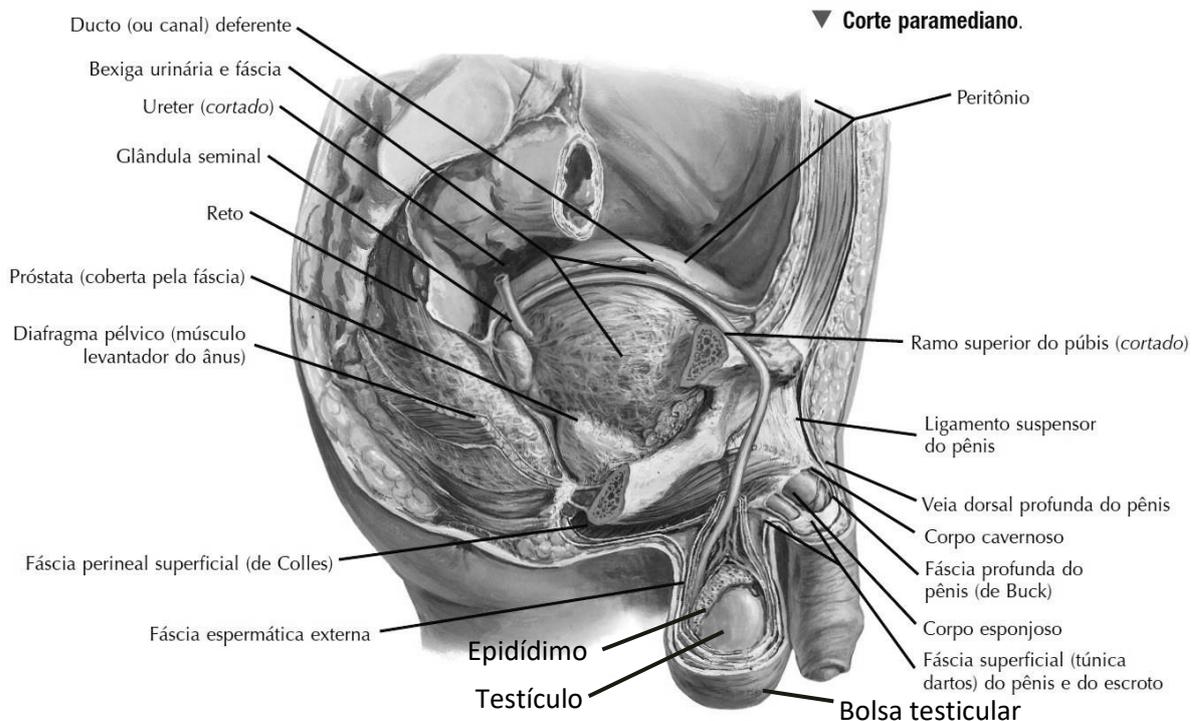


Figura 1 Esquema mostrando as estruturas do sistema genital masculino. Fonte: NETTER, arquivo digital, (2008).

Os testículos são órgãos pares que estão localizados na bolsa testicular (**Fig. 1**) e nela estão suspensos pelo funículo espermático, sua localização possibilita que sejam mantidos em temperatura, cerca de, 2°C abaixo da temperatura corporal; diferença essencial para que a espermatogênese ocorra normalmente (KIERSZENBAUM, 2008). As estruturas aferentes e eferentes do testículo e do epidídimo estão no funículo espermático que assim contém: ducto deferente, artérias

testicular, do ducto deferente e cremastérica, plexo pampiniforme (rede venosa formada por mais de 12 veias), fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas, ramo genital do nervo genitofemoral e vasos linfáticos (MOORE; DALLEY, 2001).

A estrutura do testículo compreende uma cápsula, séptulos, túbulos nos quais os espermatozoides são produzidos e espaço intersticial (**Fig. 2**) no qual estão localizadas células produtoras de hormônios androgênicos. A cápsula é a túnica albugínea, camada de tecido conjuntivo denso, que é recoberta anterior e lateralmente com a lâmina visceral da túnica vaginal. A túnica albugínea, posteriormente, forma um espessamento denominado mediastino do qual partem séptulos do testículo para dividir o parênquima em cerca de 200 a 300 lóbulos (**Fig. 2**); cada lóbulo contém um a três túbulos seminíferos contorcidos em humanos (KERR et al., 2006; LEESON; ADAMSON, 1962).

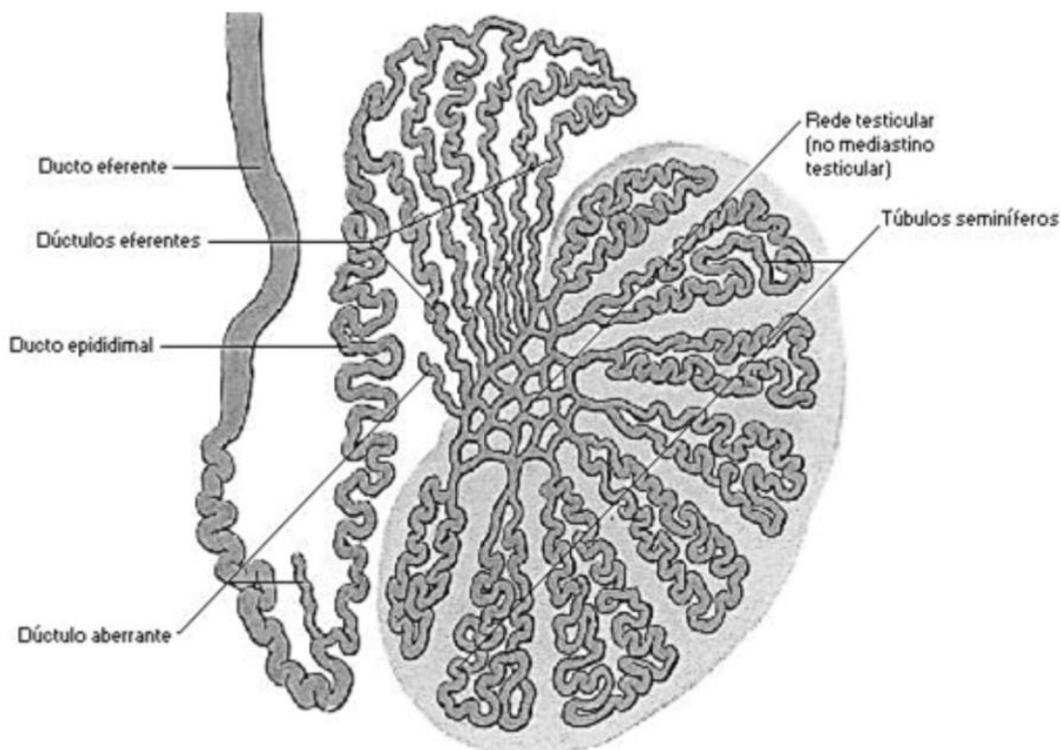


Figura 2 Esquema representando os túbulos seminíferos contorcidos, separados pelos septos do testículo dando origem aos lóbulos. Fonte: Arquivo digital, NETTER, 2008.

O epitélio do túbulo seminífero contorcido é constituído por células de Sertoli e da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides). Os túbulos seminíferos são circundados por células mioides

peritubulares especializadas capazes de contrair para mover o fluido luminal e os espermatozoides para a rede testicular (SETCHELL; BREED, 2006). As células de Sertoli são colunares altas que se estendem da lâmina basal até o lúmen do túbulo seminífero. A morfologia tridimensional incomum indica a capacidade destas células de envolver vários grupos de células germinativas adjacentes. As células de Sertoli estão ligadas entre si por junções de oclusão (**Fig. 3**), localizadas no perímetro basal do epitélio seminífero (KERR et al., 2006). As junções de oclusão, nestas células, têm localização estratégica e incomum, em relação às células da linhagem espermatogênica, de maneira a formar a barreira hematotesticular (BHT). A BHT determina a subdivisão funcional e anatômica do epitélio seminífero nos compartimentos: i) basal, que contém as espermatogônias e espermatócitos primários (pré-leptóteno e leptóteno) e ii) adluminal, localizado acima das junções de oclusão, no qual estão as células espermatogênicas mais diferenciadas (espermátides primárias/inicial, secundária/terminal) em um ambiente fisiológico único (KERR et al., 2006).

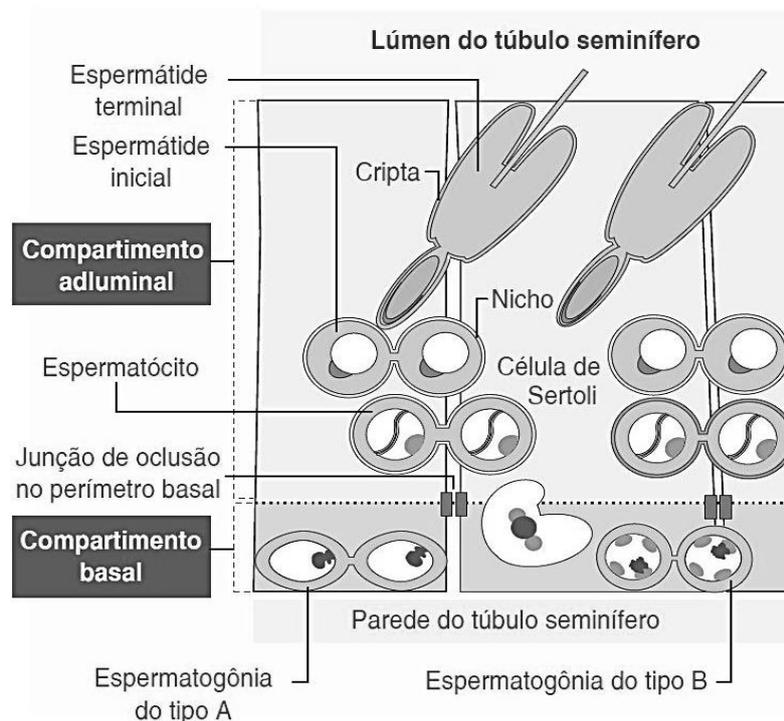


Figura 3 Esquema representando a barreira hematotesticular formada pelas junções de oclusão entre as células de Sertoli, que dividem o túbulo seminífero em dois compartimentos e impedem a livre passagem de substâncias entre ambos. Fonte: KIERSZENBAUM, arq. dig., (2008).

A BHT tem a função de excluir o tráfico celular e molecular via espaço extracelular entre as células de Sertoli. Esta barreira é essencial para criar um ambiente bioquímico altamente especializado para células espermatogênicas meióticas e pós-meióticas. A BHT também atua para que anticorpos fiquem excluídos do epitélio e do lúmen dos túbulos seminíferos contorcidos porque os espermatozoides são reconhecidos como estranhos pelos anticorpos do próprio organismo (KIERSZENBAUM, 2008; KERR et al., 2006).

O espaço entre os túbulos seminíferos é preenchido por tecido conjuntivo frouxo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Além dos elementos celulares típicos, o tecido conjuntivo contém células grandes, as células intersticiais ou células de Leydig (ROSS; ROMRELL, 1993). Assim como a maioria das células produtoras de esteroides, as células de Leydig também contêm gotículas lipídicas, mitocôndrias e retículo endoplasmático liso bem desenvolvido.

Embora os testículos sejam os órgãos produtores dos espermatozoides, ao final da espermição, estas células são imóveis e incapazes de fertilizar oócitos. Desta maneira, os espermatozoides são transportados via rede testicular e ductos eferentes ao epidídimo para que sofram maturação e possam adquirir a capacidade potencial de fertilizar oócitos (**Fig. 4**) (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

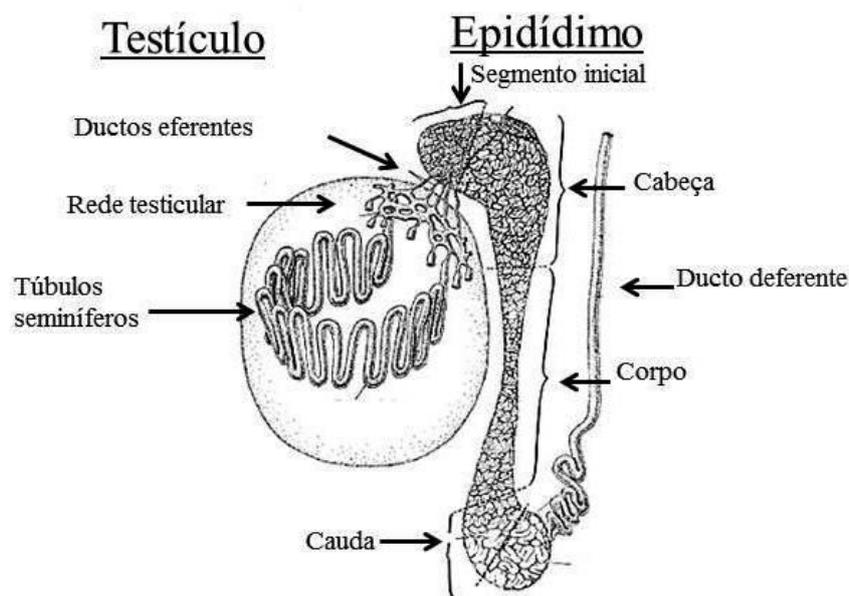


Figura 4 Esquema representando testículo com: túbulo seminífero, rede testicular, ductos eferentes e epidídimo com a delimitação de suas regiões e ducto deferente. Fonte: Adaptado de: ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, p. 1076, (2006).

O epidídimo é um túbulo altamente enovelado, topograficamente, relacionado à margem posterior do testículo e conecta os ductos eferentes ao ducto deferente; tem como funções: transportar, manter, proteger, maturar e estocar os espermatozoides. O epidídimo é geralmente dividido, anatomicamente, nos segmentos denominados cabeça (*caput*), corpo (*corpus*) e cauda (**Fig. 4**). Benoit (1926) introduziu o conceito de segmento inicial, região com aspecto histológico característico, que está localizado entre os ductos eferentes e a cabeça do epidídimo (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). O epitélio epididimário é pseudo-estratificado estereociliado e formado pelos tipos celulares: principal, delgada, apical, clara, basal e halo (**Fig. 5**), cujas distribuições são segmento-específicas e espécie-específicas (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006; SETCHELL; BREED, 2006).

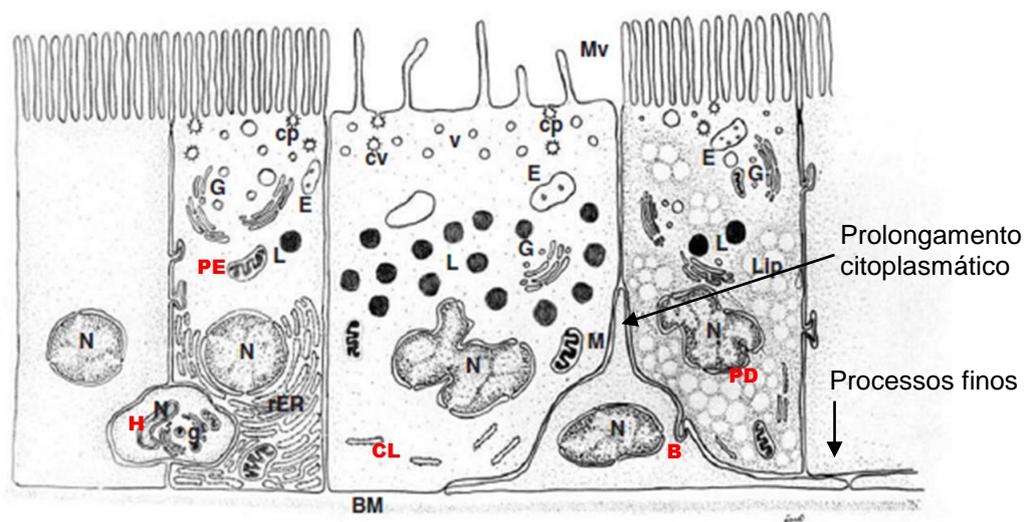


Figura 5 Esquema adaptado de fotomicrografia eletrônica da cabeça do epidídimo representando: célula principal da cabeça do epidídimo à esquerda (PE) e uma célula principal do corpo do epidídimo à direita (PD), com uma célula clara no meio (CL). É possível observar célula halo (H) e célula basal (B). Fonte: ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, p. 1078, (2006).

A célula principal é o tipo celular que predomina no epitélio do epidídimo de mamíferos e está distribuída por todo o ducto; dependendo do segmento examinado, esta célula compreende, aproximadamente, 65% a 80% do total de células epiteliais epididimárias. A estrutura e a função da célula principal podem variar entre os diferentes segmentos do epidídimo e tais variações são refletidas na aparência e organização de suas organelas secretoras (retículo endoplasmático, complexo de Golgi e grânulos de secreção) e organelas endocíticas (vesículas cobertas,

endossomos, corpos multivesiculares e lisossomos) (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). As células principais sintetizam proteínas e glicoproteínas que são retidas na própria célula ou secretadas ativamente no compartimento luminal; também, desempenham papel ativo na endocitose de proteínas que estão no lúmen (KIERSZENBAUM, 2008; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

As células delgadas (**Fig. 6**) são caracterizadas por serem mais estreitas do que as células principais e por possuírem um processo citoplasmático muito delgado que alcança a membrana basal. Nestas células há numerosas vesículas em forma de taça, localizadas apicalmente, que estão envolvidas em endocitose e na secreção de íons H^+ para o lúmen. No rato e camundongo, as células delgadas foram identificadas no segmento inicial do epidídimo de animais adultos (ABOU-HAILA; FAIN-MAUREL, 1984; ADAMALI; HERMO, 1996). Estas células, também, foram observadas nas mesmas regiões em várias outras espécies, tais como bovino (GOYAL, 1985), hamster (BEU; ORSI; DOMENICONI, 2009; FLICKINGER; HOWARDS; ENGLISH, 1978) e humano (PALACIOS et al., 1991).

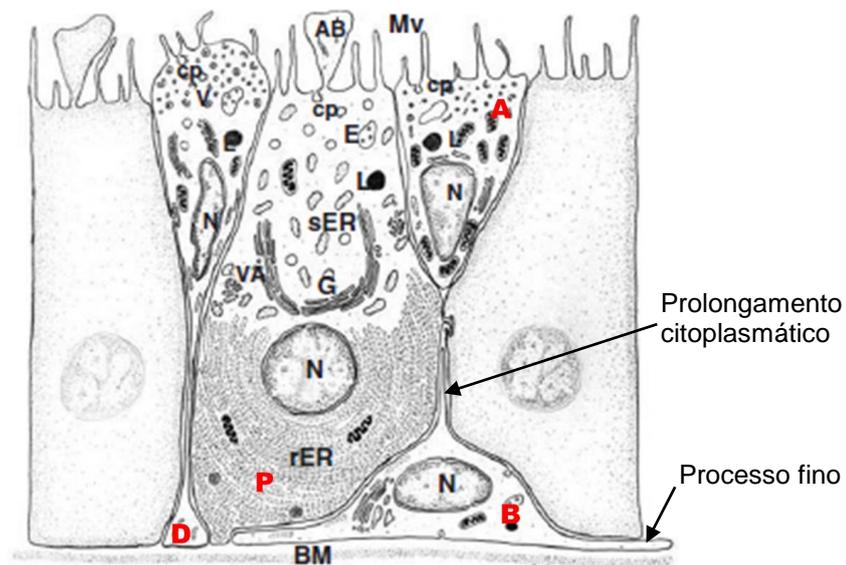


Figura 6 Esquema representando células encontradas no epitélio do segmento inicial do epidídimo, conforme visualização em microscopia eletrônica. Células delgadas (D) são alongadas e se estendem até a membrana basal, célula principal (P) com componentes do aparato endocítico, célula basal (B) que se estende ao longo da membrana e emite seus processos finos em direção ao lúmen e uma célula apical (A), que ao contrário da célula delgada não alcança a membrana basal. Fonte: ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, p.1077, (2006).

As células apicais (**Fig. 6**) são encontradas, principalmente, no epitélio do segmento inicial e na cabeça do epidídimo. Estas células não mantêm contato com a

membrana basal, seu núcleo é oval e seu citoplasma apresenta vacúolos e vesículas de endocitose. As células apicais diferem das células principais e delgadas com relação à distribuição relativa, ao aspecto morfológico e ao perfil de expressão protéica. Apesar de serem distintas das outras células, pouco se sabe sobre suas funções específicas, embora seja conhecido que as células apicais fazem endocitose de substâncias do lúmen (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

As células claras (**Fig. 5**), na maior parte dos mamíferos, estão localizadas na cabeça, corpo e cauda do epidídimo (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Nestas células podem ser identificados, em geral, três compartimentos distintos, segundo as organelas citoplasmáticas estejam distribuídas ao longo da célula. Assim, há uma região apical que contem numerosas vesículas, endossomos e corpos multivesiculares, principalmente. Imediatamente abaixo da região apical ocorrem numerosos lisossomos, abaixo dos quais estão localizados o núcleo e gotas lipídicas (SERRE; ROBAIRE, 1998). Devido a tais características, foi proposto que essas células têm função endocítica. As células claras, normalmente, captam os conteúdos de gotas citoplasmáticas liberadas pelos espermatozoides à medida que eles são transportados no ducto epididimário. Este tipo celular, também, faz endocitose, região-específica, de várias proteínas (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). As células claras tornam-se anormalmente grandes e preenchidas com lisossomos em condições experimentais que desregulam a função normal do testículo e do epidídimo (MOORE; BEDFORD, 1979; SERRE; ROBAIRE, 1998; TRASLER; HERMO; ROBAIRE, 1988).

As células basais apresentam corpo celular hemisférico, repousam sobre a membrana basal cobrindo grande parte da circunferência do ducto epididimário e não contactam o lúmen do mesmo, embora tenham prolongamentos citoplasmáticos, insinuados entre as células principais, que podem estender-se em direção ao lúmen (**Figs. 5 e 6**); também têm processos finos (**Figs. 5 e 6**) que se estendem ao longo da membrana basal (SERRE; ROBAIRE, 1998). Contudo, em ratos após ligação dos ductos eferentes e castração estas células adquirem morfologia larga, bulbosa em forma de cúpula, ficam aglomeradas e mostram poucos processos laterais curtos (VERI; HERMO; ROBAIRE, 1993). Estas alterações morfológicas permitiram inferir que, em condições normais, as células basais têm a forma e o arranjo determinados pelo volume e pressão exercidos pelos fluidos luminiais e espermatozoides sobre o epitélio (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). A presença de vesículas

cobertas sugere que endocitose (mediada por receptor) de fatores derivados do sangue ou das células principais deve ocorrer nas células basais (CLERMONT; RAMBOURG; HERMO, 1995). Também foi proposto que as células basais podem atuar como células imunes devido a sua capacidade de responder a vários antígenos expressos em macrófagos quando há autoantígenos espermáticos no lúmen (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006; SEILER; COOPER; NIESCHLAG, 2000).

As células halo, pequenas e com citoplasma claro e estreito, estão presentes no epitélio de todas as regiões do epidídimo. Geralmente, estas células estão localizadas na base, porém são observadas ao longo da altura do epitélio sem contactar o lúmen. As células halo têm sido descritas como linfócitos (ROBAIRE; HERMO, 1988) ou monócitos (ISNARD-BAGNIS et al., 2003), tipos celulares difíceis de distinguir à microscopia de luz devido a sua similaridade em tamanho e morfologia nuclear (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Após estudos com imunomarcção foi esclarecido que as células halo, em animais adultos jovens, consistem em linfócitos T *helper*, linfócitos T citotóxicos e monócitos (SERRE; ROBAIRE, 1998), o que indica que sob condições normais, este tipo celular é a célula imune primária do epidídimo (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

Entre as células principais do epidídimo forma-se o complexo juncional, composto por junções de aderência, *gap* e *tight* localizados na região apical das células. As junções *tight*, entre as membranas basolaterais apicais de células principais adjacentes, formam a barreira hemato-epididimária (BHE). Esta barreira mantém um microambiente luminal especializado para a manutenção dos espermatozoides, restringindo a passagem de íons, solutos e macromoléculas através do epitélio do epidídimo. Desse modo forma-se o microambiente adequado, de modo que os espermatozoides são banhados em fluido apropriado em cada estágio de maturação, enquanto transitam ao longo do epidídimo (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006; TURNER, 1991).

O epidídimo, também, desempenha importante papel na proteção dos espermatozoides contra o sistema imune, xenobióticos e EROs. Dentre os mecanismos de defesa, estão à síntese e secreção de proteínas específicas como as defensinas e de compostos antioxidantes como a taurina e a glutathiona que fazem rápida eliminação de agentes potencialmente nocivos aos espermatozoides (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

Sabe-se que os espermatozoides de mamíferos são susceptíveis a dano oxidativo pela alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que formam sua membrana (KUMAR et al., 2015, ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Assim, em cada região do epidídimo há o próprio mecanismo para proteger os espermatozoides devido a fatores como: i) atividade metabólica diferente entre as regiões do epidídimo, resultando em diferentes tipos de EROS que devem ser eliminados de forma adequada; e ii) espermatozoides em diferentes estágios de maturação em cada região, e portanto, com diferenças em relação ao dano oxidativo (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

Há no segmento inicial geração de EROS de várias fontes devido ao fluido luminal altamente oxigenado, a maior vascularização e alta atividade metabólica desta região do epidídimo (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004). Nos segmentos distais do epidídimo, as células epiteliais, também, são metabolicamente ativas e os espermatozoides são expostos ao ambiente rico em oxigênio; entretanto, há menor vascularização em relação ao segmento inicial. Desse modo, nas regiões distais do epidídimo existem diferentes mecanismos de defesa antioxidante para proteger os espermatozoides. As principais enzimas antioxidantes presentes no epidídimo incluem: a superóxido dismutase, γ -glutamil–transpeptidase, glutathione peroxidase, glutathione transferase e indolamina dioxigenase (NONOGAKI et al, 1992; PERRY; JONES; HALL, 1993; VERNET; AITKEN; DREVET, 2004; YOSHIDA et al., 1980).

A diminuição da ação das enzimas antioxidantes predispõe a ocorrência do EO, que afeta a integridade genômica dos espermatozoides induzindo a altas frequências de quebra tanto na fita simples como nas fitas duplas de DNA (TWIGG et al., 1998).

Apoptose de células germinativas

A morte celular em tecidos normais é um fenômeno biológico conhecido, e é uma forma de regulação da população celular. Ocorre de forma intrínseca à célula, independente de alterações do meio ambiente ocasionando a autodestruição de células ou grupos celulares, sendo denominado apoptose. Em células somáticas a apoptose e a necrose resultam em fragmentação do DNA pela ação de mecanismos

apoptóticos, como a ativação das endonucleases ou por mecanismos passivos como a necrose (RICCI et al., 2002).

A apoptose é um dos mecanismos que regula a morte celular durante o processo normal da espermatogênese em mamíferos. As espermatogônias e as espermátides redondas certamente morrem por apoptose, pois apresentam características morfológicas clássicas como a compactação do DNA e alterações na membrana. A extensão da apoptose em espermátocitos e espermátides alongadas é menos clara, mas sabe-se que hormônios endócrinos como T, FSH e LH podem regular o processo de apoptose em todos os tipos de células germinativas. Além disso, estima-se que mais de 75% dos espermatozoides de mamíferos adultos sofrem degeneração ainda no testículo, enquanto que as células germinativas em apoptose são liberadas no lúmen tubular ou fagocitadas pelas células de Sertoli (PRINT; LOVELAND, 2002).

A sericina como antioxidante

A sericina, substância com propriedades antioxidantes, é um dos componentes do casulo do bicho-da-seda *Bombyx mori* e compreende de 20 a 30% do peso total do casulo (MASAHIRO; HIDEYUKI; NORIHISA, 2000; SASAKI; YAMADA; KATO, 2000) sendo sintetizada especificamente na glândula sericígena do bicho-da-seda, *Bombyx mori*.

A sericina é uma proteína globular, cuja massa molecular varia de 10 a 300 kDa, formada por 18 aminoácidos principais, entre outros, com três grupamentos laterais: amina, hidroxila e carboxila (WEI; LI; XIE, 2005).

Entre os aminoácidos da sericina podem ser citados a serina e o ácido aspártico que constituem, aproximadamente, 33,4% e 16,7% da sua estrutura, respectivamente (CHO et al., 2003). A sericina é uma macromolécula solúvel em água cujas atividades biológicas estão associadas ao seu peso molecular (KAEWKORN et al., 2012) que determina sua utilização. De maneira que peptídeos de sericina com peso menor que 20 kDa são utilizados em cosméticos e medicamentos; enquanto que peptídeos de peso molecular maior que 20 kDa são

utilizados em biomateriais médicos, materiais biodegradáveis, composição de polímeros, biomembranas funcionais, hidrogel e fibras funcionais (ZHANG, 2002).

As atividades biológicas da sericina possibilitam utilizá-la em meios de criopreservação, em meios de cultura de células e como antioxidante, entre outras aplicações. Resultados de estudos realizados em queratinócitos humanos, irradiados com UVB, sugeriram que a sericina tem aplicação potencial em indústrias de cosméticos (DASH et al., 2008). Kato (1998) observou que a sericina inibiu a peroxidação lipídica e a atividade da tirosinase, enquanto que Li et al. (2008a, 2008b) demonstraram o efeito protetor da sericina contra lesões gástricas e hepáticas induzidas pelo álcool em camundongos. A sericina promoveu o processo de cicatrização de feridas sem causar inflamação e é amplamente utilizada em engenharia de tecidos (KAEWKORN et al., 2012). O consumo de sericina levou a supressão da tumorigênese do colo de camundongos, pela sua capacidade de redução do EO (KAEWKORN et al., 2012), também foi evidenciado a diminuição da concentração dos lipídios circulantes e a melhora da intolerância a glicose em ratos (OKAZAKI et al., 2010). Takechi et al. (2014) sugeriram que a sericina pode ser utilizada como alimento benéfico para a saúde humana pelo seu alto poder antioxidante.

Em meio de criopreservação para espermatozoides de búfalo a suplementação de sericina nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1%, melhorou a integridade da membrana plasmática e motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento. Enquanto que a suplementação nas concentrações de 1,5 e 2% piorou os mesmos parâmetros observados. Segundo Kumar et al. (2015), a melhora observada pós-descongelamento deve-se a alta atividade antioxidante da sericina.

Os mecanismos antioxidantes da sericina, bem como seus componentes de eliminação ainda não estão completamente elucidados (TAKECHI et al., 2014). Kato et al. (1998) lançaram a hipótese de que a sericina tem capacidade de neutralização e eliminação de EROS possivelmente devido ao efeito quelante dos grupos ácidos hidroxilas (hidroxiaminoserina e treonina), que são abundantes na molécula da sericina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HAILA, A.; FAIN-MAUREL, M. A. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. **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 rat epididymis. **Journal Andrology**, v. 17, p. 208–222, 1996.

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; HALABI, J.; PENG, J.; VAZQUEZ-LEVIN, M. Proteomics, oxidative stress and male infertility. **Reproductive Bio Medicine Online**, v. 29, p. 32–58, 2014.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3–13, 2010.

ATTAMAN, J. A.; TOTH, T. L.; FURTADO, J.; CAMPOS, H.; HAUSER, R.; CHAVARRO, J. E. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 27, n.5, p. 1466–1474, 2012.

BEU, C. C. L.; ORSI, A. M.; DOMENICONI, R. F. Structure of the Lining Epithelium of the Cauda Epididymis of the Golden Hamster. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 38, p. 49–57, 2009.

BRASIL. Ministério da saúde. Saúde da família: Obesidade. Brasília, 2006. **Série Cadernos de Atenção Básica; n. 12. Série A. Normas e Manuais Técnicos**. ISBN 85-334-1066-2

BRASIL. Ministério da saúde. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico – 2012**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2012_vigilancia_risco.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da saúde. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico – 2014**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2015.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007.

CHO, K.Y.; MOON, J.Y.; LEE, Y.W.; LEE, K.G.; YEO, J.H.; KWEON, H.Y.; KIM, K.H.; CHO, C.S.; Preparation of self-assembled silk sericina nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, p. 36–42, 2003.

CHOI, H. S.; PARK, S. J.; LEE, Z. H.; LIM, S. K. The effects of a high fat diet containing diacylglycerol on bone in C57BL/6J mice. **Yonsei Medical Journal**, v. 56, n.4, p. 951-960, 2015.

CLERMONT, Y.; RAMBOURG, A.; HERMO, L. Trans-Golgi network (TGN) of different cell types: three-dimensional structural characteristics and variability. **Anatomical Record**, v. 242, p. 289–301, 1995.

COLLINS, S.; MARTIN, T. L.; SURWIT, R. S.; ROBIDOUX, J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 243–248, 2004.

COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Sup. 2, v. 24, p. 332-340, 2008.

DASH, R.; MANDAL, M.; GHOSH, S. K.; KUNDU, S.C. Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 311, p. 111-119, 2008.

FLICKINGER, C. J.; HOWARDS, S. S.; AND ENGLISH, H. F. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. **American Journal Anatomy**, v. 152, p. 557–586, 1978.

GOYAL, H. O. Morphology of the bovine epididymis. **American Journal of Anatomy**, v. 172, p. 155–172, 1985.

HAMILTON, B. E.; HOYERT, D.L.; MARTIN, J.A.; STROBINO, D.M.; GUYER, B.; Annual summary of vital statistics: 2010–2011. **Pediatrics**, v. 131, p. 548-558, 2013.

HINTON, B. T.; PALLADINO, M. A.; RUDOLPH, D.; LAN, Z. J.; LABUS, J. C. The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. **Current Topics in Developmental Biology**. v. 33, p.61–102, 1996.

HOLDCRAFT, W.; BRAUN, R. E. Hormonal regulation of spermatogenesis. **International journal of andrology**, v. 27, p. 335–342, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil: pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003**. IBGE, Rio de Janeiro, 2004.

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

JARA, M.; ESPONDA, P.; CARBALLADA, R. Abdominal temperature induces region specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymidis of the mouse. **Biology of. Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1189–1196, 2002.

JENSEN, B. A. H.; NIELSEN, T. S.; FRITZENC, A. M.; HOLM, J. B.; FJAERE, E.; SERUP, A. K.; BORKOWSKI, K.; RISIS, S.; PAERREGAARD, S.I.; SØGAARD, I.; POUPEAU, A.; POULSEN, M.; MA, T.; SINA, C.; KIENS, B.; MADSEN, L.; KRISTIANSEN, K.; TREEBAK, J. T. Dietary fat drives whole-body insulin resistance and promotes intestinal inflammation independent of body weight gain. **Metabolism**, v. 65, n. 12, p. 1706-1719, 2016.

JENSEN, T.K; HEITMANN, B. L.; JENSEN, M. B.; HALLDORSSON, T. I.; ANDERSSON, A. M.; SKAKKEBAEK, N. E.; JOENSEN, U. E.; LAURITSEN, M. P.; CHRISTIANSEN, P.; DALGARD, C.; LASSEN, T. H.; JORGENSEN, N. High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97,n. 2, p. 411–418, 2013.

JUNG, S-R.; SONG, N-J.; YANG, D. K.; CHO, Y-J.; KIM, B. J.; HONG, J-W.; YUN, U. J.; JO, D-G.; LEE, Y. M.; CHOI, S. Y.; PARK, K. W. Silk proteins stimulate osteoblast differentiation by suppressing the Notch signaling pathway in mesenchymal stem cells. **Nutrition research**, v. 33, p. 162–170, 2013.

KAEWKORN, W.; LIMPEANCHOB, N.; TIYABOONCHAI, W.; PONGCHAROEN, S.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. Effects of silk sericin on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. **Biological Research**, v.45, p. 45-50, 2012.

KAKAR, S.S.; MALIK, M.T.; WINTERS, S.J.; MAZHAWIDZA, W. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure, expression, and signaling transduction. **Vitamins & Hormones**, v. 69, p.151–207, 2004.

KATO, N.; SATO, S.; YAMANAKA, A.; YAMADA, H.; FUWA, N.; NOMURA, M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 145–147, 1998.

KEFER J. C.; AGARWAL A.; SABANEKH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International Journal of Urology**, v. 16, p. 449-457, 2009.

KERR, J.B.; LOVELAND, K. L.; O'BRYAN, M. K.; KRETZER, D. M. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3. ed. Birmingham, Alabama. Elsevier, p. 827-920, 2006.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução a patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUMAR, P., KUMAR, D., SIKKA, P., SINGH, P. Sericin supplementation improves semen freezability of buffalo bulls by minimizing oxidative stress during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 26–31, 2015.

LEESON, C. R.; ADAMSON, L. The mammalian tunica vaginalis testis and its fine structure and function. **Acta Anatomica**. V. 51, p. 226–240, 1962.

LI, Y.-G.; JI, D.-F.; LIN, T. B.; ZHONG, S.; HU, G.-Y., CHEN, S. Protective effect of sericin peptide against alcohol-induced gastric injury in mice. **Chinese Medical Journal (Engl)**, v. 121, p. 2083-2087, 2008a.

LI, Y-G.; JI, D.-F.; CHEN, S.; HU, G.-Y. Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. **Alcohol & Alcoholism**, v. 43, n. 3, p. 246-253, 2008b.

MAGNUSDOTTIR, E. V.; THORSTEINSSON, T.; THORSTEINSDOTTIR, S.; HEIMISDOTTIR, M.; OLAFSDOTTIR, K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. **Human Reproduction**, v. 20, n. 1, p. 208-215, 2005.

MASAHIRO; HIDEYUKI; NORIHISA. Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1505–1511, 2000.

MENDIOLA, J.; TORRES-CANTERO, A. M.; MORENO-GRAU, J. M.; TEN, J.; ROCA, M.; MORENO-GRAU, S.; BERNABEU, R. Food intake and its relationship with semen quality: a case-control study. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 3, p. 812–818, 2009.

MOORE, H. D. M., AND BEDFORD, J. M. Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. **Anatomical Record**, v. 193, 293–311, 1979.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para clínica**. 4° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

OKAZAKI, Y.; KAKEHI, S.; XU, Y.; TSUJIMOTO, K.; SASAKI, M.; OGAWA, H.; KATO, N. Consumption of sericin reduces serum lipids, ameliorates glucose tolerance and elevates serum adiponectin in rats fed a high-fat diet. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 1534-1538, 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. 32ª Sessão do Comitê Permanente de Nutrição da Organização das Nações Unidas (SCN/ONU): de 14 a 18 de março de 2005: relatório final / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2005.

PADRÓN R. S.; MÁZ, J.; ZAMORA, R.; RIVEROL, F.; LICEA, M.; MALLEA, L.; RODRÍGUEZ, J. Lipids and testicular function. **International Urology and Nephrology**, v. 21, n. 5, p. 515–519, 1989.

PALACIOS, J.; REGADERA, J.; NISTAL, M.; PANIAGUA, R. Apical mitochondria-rich cells in the human epididymis: an ultrastructural, enzymohistochemical, and immunohistochemical study. *Anatomical Record*. v. 231, p. 82–88, 1991.

PERRY, A. C.; JONES, R.; HALL, L. Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. **Biochemical Journal**. v. 293, p. 21–25, 1993.

PRINT, C. G.; LOVELAND, K. L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. **BioEssays**, v. 22, n. , p. 423 -430, 2000.

RATO, L.; ALVES, M. G.; CAVACO J. E.; OLIVEIRA, P. F. High-energy diets: a threat for male fertility? **Obesity reviews**. v. 15, p. 996–1007, 2014.

RICCI, G.; PERTICARARI, S.; FRAGONAS, E.; GIOLO, E.; CANOVA, S.; POZZOBON, C.; GUASCHINO, S.; PRESANIET, G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. **Human Reproduction**, v.17, n. 10, p. 2665–2672, 2002.

ROBAIRE, B., HERMO, L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. In: **Knobil and Neill's The Physiology of Reproduction**, New York. Raven Press, p. 999–1080, 1988.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The Epididymis. In: **Knobil and Neill's The Physiology of Reproduction**, 3 ed. Birmingham, Alabama. Elsevier, p.1072-1120, 2006.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. **Histologia texto e atlas**. 2. Ed. Panamericana, 1993.

SAJJADIAN, F.; ROSHANGAR, L.; HEMMATI, A.; NORI, M.; SOLEIMANI-RAD, S.; SOLEIMANI-RAD, J. The effect of BSO-induced oxidative stress on histologic feature of testis: testosterone secretion and semen parameters in mice. **Iranian Journal Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 8, p. 606–612, 2014.

SASAKI M.; YAMADA H.; KATO N. Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1505-1511, 2000.

SEILER, P.; COOPER, T. G.; NIESCHLAG, E. Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. **International Journal of Andrology**, v.23, p. 65–76, 2000.

SEO, C-W.; UM, I. C.; RICO, W. C.; KANG, M. Y. Antihyperlipidemic and body fat-lowering effects of silk proteins with different fibroin/sericin compositions in mice fed with high fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4192-4197, 2011.

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

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

SETCHELL, B. P.; BREED, W. G. Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3 ed. Birmingham, Alabama. Elsevier, p. 771-808, 2006.

SHAFIK, A.; OLFAT, S. Scrotal lipomatosis. **British Journal of Urology**, v. 53, n. 1, p. 50-54, 1981.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York. Raven Press, p. 1363-1434, 1994.

STORLIEN, L. H.; JENKINS, A. B.; CHISHOLM, D. J.; PASCOE, W. S.; KHOURI, S.; KRAEGEN, E. W. Influence of Dietary Fat Composition on Development of Insulin Resistance in Rats Relationship to Muscle Triglyceride and w-3 Fatty Acids in Muscle Phospholipid. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 280-289, 1991.

STORLIEN, L.H.; BAUR, L. A.; KRIKETOS, A. D.; PAN, J. G.; COONEY, JENKINS, A. B.; CALVERT, G. D.; CAMPBELL, L.V. Dietary fats and insulin action. **Diabetologia**, v. 39, n. 6, p. 621-631, 1996.

TAKECHI, T; WADA, R.; FUKUDA, T.; HARADA, K.; TAKAMURA, H. Antioxidant activities of two sericin proteins extracted from cocoon of silkworm (*Bombyx mori*) measured by DPPH, chemiluminescence, ORAC and ESR methods. **Biomedical reports**, v. 2, p. 364-369, 2014.

TOPPARI, J. ; LARSEN, J. C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE JR., L. J.; JEGOU, B.; JENSEN, T. K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J. A.; MEYER, O.; MULIER, J.; MEYTS, E. R-D.; SCHEIKE, T.;

SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBAEKL, N.E. Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, supplements. 4, v. 104, p. 741-803, 1996.

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, 1988.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v.14, n.3, p. 243-258, 2008.

TURNER, T. T. Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.637, p. 364–383, 1991.

TWIGG, J. P.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.13, n. 7, p.1864–1871, 1998.

TWIGG, J. P.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v.13, n.6, p.1429–1436, 1998.

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

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 216, p. 31–39, 2004.

VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M.; ROJAS-CASTAÑEDA, J. C.; CHÁVEZ-SALDAÑA, M.; GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; GARCÍA-CRUZ, M. E.; CUEVAS-ALPUCHE, O.; REYES-ROMERO, M.M.; ZAMBRANO, E. Alterations in the spermatid function generated by obesity in rats. **Acta histochemica**, v.113, p. 214-220, 2011.

WEI, T., LI, M. Z., XIE, R. J. Preparation and structure of porous silk sericin materials. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 290, p. 188–194, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Annual Technical Report, 2014. **Human reproduction programme**. WHO, Geneva, 2015.

YOSHIDA, R.; NUKIWA, T.; WATANABE, Y.; FUJIWARA, M.; HIRATA, F.; HAYAISHI, O. Regulation of indolamine 2,3- dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. **Archives Biochemistry Biophysics**. v, 203, p. 343–351, 1980.

ZHANG, Y-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 91–100, 2002.

ZHAORIGETU, S.; SASAKI, M.; KATO, N. Consumption of sericin suppresses colon oxidative stress and aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by colon undigested sericin. **Journal of Nutrition Science Vitaminology**, v. 53, n. 3, p. 297-300, 2007.

ZHAORIGETU, S.; YANAKA, N.; SASAKI, M.; WATANABE, H.; KATO, N.; Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 15, n. 71, p. 11-7, 2003.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos possibilitaram elaborar o artigo científico intitulado:

**“SERICIN EXERTS ANTIOXIDATION ON TESTIS AND EPIDIDYMS OF C57BL/6
MICE FED HIGH FAT DIET”,**

que foi submetido à revista International Journal of Development Research.



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 07, Issue, 10, pp.15813-15820, October, 2017



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

SERICIN EXERTS ANTIOXIDATION ON TESTIS AND EPIDIDYMS OF C57BL/6 MICE FED HIGH FAT DIET

*¹Suellen Ribeiro da Silva Scarton, ¹Ana Caroline Barbosa Retameiro, ²Ana Tereza Bittencourt Guimarães, ^{1,2}Rose Meire Costa Brancalhão, ²Lucinéia Fatima Chasko Ribeiro and ¹Célia Cristina Leme Beu

¹Experimental Laboratory of Morphology, Center of Biological and Health Sciences, State University of Western Paraná, Cascavel, PR, BR

²Laboratory of Structural and Functional Biology, Center for Biological and Health Sciences, State University of Western Paraná, Cascavel, PR, BR

ARTICLE INFO

Article History:

Received 06th July, 2017
Received in revised form
15th August, 2017
Accepted 07th September, 2017
Published online 10th October, 2017

Keywords:

Male fertility, Sertoli cell,
Apoptosis, Hypercaloric diet,
Antioxidation, Silk protein.

ABSTRACT

Hyperlipidic diets rich in saturated fatty acids may negatively interfere with male fertility, as it facilitates the occurrence of oxidative stress. This study evaluated the antioxidant effect of oral administration of sericin on testis and epididymis of C57BL/6 mice fed a hyperlipidic diet. Four groups (n 5) were formed: Control (C); Sericin (S); High fat (HF); High fat + Sericin (HFS). The hyperlipidic diet was offered to the HF and HFS animals, every days for 14 weeks, whereas C and S were fed a standard diet during the same period. In the last 4 weeks the animals S and HFS received 1,000 mg / kg body weight of sericin by gavage, whereas animals C and HF 0.8% saline, the dose was adjusted weekly. Tissue was collected for analyzes of biomarkers of oxidative stress and morphological. The results obtained allowed to infer the oral administration of sericin it was effective in attenuating weight gain, improving morphology of the germinal epithelium, minimizing the occurrence of lipoperoxidation in the testis and apoptosis, both in the testis and in the epididymis, besides increasing the expression of biomarkers that regulate the antioxidant activity in the epididymis of animals fed a hyperlipidic diet.

*Corresponding author

Copyright ©2017, Suellen Ribeiro da Silva Scarton et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Suellen Ribeiro da Silva Scarton, Ana Caroline Barbosa Retameiro, Ana Tereza Bittencourt Guimarães, Rose Meire Costa Brancalhão, Lucinéia Fatima Chasko Ribeiro and Célia Cristina Leme Beu. 2017. "Sericin exerts antioxidation on testis and epididymis of C57BL/6 mice fed high fat diet", *International Journal of Development Research*, 7, (10), 15813-15820.

INTRODUCTION

The lifestyle and nutritional status of the individual are factors that may interfere with the male reproductive function. Animal and human studies have indicated that the consumption of high fat diets, especially those rich in polyunsaturated fatty acids, results in a decline in Male fertility (Rato et al., 2014). Fertility problems affect about 15% of the world's couples and at least 50% of the cases are related to male factors, with decreased semen quality being the main cause (Cui, 2010). The physiological processes of the testis are sensitive to metabolic alterations of the organism and these can be disturbed by the consumption of energy-rich diets (Rato et al., 2014). Local changes such as accumulation of fat in the scrotum may alter

the action of antioxidant proteins and result in increased reactive oxygen species (ROS) causing damage to spermatozoa (Jara et al., 2002; Magnusdottir et al., 2005; Shafik and Olfat, 1981). Targets for ROS damage include the major groups of biomolecules such as DNA, lipids and proteins (Nordberg and Arnér, 2001). ROS are the result of normal cellular metabolism, formed during enzymatic reduction of oxygen, but at high concentrations reduce the cellular oxidative potential facilitating the occurrence of oxidative stress (OS). Both enzymatic and non-enzymatic cellular antioxidant pathways try to equalize the beneficial generation of oxidants and harmful OS (Kefer et al., 2009). There is a consensus that OS represents the major cause of damage to male germ cells, and it is relevant that

supplementation with oral antioxidants could improve the quality of gametes (Jung *et al.*, 2013; Lewis *et al.*, 2013). In this context, natural substances such as sericin, arouse great interest because they have high capacity in minimizing the damages caused by ROS. Sericin is a protein extracted from the silkworm cocoon, *Bombyx mori* (Yan *et al.*, 2014; Zhang, 2002), considered to be an intimately inert (Panilaitis *et al.*, 2003). Among the biological activities of sericin were described: antioxidation, inhibition of tyrosinase, protection against alcohol-induced liver tumors, gastric insults and UV-induced injuries that led to apoptosis of keratinocytes (Dash *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2003). Seo *et al.* (2011) demonstrated that dietary supplementation with sericin and fibroin significantly suppressed weight gain, reduced body fat, and improved metabolism in mice fed a hyperlipid diet. This study aimed to evaluate whether the oral sericin treatment of the *Bombyx mori* silkworm was effective in improving the oxidative damage caused by the high fat diet in the testis and epididymis of C57BL/6 mice.

MATERIALS AND METHODS

Extraction and extraction of lyophilized sericin

Cocoons of *B. mori*, BRATAC silk from Brazil (Londrina, Paraná, Brazil), were fragmented to 1 cm². The sericin protein was extracted in autoclave (CS 18 - Primatec, Itu, SP, Brazil) at 120 °C and 1 kgf / cm² pressure for 60 minutes in the proportion of 6g of cocoon to 100 mL of distilled water. The crude extract obtained was filtered, for separation / removal of fibroin. The sericin hydrolyzate was frozen and then lyophilized (LT 1000 - Terroni Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brazil) for 54 hours (Gimenes *et al.*, 2014) and stored at room temperature until use.

Animals, diet and experimental protocol

This research was approved by CEUA (n° 1104/2014). Twenty male C57BL/6 mice, weighing 27 ± 2 g were obtained from the central laboratory of the State University of the West of Paraná - UNIOESTE. During the experiment the animals were housed in the Laboratory Room of the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism, in boxes with ad libitum access to water and feed, the temperature was maintained at 28 ± 2 °C, with a light / dark cycle of 12 h. The animals were randomly assigned into 4 groups, with n = 5: Control (C); Sericin (S); High fat (HF); High fat sericin (HFS). The high fat diet was offered to the HF and HFS animals for 14 weeks, while C and S were fed the standard diet Nuvilab® (Curitiba, PR, Brazil) during the same period; In the last 4 weeks S and HFS animals received 1,000 mg / kg body weight of sericin per gavage, and C and HF animals were treated with 0.8% saline. The high fat diet was prepared based on the AIN-93G / AIN-93M formulation for rapid growth and maintenance of rodents, when casein is used as a source of protein (Reeves *et al.*, 1993), plus 30% animal fat. At the end of the experiment the animals fasted overnight, the next day they were weighed and killed by anesthetic saturation (Xilazine 10 mg / Kg / body weight, ip; and Quetamina 100 mg / kg body weight, ip; Cristália, Brazil). Access to organs occurred via laparotomy, retroperitoneal and perigonadal fats, testes and epididymides were collected and weighed. The organs (right side) used for morphological analysis were fixed in mDF (modified Davidson Fluid) for 6 hours and post-fixed in 4% paraformaldehyde for 18 hours. For the analysis of biomarkers

of the antioxidant system (left side), the testis was used and the initial segment (SI) and cauda (CD) regions of the epididymis, the tissues were homogenized in Tris-HCL buffer (pH 7.4) and centrifuged for 10 minutes (12000 rpm, 4 °C), the supernatants were stored in a freezer at - 80 °C until the analyzes were performed.

Protein quantification

Protein quantification was performed from the supernatants (Bradford, 1976), then all samples were normalized to 1 mg / protein / ml in Tris-HCL (pH 7.4). Lipoperoxidation was determined in 60 µL of the testicular sample in order to estimate the indirect production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in absorbance of 535 nm from the comparison with standard malondialdehyde (MDA) curves in (17.86 mM Sodium Hydroxide, 0.317 mM Butylated Hydroxytoluene, 21.43 mM Thiobarbituric Acid, 0.73 M Trichloroacetic Acid). SOD activity was evaluated in 300 µL of the sample after the addition of 100 µL of ethanol, the mixture was centrifuged (12000 rpm for 10 minutes at 4 °C) and the supernatant was used for the tests. CAT and GST activity was evaluated in both the testis, SI and CD of the epididymis. The CAT activity evaluation used 3 µL of the samples and 297 µL of the reaction medium (13.5 mM hydrogen peroxide, 0.25 mM EDTA, 50 mM Tris-HCL pH 8.0), the absorbance measured at 240 nm (60 seconds at 7-second intervals). The GST analysis was performed from 20 µL of the sample after addition of 180 µL of the reaction medium (0.94 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 0.94 mM glutathione, pH 7.0 phosphate buffer 0.098 mM) the absorbance was read at 340 nm (4 minutes at 10-second intervals). All analyzes were performed in triplicate using SPECTRAMax® PLUS384 microplate reader (Molecular Devices Corporation, California, USA).

Biomarkers of oxidative stress

Substances reactive to thiobarbituric acid were determined aiming the indirect quantification of peroxides produced to demonstrate the intensity of lipid peroxidation occurrence (Federici *et al.*, 2007). SOD was evaluated according to the method of Crouch *et al.* (1981), which consists in quantifying the complex formed between superoxide and tetrazolium blue. The activity of CAT was established by the technique of Aebi, (1984), which are based on the principle of peroxide dismutation. The principle of GST activity analysis is that CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) is metabolized by GST conjugated to glutathione, resulting in increases in absorbance (Habig *et al.*, 1976).

Morphological analyzes

After fixation, testes and epididymides were dehydrated, diaphanized and included in paraffin. Sections of 5 µm were stained with hematoxylin-eosin (HE), photodocumented by Olympus DP71 camera coupled to Olympus Bx60® microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan), in a 40x objective. The images were analyzed for morphology and the mean tubular diameter was obtained with the aid of the Image Pro Plus 6.0® Program (Media Cybernetics, Maryland, USA), from 120 transverse sections of seminiferous tubules of each animal per group (n = 3) (Takashiba *et al.*, 2011).

Detection of DNA fragmentation – TUNEL

For the DNA integrity detection, the same histological processing was used for the morphological analyzes, however

the histological sections were collected on a previously prepared slide with silane. The samples were processed according to the manufacturer's specifications (QIA33 FragEL DNA - TdT Enzyme, Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Statistical analyzes

All results were expressed as mean \pm sd. ANOVA - double factor was used to compare the variables sampled between the experimental groups ($\alpha = 5\%$) and compared by the LSD follow-up test, $p < 0.05$.

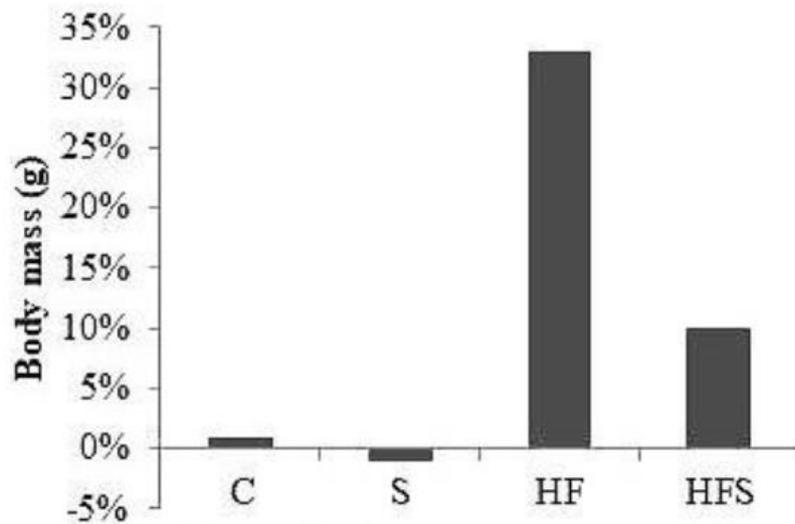


Figure 1 | Body weight at the end of the experiment, $n = 5$.

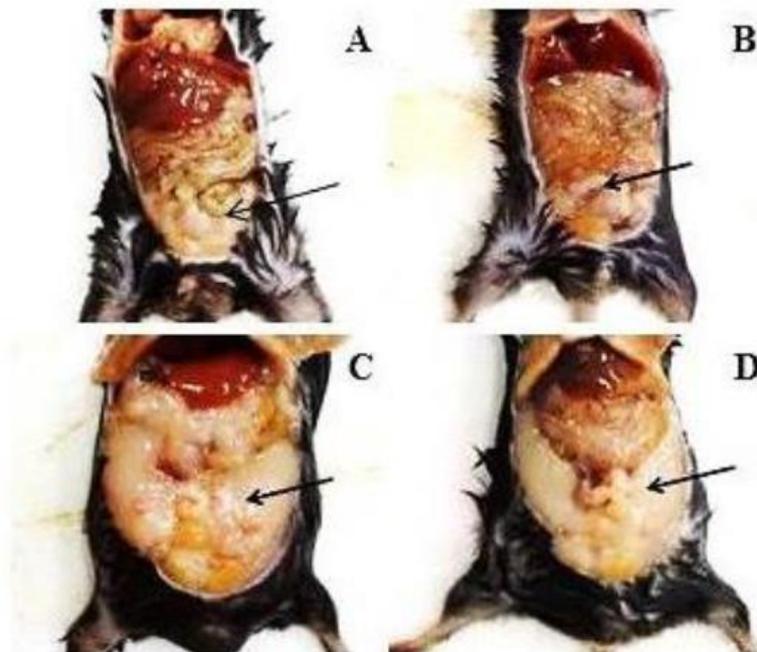


Figure 2 | The arrows indicate accumulation of fat in the abdominal cavity in animals of groups C (A), S (B), HF (C) and HFS (D).

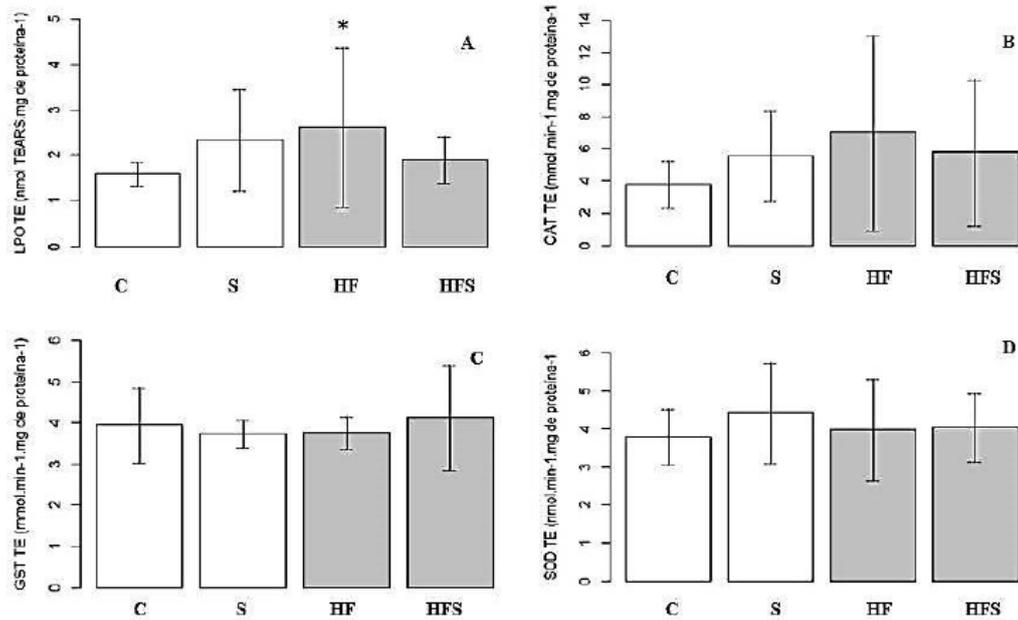


Figure 3 | Biomarkers of oxidative stress in testis. In the representation of the occurrence of lipoperoxidation (LPO) in the testis of HF animals significantly higher compared to other groups (A). The activity of CAT (B), GST (C) and SOD in (D) was not altered between groups or in relation to sericin treatment. $n = 5$, mean \pm sd ($p < 0.05$).

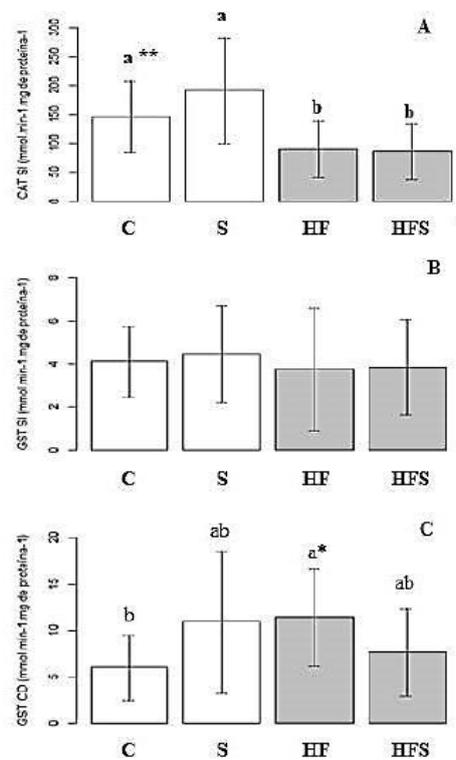


Figure 4 | Biomarkers of oxidative stress in SI and CD of the epididymis. CAT activity in SI was significantly higher in groups C and S (** $p < 0.01$) (A). Activity of GST in SI was not different between groups (B), and activity of GST in CD was increased in HF when compared to the other groups (C) (* $p < 0.05$), $n = 5$, mean \pm sd.

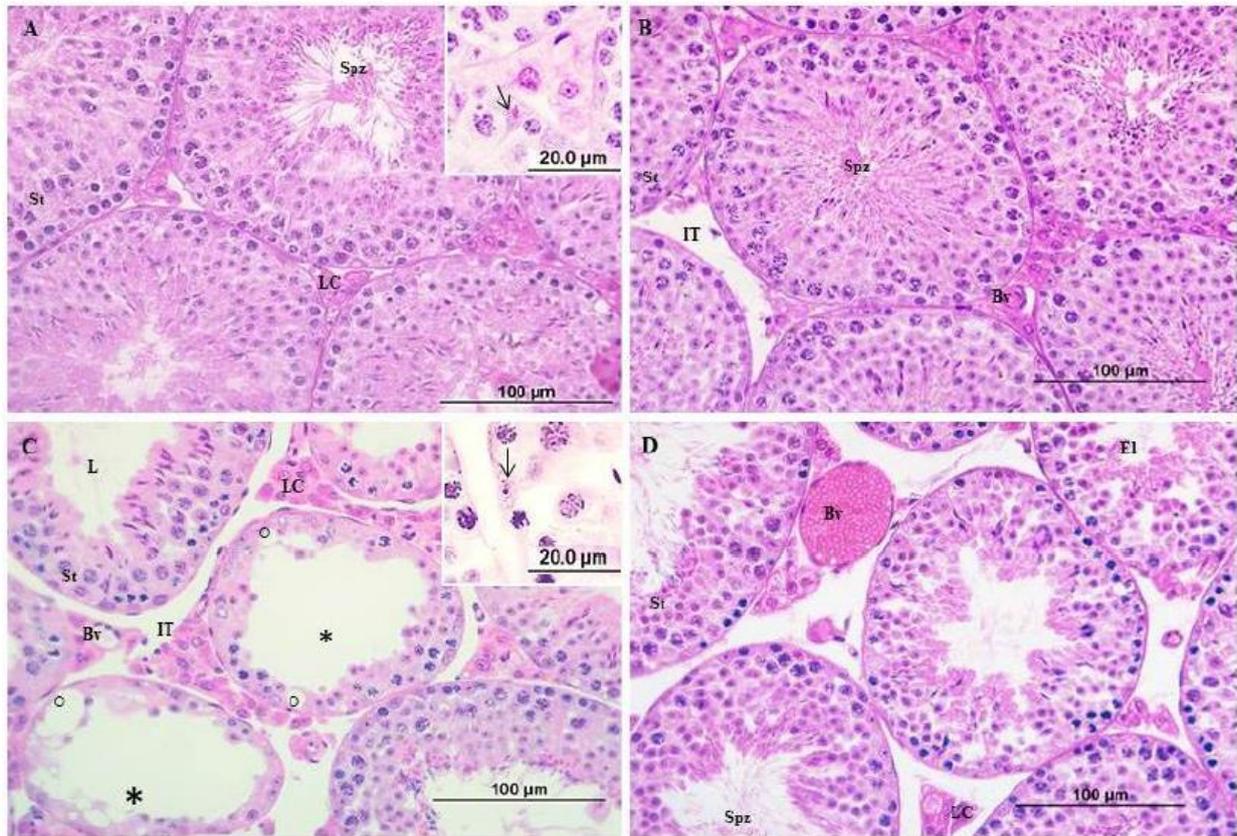


Figure 5 | Photomicrographs of cross sections of testicles of animals of groups C (A), S (B), HF (C), HFS (D). The following are indicated: seminiferous tubules (St), spermatozoa (Spz), blood vessels (Bv), Leydig cell groups (LC) in the interstitium (IT), seminiferous tubule lumen (L), epithelial loss (El) of the seminiferous tubule, atrophic seminiferous tubules (*), vacuolization of the Sertoli cells (°). HE. Insert. Sertoli cell nucleus (→). HE.

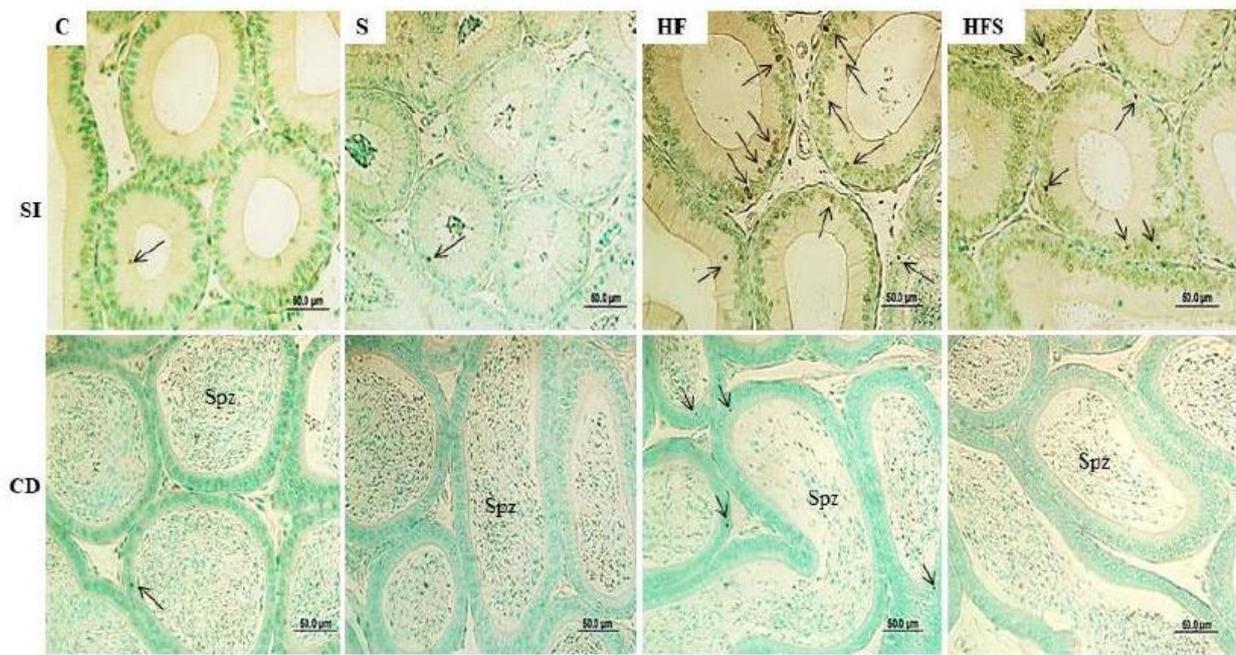


Figure 6 | Photomicrographs of cross sections of initial segment (SI) and cauda (CD) of epididymis of animals of groups C, S, HF, HFS. The arrows (↑) indicate cells of the epididymal epithelium in the process of apoptosis (brown) occurring in more frequently in HF. It is possible to observe spermatozoa (Spz) in the lumen of the tail of the epididymis. TUNEL technique, against methyl green coloration.

RESULTS

Analysis of body dimensions

The variation in body mass between groups is shown in figure 1. At the end of the experiment the HF animals had a mean weight increase of 33%, whereas HFS animals had a mean increase of only 10%. The reduction of perigonial fat accumulation can be observed in HFS animals (Fig. 2D), compared to HF animals (Fig. 2C), after opening of the abdominal cavity. HFS animals presented reduction of retroperitoneal and perigonadal fat weight ($p < 0.05$). There was no difference in the weight of the testes and epididymis in the comparison between groups.

Biomarkers of oxidative stress

The indirect quantification of lipid peroxidation (LPO) in the testis was significantly increased in HF and attenuated in HFS, with mean values returning to the C standard ($p < 0.05$). The enzymatic activity of SOD, CAT and GST was not altered in any of the groups (Fig. 3). CAT activity was higher in C and S than in HF and HFS ($p < 0.05$) in the initial segment of the epididymis; While there was no significant difference in GST activity between groups in this segment. In the cauda of the epididymis, GST activity increased significantly in HF ($p < 0.01$) and HFS ($p < 0.05$) (Fig. 4).

Morphometric and morphological analyzes of the testis

The diameter analyzes of the seminiferous tubules showed significant differences in the comparison between groups C and HF, and in relation to treatment. HFS animals had a mean tubular diameter greater than HF animals. Morphological analyzes showed frequent epithelial changes in HF, such as vacuolization of Sertoli cells and tubular atrophy. These morphological observations were less frequent in HFS (Fig. 5).

Detection of DNA fragmentation – TUNEL

DNA fragmentation detected by labeling was decreased in the initial segment and cauda of the HFS epididymis compared to HF. It was possible to observe several sections with apoptotic cells in all segments of the epididymal epithelium and decrease of spermatozoa in the cauda of the epididymis (Fig. 6).

DISCUSSION

The male genital system has among its main functions the production of germ cells and androgen hormones by the testes; also, in this system occurs maturation, protection, transport and storage of the spermatozoa in the epididymis. These functions depend, among other factors, on adequate nutritional intake (Donnell *et al.*, 2006). Current dietary behavior is a result of changes in diet and food composition, with the ingestion of foods that are highly palatable, poor in nutrients and in fiber and with large amounts of saturated sugars and fats (lipids) (Brasil, 2011; Rato, 2014). The consumption of hyperlipidic diets affects the testicular physiology, causing disruption in its metabolism (Rato *et al.*, 2014). Nascimento *et al.* (2010), reported that C57BL/6 mice treated with a hyperlipidic diet, rich in saturated fatty acids, developed lipid profile alterations, in addition to obesity. In the present study, the hyperlipid diet caused an increase in body mass and in

retroperitoneal and gonadal fat. It also promoted changes in oxidative stress indicators. Changes in lipid profile and weight gain may cause oxidative stress (Hansel *et al.*, 2004), a condition in which reactive oxygen species can damage cells and tissues. Testicles and sperm are very sensitive to the attack of reactive oxygen species and lipid peroxidation (Farias *et al.*, 2010). Antioxidant substances, such as sericin, have been studied for efficacy in minimizing OS damage. Antioxidants act to maintain low concentrations of ROS, allowing the normal occurrence of signaling processes that use oxidation without causing cellular damage (Kefer *et al.*, 2009).

The present study used sericin from the silkworm *B. mori* as antioxidant, which promoted reduction of body mass gain and retroperitoneal and perigonadal fats in HFS animals. These results are in agreement with Seo *et al.* (2011), which demonstrated that sericin reduced body weight and body fat in hyperlipidic diet fed mice. Treatment with a hyperlipidic diet caused severe changes in the testicular epithelium, both in Sertoli cells and in germ cells, results that should cause damage to spermatogenesis. Such findings possibly stem from altered testicular metabolism, disturbed by the overload of saturated fatty acids that exert negative effects mainly on Sertoli cells (Rato *et al.*, 2014). The reduction of fertility in mice fed a hyperlipid diet was reported by Fan *et al.* (2015), these authors attributed the observed morphological damage to Sertoli cell atrophy and alteration of the integrity of the blood-testis barrier, structural formation between the capillaries and the interior of the seminiferous tubules, which protects the seminiferous epithelium from harmful substances originating in the blood circulation and of autoimmune reactions. Treatment with sericin in animals of the HFS group attenuated the morphological damage caused by the hyperlipidic diet, reducing the vacuolization of the Sertoli cells and the loss of the epithelium. One of the parameters used to evaluate spermatogenesis is the diameter of the seminiferous tubules (Attal *et al.*, 1963). Campos-Silva *et al.* (2015) reported decreased sperm production, indicated by the decrease in the diameter of the seminiferous tubules of rats fed a hyperlipid diet and prepared with saturated fatty acids. These authors stated that the supply of animal fat in the diet was responsible for the reduction of spermatozoa. Also in the present study, the results obtained showed a decrease in the diameter of the seminiferous tubules in animals of the HF group, and the treatment with sericin promoted a recovery of the diameter of the seminiferous tubules in the HFS group, and the means obtained were the same as those in group C. The Apoptosis was confirmed by the TUNEL test in the seminiferous tubule epithelium. The regulation of germ cell death in both spontaneous and induced forms is conditioned to the hormonal support, because in the absence of this factor cell death occurs exclusively via apoptosis. Non-hormonal stimuli such as heat stress, testicular toxins, and chemotherapeutic agents may cause apoptosis in germ cells, but the mechanisms by which these stimuli exert influence on apoptosis are unclear. It is believed that apoptosis of germ cells, as occurs in other somatic cells, is regulated by genes that inhibit or promote cell death (Hikim and Swerdloff, 1999). Rotgers *et al.* (2015) demonstrated that the transcription factor E2F1 controls apoptosis during the first wave of spermatogenesis, however more studies are needed. From the TUNEL test it can be seen that sericin treatment reduced the occurrence of apoptosis in HFS animals, both in the testes and in the initial segment and cauda of the epididymis. The epididymis has an antioxidant system composed of GST, SOD and CAT (Perry *et al.*, 1992,

1993). This system represents an important factor that protects the spermatozoa against ROS while they transit through the epididymis (Drevet *et al.*, 2006). The initial segment is highly vascularized and in the cauda, the sperm storage site, the cells are metabolically active, causing the sperm to be exposed to the oxygen rich environment, predisposing them to ROS and, consequently, to OS. The decrease in apoptosis of epithelial cells in these regions of the epididymis in HFS animals may indicate an improvement in the metabolic and antioxidant capacity of these cells, probably due to a decrease in the accumulation of perigonadal fat that remained high in HF animals. There was a reduction in the occurrence of TBARS in the testis of animals treated with HFS sericin, indirectly indicating the decrease in lipid peroxidation, which remained increased in HF animals. The effects of increased lipid peroxidation in the male genital system are mainly related to damage in sperm membranes, which may present loss of viability, motility and dysfunction of the intracellular calcium signaling pathway that interferes with the spermatozoan-oocyte fusion process (Aitken *et al.*, 2012). The activity of SOD, CAT and GST in the testis remained unchanged in all groups, both in relation to the hyperlipid diet and in relation to sericin treatment. The activity of these enzymes are indicative of the occurrence of OS (Pathak and Khandelwal, 2006). In relation to the epididymis, CAT activity was significantly decreased ($p < 0.05$) in animals that received the HF and HFS hyperlipid diet. The main function of CAT is to prevent the accumulation of hydrogen peroxide H₂O₂, which is generally the result of the dismutation of SOD. When H₂O₂ is not metabolized, it can occur to hydroxyl radical formation, which is the most reactive of ROS, and exerts its action especially on plasma membrane lipids (Hermes-lima and Storey, 1993). In contrast, GST activity in the cauda of the epididymis was increased. GST is an enzyme that catalyzes the conjugation of metabolites such as aromatic rings and byproducts of lipid peroxidation with reduced glutathione to transform the toxic compound into a more water-soluble form (Huber *et al.*, 2008). This increase may be due to the metabolic process of the lipid peroxides, indicating the activation of the cellular defense mechanisms. The antioxidant mechanisms of sericin as well as its elimination components are not yet completely elucidated (Takechi *et al.*, 2014). Kato *et al.* (1998) hypothesized that the function of neutralization and elimination of sericin can be provided by the chelating effect of the hydroxylic acid groups (hydroxyaminoacetic and threonine), which are abundant in the sericin molecule.

Conclusion

It can be concluded that at the dose administered sericin was not toxic to the organism and when associated with the hyperlipidic diet exerted antioxidant activity, evidenced reduction of body mass, lipid peroxidation in the testis, apoptosis in the testis and epididymis, and was further able to improve germ cell proliferation in the seminiferous tubules of HFS animals.

Acknowledgments

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Aebi, H. 1984. Oxygen Radicals In Biological Systems. *Methods Enzymol* 105: 121–126. Available At: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163>.
- Aitken, R. 1989. Generation Of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, And Human Sperm Function. *Biol Reprod* 41: 183–197. Available At: <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod41.1.183> [Accessed November 19, 2016].
- Attal, J., Courot, M., Richetin, C., Pisselet, C., Attal, J., Courot, M. and Richetin, C. Eveloppement Cpd, 1963. D Eveloppement Chez Le Taureau To Cite This Version: *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 3: 219–241.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Brasil - Ministério Da Saúde. Secretaria De Atenção À Saúde. Departamento De Atenção Básica (2014). *Guia Alimentar Para A Populacao Brasileira*. Available At: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2008.pdf.
- Campos-Silva, P., Furriel, A., Costa, W.S., Sampaio, F.J.B., Gregório, B.M. 2015. Metabolic And Testicular Effects Of The Long-Term Administration Of Different High-Fat Diets In Adult Rats. *Int Braz J Urol* 41: 569–575. Available At: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-55382015000300569&lng=en&nrm=iso&tIng=en [Accessed December 5, 2016].
- Crouch, R.K., Gandy, S.E., Kimsey, G., Galbraith, R.A., Galbraith, G.M.P. and Buse, M.G. 1981. The Inhibition Of Islet Superoxide Dismutase By Diabetogenic Drugs. *Diabetes* 30: 235–241. Available At: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6451462> [Accessed December 12, 2016].
- Cui, W. 2010. Mother Or Nothing: The Agony Of Infertility. *Bull World Heal Organ* 88: 881–882. Available At: http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/Bulletin_88_12/en/.
- Dash, R., Mandal, M., Ghosh, S.K. and Kundu, S.C. 2008. Silk Sericin Protein Of Tropical Tasar Silkworm Inhibits Uvb-Induced Apoptosis In Human Skin Keratinocytes. *Mol Cell Biochem* 311: 111–119. Available At: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-008-9702-z> [Accessed November 20, 2016].
- Donnell, L.O., Meachem, S.J., Stanton, P.G. and McLachlan, R.I. 2006. *Endocrine Regulation Of Spermatogenesis*, Third Edit. Elsevier Inc. Available At: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-515400-0.50026-9>.
- Drevet, R., Drevet, Jr, and Drevet, R. 2006. The Antioxidant Glutathione Peroxidase Family And Spermatozoa: A Complex Story. *Mol Cell Endocrinol* 250: 70–79. Available At: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427183> [Accessed November 23, 2016].
- Fan, Y., Liu, Y., Xue, K., Gu, G., Fan, W., Xu, Y. and Ding, Z. 2015. Diet-Induced Obesity In Male C57bl/6 Mice Decreases Fertility As A Consequence Of Disrupted Blood-Testis Barrier Ed. Jr Drevet. *Plos One* 10: 1–15. Available At: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0120775> [Accessed December 5, 2016].
- Farias, J.G., Puebla, M., Acevedo, A., Jose, P., Gutierrez, E., Zepeda, A., Calaf, G., Juantok, C. and Reyes, J.G. 2010. Oxidative Stress In Rat Testis And Epididymis Under Intermittent. *J Androl* 31: 314–321.
- Gimenes, M., Silva, V.R., Vieira, M.G. A., Silva, M.G.C. Scheer, A.P. 2014. High Molecular Sericin From Bombyx Mori Cocoons: Extraction And Recovering By Ultrafiltration. *Int J Chem Eng Appl* 5: 266–271. Available At: <http://www.ijcea.org/index.php?M=Content&C=>

- Index&A=Show&Catid=56&Id=718.
- Habig, H., Pabst, J. and Jakoby, B. 1976. Glutathione Aa From Rat Liver The Glutathione. *Archives Biochem Biophys* 175: 710–716.
- Hansel, B., Giral, P., Nobecourt, E., Chantepie, S., Bruckert, E., Chapman, M.J. and Kontush, A. 2004. Metabolic Syndrome Is Associated With Elevated Oxidative Stress And Dysfunctional Dense High-Density Antioxidative Activity. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4963–4971. Available At: [Http://Press.Endocrine.Org/Doi/10.1210/Jc.2004-0305](http://Press.Endocrine.Org/Doi/10.1210/Jc.2004-0305) [Accessed December 5, 2016].
- Hermes-Lima, M. and Storey, K.B. 1993. In Vitro Oxidative Inactivation Of Glutathione S- Transferase From A Freeze Tolerant Reptile In Vitro Oxidative Inactivation Of Glutathione S- Transferase From A Freeze Tolerant Reptile. *Mol Cell Biochem* 124: 149–158.
- Huber, P.C., Almeida, W.P. and Fátima, D. Â. 2008. Glutathione E Enzimas Relacionadas: Papel Biológico E Importância Em Processos Patológicos. *Quim Nov* 31: 1170–1179.
- Jara, M., Esponda, P. and Carballada, R. 2002. Abdominal Temperature Induces Region-Specific P53-Independent Apoptosis In The Cauda Epididymidis Of The Mouse. *Biol Reprod* 67: 1189–1196.
- Jones, R., Mann, T. and Sherins, R. 1979. Peroxidative Breakdown Of Phospholipids In Human Spermatozoa, Spermicidal Properties Of Fatty Acid Peroxides, And Protective Action Of Seminal Plasma. *Fertil Steril* 31: 531–537.
- Jung, S.R., Song, N.J., Yang, D.K., Cho, Y.J., Kim, B.J., Hong, J.W., Yun, U.J., Jo, D.G., Lee, Y.M., Choi, S.Y. and Park, K.W. 2013. Silk Proteins Stimulate Osteoblast Differentiation By Suppressing The Notch Signaling Pathway In Mesenchymal Stem Cells. *Nutr Res* 33: 162–170. Available At: [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Nutres.2012.11.006](http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Nutres.2012.11.006).
- Kefer, J.C., Agarwal, A. and Sabanegh, E. 2009. Role Of Antioxidants In The Treatment Of Male Infertility. *Int J Urol* 16: 449–457.
- Lewis, S.E.M., Aitken, R.J., Conner, S.J., De Iuliis, G., Evenson, D.P., Henkel, R., Giwercman, G.A. and Gharagozloo, P. 2013. The Impact Of Sperm Dna Damage In Assisted Conception And Beyond: Recent Advances In Diagnosis And Treatment. *Reprod Biomed Online* 27: 325–337. Available At: [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Rbmo.2013.06.014](http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Rbmo.2013.06.014).
- Magnusdottir, E.V., Thorsteinsson, T., Thorsteinsdottir, S., Heimisdottir, M. and Olafsdottir, K. 2005. Persistent Organochlorines, Sedentary Occupation, Obesity And Human Male Subfertility. *Hum Reprod* 20: 208–15. Available At: [Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/15567884](http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/15567884) [Accessed November 19, 2016].
- Nascimento, F.A.M., Barbosa-Da-Silva, S., Fernandes-Santos, C., Mandarim-De-Lacerda, C.A., Aguila, M.B. and Mba, Â. 2010. Adipose Tissue , Liver And Pancreas Structural Alterations In C57bl / 6 Mice Fed High-Fat-High-Sucrose Diet Supplemented With Fish Oil (N-3 Fatty Acid Rich Oil). *Exp Toxicol Pathol* 62: 17–25. Available At: [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Etp.2008.12.008](http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Etp.2008.12.008) [Accessed December 5, 2016].
- Noblanc, A., Kocer, A., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Conrad, M. and Drevet, Jr. 2011. Glutathione Peroxidases At Work On Epididymal Spermatozoa: An Example Of The Dual Effect Of Reactive Oxygen Species On Mammalian Male Fertilizing Ability. *J Androl* 32: 641–650.
- Panilaitis, B., Altman, G.H., Chen, J., Jin, H.J., Karageorgiou, V. and Kaplan, D. 2003. Macrophage Responses To Silk. *Biomaterials* 24: 3079–3085.
- Pedersen, J.Z., De Maria, F., Turella, P., Federici, G., Mattei, M., Fabrini, R., Dawood, K.F., Massimi, M., Caccuri, A.M. and Ricci, G. 2007. Glutathione Transferases Sequester Toxic Dinitrosyl-Iron Complexes In Cells: A Protection Mechanism Against Excess Nitric Oxide. *J Biol Chem* 282: 6364–6371.
- Perry, A.C.F., Jones, R., Niang, L.S.P., Jackson, R.M. and Hall, L. 1992. Genetic Evidence For An Androgen-Regulated Epididymal Secretory Glutathione Peroxidase Whose Transcript Does Not Contain A Selenocysteine Codon. *Biochem J* 285: 863–870. Available At: [Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/1386734](http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed/1386734) [Accessed November 23, 2016].
- Perry, A.C.F., Jonest, R. and Hall, L. 1993. Isolation And Characterization Of A Rat Cdna Clone Encoding A Secreted Superoxide Dismutase Reveals The Epididymis To Be A Major Site Of Its Expression.
- Rato, L., Alves, M.G., Cavaco, J.E. and Oliveira, P.F. 2014. High-Energy Diets: A Threat For Male Fertility? *Obes Rev* 15: 996–1007.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C. 1993. AIN-93 Purified Diets For Laboratory Rodents: Final Report Of The American Institute Of Nutrition Ad Hoc Writing Committee On The Reformulation Of The AIN-76a Rodent Diet. *J Nutr* 123: 1939–1951.
- Rotgers, E., Nurmio, M., Pietilä, E., Cisneros-Montalvo, S. and Toppari, J. 2015. E2f1 Controls Germ Cell Apoptosis During The First Wave Of Spermatogenesis. *Andrology* 3: 1000–1014.
- Seo, C., Um, I.C., Rico, C.W. and Kang, M.Y. 2011. Antihyperlipidemic And Body Fat-Lowering Effects Of Silk Proteins With Different Fibroin / Sericin Compositions In Mice Fed With High Fat Diet. *Agric Food Chem*: 4192–4197.
- Sinha Hikim, A.P. and Swerdloff, R.S. 1999. Hormonal And Genetic Control Of Germ Cell Apoptosis In The Testis. *Rev Reprod* 4: 38–47. Available At: [Http://Ror.Reproduction-Online.Org/Cgi/Reprint/4/1/38.Pdf](http://Ror.Reproduction-Online.Org/Cgi/Reprint/4/1/38.Pdf).
- Takashiba, K.S., Segatelli, T.M., De Moraes, S.M.F. and Natali, M.R.M. 2011. Morfologia Testicular De Ratos Wistar Obesos Sedentários E Submetidos A Treinamento Fisico. *Acta Sci - Heal Sci* 33: 25–33.
- Takechi, T., Wada, R., Fukuda, T., Harada, K. and Takamura, H. 2014. Antioxidant Activities Of Two Sericin Proteins Extracted From Cocoon Of Silkworm (Bombyx Mori) Measured By Dpph, Chemiluminescence, Orac And Esr Methods. *Biomed Reports* 2: 364–369. Available At: [Http://Www.Pubmedcentral.Nih.Gov/ArticleRender.Fcgi?Artid=3990194&Tool=PmcEntrez&Rendertype=Abstract](http://Www.Pubmedcentral.Nih.Gov/ArticleRender.Fcgi?Artid=3990194&Tool=PmcEntrez&Rendertype=Abstract).
- Vernet, P., Aitken, R.J. and Drevet, J.R. 2004. Antioxidant Strategies In The Epididymis. 216: 31–39.
- Yan, L., Liu, J., Wu, S., Zhang, S., Ji, G., Gu, A., Physiology R., Yan, L., Liu, J., Wu, S., Zhang, S., Ji, G. and Gu, A. 2014. Seminal Superoxide Dismutase Activity And Its Relationship With Semen Quality And Sod Gene Polymorphism. *J Assist Reprod Genet* 31: 549–554.
- Zhang, Y.Q. 2002. Applications Of Natural Silk Protein Sericin In Biomaterials. *Biotechnol Adv*, 20: 91–100.

ANEXO I

Parecer do comitê de ética



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “Efeitos morfofisiológicos da suplementação com sericina em camundongos obesos”, sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 11/04/2014

Dirceu Baumgartner
Coordenador do CEUA
Portaria no 1130/2014-GRE

ANEXO II

Normas da revista científica

Author Guidelines

Review Process:

All research papers submitted to Online International Journal of Development Research are reviewed by reviewers, editor and members of the editorial board. Decisions on the manuscripts will be taken as rapidly as possible.

Manuscript submission: The work which is neither published before nor under consideration for publication anywhere else can be submitted for publication to this journal. The publication must be approved by co-workers and authorities wherever applicable. The publisher shall not be held legally responsible for any claims for compensation, if arise.

Online submission: Authors are required to submit their manuscripts online. They can upload their manuscript files as per instructions given on the website.

Permission: Authors wishing to reproduce any figure, table or text of another source are required to obtain permission from the copyright owner(s). Such permission evidence should be included while submitting the research article to this journal.

Types of manuscripts:

* **Full length research papers:** Full length research papers: These research papers should not contain more than 08-10 type written pages including figures, tables and references.

* **Short communications:** These communications should not contain more than 04-06 type written pages including figures, tables and references.

* **Case studies:** These case studies should not contain more than 06-08 type written pages including abstract, keywords, figures, tables and references.

Preparation of manuscript:

Manuscript submitted to **International Journal of Development Research** should be structured in the following manner.

Title page: It should include

- a) Concise and informative title (Size 14 in Times New Roman, Words- No exceeding 40).
- b) Name(s) of the author(s) represented by superscripts with affiliation and addresses of all author(s).

e.g. Indu A. George^a, Bindu S. Maurya^a and Ramjan M. Mulani^b

^aDepartment of Life Science, University of Mumbai, Santacruz (E), Mumbai 400098.

^bDepartment of Botany, Seth LU and MV College, Andheri (E), Mumbai 416 810.

The email address, telephone and fax numbers of the corresponding author should be given.

Abstract: The abstract should not contain more than 200 words for a full length paper and 100 words for a short communication. Also, the abstract should not contain any undefined abbreviations. The text should be in Times New Roman type with 12 font.

Keywords: Please provide 4-5 keywords which can be used for indexing purpose.

Text: For full length papers, text should be divided into following sections Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References (Use normal plain font of 10-point Times New Roman for text). Automatic page numbering should be used.

For short communication, there should not be any heading except Abstract, Keywords, Acknowledgements and References.

Acknowledgements: Acknowledgements of people for any technical assistance and funding agencies for financial support should be in separate section before references. The names of funding agencies should be given in full.

References: Only works actually cited in the text should be included in the references. Reference list should be alphabetized in the last names of the first author of each research paper.

Journal article: Kumar, R., Sharma, K., and Agarwal, V. (2005) In vitro clonal propagation of *Holarrhena antidysentrica* (L) Wall. through nodal explants from mature trees. *In vitro Cell Dev Biol -Plant*. 41, pp.137-144

Book: Naik, V.N. (1998) *Flora of Marathwada*, Vol.I, Amrut Publication, Aurangabad, India.

Dissertation/thesis: Zore, G. B. (2005) Pharmacological studies of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn.; a substitute for commercial liquorice. Ph. D. Thesis in Biotechnology. Faculty of Science, Swami Ramanand Teerth Marathwada University, Nanded (MS) India.

Journal article on internet: Dwiwedi, R. S. (2004) Un-nurtured and untapped super sweet non-sacchariferous plant species in India. Available online at http://www.ias.ac.in/currsci/jun10/articles_19.htm

Conference proceedings: Zore, G.B., Kulkarni, S.S, Surwase, B., S., Meshram, Nisha and S. Mohan Karuppayil (2006) Quality control of commercial liquorice samples by chemical fingerprinting. Proceedings of National Conference on Bioactive compounds; New frontiers and therapeutic usage (BCNFTO), held at School of Life Sciences, SRTM University, Nanded. Feb 12-14; pp 213-224.

Book Chapter:

Webpage:

Figures and tables:

Tables: Tables numbered using Arabic numerals should be given on separate page at the end of manuscript.

Figures :

- Each figure should be given in separate file..
- All figures should be cited in the text in consecutive numerical order.
- Figure parts must be denoted by lowercase letters (a, b, c.... etc)
- Each figure should have concise and informative caption.
- The captions for the figures should be placed at the end of the text in the manuscript file.

Copyright transfer: After acceptance of the research article, it is necessary for authors to transfer copyright to the publisher.

ANEXO III

Certificado de publicação

