



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

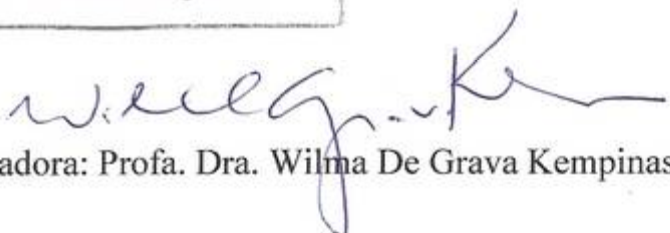
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CARLA DAL BIANCO FERNANDEZ

**“FUNÇÃO REPRODUTIVA EM RATOS MACHOS OBESOS
POR CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Carla Dal Bianco
Fernandez
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Biologia Celular.


Orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F391f	<p>Fernandez, Carla Dal Bianco Função reprodutiva em ratos machos obesos por consumo de dieta hipercalórica / Carla Dal Bianco Fernandez. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Wilma De Grava Kempinas. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Obesidade. 2. Leptina. 3. Fertilidade masculina. 4. Parâmetros espermáticos. 5. Espermatozoides - Motilidade. 6. Rato. I. Kempinas, Wilma De Grava. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/fib)</p>
-------	---

Título em inglês: Reproductive function in obese male rats by consumption of hypercaloric diet.
Palavras-chave em inglês: Obesity; Leptin; Male fertility; Sperm parameters; Sperm - Motility; Rats.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Wilma De Grava Kempinas, Estela Sasso Cerri, Arielle Cristina Arena, Rejane Maira Goes, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.

Data da defesa: 25/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 25 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Teresa Lucia Colussi Lamano

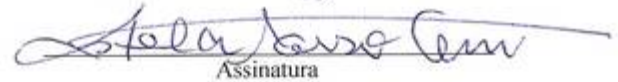
Assinatura

Profa. Dra. Rejane Maira Góes



Assinatura

Profa. Dra. Estela Sasso Cerri



Assinatura

Profa. Dra. Arielle Cristina Arena



Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira



Assinatura

Prof. Dr. Luis Alberto Domingo Francia Farje

Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Assinatura

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus.
Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem
compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente
que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”*

(Galileu Galilei)

À minha mãe, Franca, por ter me trazido à vida, pelo amor incondicional, dedicação,
compreensão e apoio. Amo você!

Ao Djalma, que sempre torceu e torce pelo meu sucesso, me dando apoio, amor e carinho.
Obrigada!

Ao meu pai, Edson (in memoriam), que onde quer que esteja sei que está, e sempre esteve ao
meu lado!

Ao André, meu grande amor e amigo, pelo apoio, dedicação, carinho, respeito, paciência,
companheirismo, e acima de tudo, por seu amor! Amo você!

Agradecimentos

A Deus, por todos os dias da minha vida. Por ter me dado saúde, uma família e amigos maravilhosos, e também por me dar forças para alcançar o fim dessa jornada. E a Yemanjá pela força e proteção!

À minha orientadora Wilma De Grava Kempinas, pela orientação deste trabalho e de todo o meu caminho pela vida científica, desde a minha iniciação. Obrigada pela confiança, carinho, amizade e todo o apoio dado nestes dez anos de trabalho. Muito obrigada por tudo que me ensinou!

"Excelente é o mestre que, ensinando faz nascer no espírito do discípulo um grande desejo de aprender".

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro me disponibilizando uma bolsa de estudos (processo 06/61815-8), fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à CAPES-PROEX pelo apoio financeiro.

À Liliam A.S. Panagio, secretária da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, por sempre estar pronta a ajudar no que for preciso, e pela sua amizade.

Ao Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu, por ter possibilitado a realização deste trabalho. E aos funcionários deste departamento, pela colaboração

À secretária do Departamento de Morfologia, Luciana, por toda sua colaboração e amizade.

Ao técnico do Laboratório de Embriologia, José Eduardo, por sempre estar pronto a ajudar, pela paciência e por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna e ao Dr. André Ferreira Nascimento, do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelo auxílio no desenvolvimento do modelo experimental.

Ao técnico do laboratório de Experimentação Animal da Clínica Médica, José Carlos Georgete, pelo auxílio prestado na preparação de dieta. Ao Dijon por toda ajuda.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Alseldo Franci e ao Dr. Ruither de Oliveira Gomes Carolino do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, pela colaboração nas análises hormonais.

Aos animais de laboratório, pela infinita colaboração, ainda que inconsciente, para a realização deste trabalho.

"àqueles animais que com os olhos humildes me falaram de sua vontade de viver, àqueles animais, vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade, o meu respeito e minha eterna gratidão"

A James Welsh, pela revisão de inglês do primeiro artigo desta tese.

A todos meus professores, que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Aos docentes da disciplina de embriologia, pela oportunidade da experiência didática que me foi concedida.

À Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari, Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, por terem feito parte de minha banca de qualificação, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Aos membros titulares e suplentes da banca de defesa: Profa. Dra. Estela Sasso Cerri, Profa. Dra. Arielle Cristina Arena, Profa. Dra. Rejane Maira Goes, Professora Dra. Teresa Lúcia Colussi Lamano, Prof. Dr. Luis Alberto Domingo Francia Farje, Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e Profa. Dra. Maéli Dal Pai Silva, pela disponibilidade e atenção para participarem desta avaliação.

Aos amigos do REPROTOX de hoje e de ontem, afinal foram quatro anos: Ana Paula, Ana Silvia, Glaura, Juliana, Wellerson, Fabíola, Marina, Luís, Denise, Ana Luisa, Mardi, Fernanda, Daniela, Davi, Carlinha, Flavinha, Mydian, Thais, Nirso, Thaisinha, Raquel, Mirella, Alessandra, Heloise e Caroline, pela amizade, colaboração e principalmente pelos momentos maravilhosos que passamos juntos!

Reservo-me o direito de fazer um agradecimento especial à Aninha (Ana Paula), Ana Silvia, Fabíola, Glaura, Jú (Juliana) e Wellerson, pela grande amizade construída nesses anos!

~~'O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.'~~

~~(Fernando Pessoa)~~

À minha avó, Maria, por toda atenção e carinho. A toda minha família, tios, tias, primos e primas, que mesmo com a distância sempre fizeram parte da minha vida.

A José Avialdo B. Correa, por toda atenção, dedicação e carinho.

Mesmo que minha memória tenha me traído, e eu tenha esquecido de alguém, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma forma a transformaram, colaborando para minha formação pessoal ou profissional. A todos...

... o meu muitíssimo obrigada!!!

“Nenhum dever é mais importante do que a gratidão.”

Cícero

(Filósofo Romano)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	1
RESUMO	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino	6
1.2. Obesidade	8
1.2.1 Epidemiologia da obesidade no mundo	10
1.2.2 Epidemiologia da obesidade no Brasil	11
1.2.3 Obesidade e reprodução	13
1.3 Leptina	15
1.4 Modelos experimentais de obesidade	17
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA TEMÁTICA	20
3. OBJETIVOS	21
4. CAPÍTULOS	22
4.1. Artigo I	22
Title Page	23
Abstract	24
Background	25
Methods	26
Results	32
Discussion	33
Authors' contribution	38
Acknowledgements	38
References	38
Figure legends	45
Tables	46
Figure	54
4.2. Artigo II	55

Title page	56
Abstract	57
Introduction	58
Materials and Methods	59
Results	62
Discussion	63
Acknowledgements	65
References	65
Figure legends	67
Tables	68
Figures	71
5. CONCLUSÕES FINAIS	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	74
7. ANEXOS	81
7.1 Resultados adicionais	81
Declaração Comissão de bioética	86
Certificado Comissão de Ética na Experimentação Animal	87

LISTA DE ABREVIATURAS

DH ou HFD – Dieta hipercalórica rica em gordura

DP ou SD – Dieta padrão

DHT – diidrotestosterona

AR – receptor de andrógeno

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

FSH – Hormônio folículo estimulante

LH – Hormônio luteinizante

IMC – Índice de massa corpórea

OMS – Organização Mundial da Saúde

POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

SOP – Síndrome do ovário policístico

DIO – Obesidade induzida por dieta

VMH – Núcleo Hipotalâmico ventromedial

O sobrepeso e a obesidade estão aumentando rapidamente, tornando-se uma epidemia mundial. Estas duas condições podem ser definidas simplesmente como o acúmulo excessivo de gordura nos adipócitos, células do tecido adiposo responsáveis pela síntese e liberação de leptina, um hormônio protéico cuja principal ação é inibir o apetite e estimular o gasto energético, mas que também atua na regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. As concentrações séricas de leptina apresentam-se elevadas, proporcionalmente à quantidade de gordura, em muitos modelos animais de obesidade e na obesidade humana. Recentemente alguns estudos têm mostrado a relação entre obesidade e infertilidade masculina, mas até o momento os resultados são controversos. Da mesma forma, o papel da leptina no sistema reprodutor masculino não está muito esclarecido, principalmente quando este hormônio está em excesso, como na obesidade. Assim, os objetivos do presente estudo foram investigar os efeitos da obesidade induzida por consumo de dieta rica em gordura em parâmetros reprodutivos de ratos machos. Também foi investigado o papel da leptina na fertilidade e em alguns parâmetros espermáticos, em ratos machos adultos. Para isso, ratos machos da variedade Wistar foram alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura (DH) ou com dieta padrão (DP) durante 15, 30 ou 45 semanas, e foram avaliados quanto ao índice de obesidade, níveis séricos de leptina, peso dos órgãos reprodutores e contagens espermáticas. Em um segundo experimento, os animais receberam as diferentes dietas apenas por 15 semanas, tempo suficiente para provocar obesidade. Esses animais foram avaliados quanto às dosagens dos hormônios sexuais, comportamento sexual, motilidade e morfologia espermática, fertilidade após cruzamento natural e inseminação artificial *in utero*. Além disso, ratos machos adultos não-obesos foram tratados com leptina exógena, ou com salina, ip, por 42 dias e avaliados quanto ao peso dos órgãos reprodutores, contagens espermáticas, motilidade dos espermatozóides e fertilidade após inseminação artificial. Após 15, 30 ou 45 semanas, os animais alimentados com DH apresentaram um aumento significativo no índice de obesidade e nos níveis de leptina. O peso dos órgãos

reprodutores e as contagens espermáticas foram similares entre os dois grupos, em todos os períodos estudados. Nos animais que receberam DH por 15 semanas, o comportamento sexual e a fertilidade após acasalamento natural foram semelhantes aos do grupo controle. Da mesma forma, os níveis de testosterona não foram alterados, mas os de estradiol aumentaram nos animais que ingeriram DH. Além disso, a qualidade espermática foi reduzida nestes animais, como evidenciado pela baixa porcentagem de espermatozóides com movimento progressivo. A alteração da motilidade espermática foi seguida por uma redução quantitativa do potencial de fertilidade após inseminação artificial *in utero*. Os animais tratados com leptina não apresentaram diferenças nas contagens espermáticas nem na motilidade quando comparados aos animais controle. No entanto, o potencial de fertilidade reduziu cerca de 40% e a taxa de perdas pré-implantação foi duas vezes maior nos animais tratados com leptina. Juntos, esses resultados indicam que a obesidade diminuiu a qualidade espermática, prejudicando a fertilidade dos ratos machos, e que, provavelmente a leptina está relacionada a este prejuízo.

ABSTRACT

Overweight and obesity are rapidly becoming a worldwide epidemic that affects children and adults. These two statuses are often defined simply as a condition of abnormal or excessive fat accumulation in adipose tissue, whose cells are responsible for synthesis and release of leptin. This is a protein hormone whose main action is to decrease appetite and increase energy expenditure, but it also act as regulatory signal for gonadal axis, among other functions. Serum leptin concentration is augmented in several obesity animal models and in obese human, proportionately to the amount of fat. Some studies have shown a relationship between obesity and male infertility, but until now it remains controversial. In the same way, the role of leptin on male reproductive function is not clear, mainly when the hormone is in excess as occur in obesity. Thus, the aims of the present study were to investigate the effects of high-fat diet-induced obesity on male rats' reproductive parameters. Furthermore it was evaluated the possible role of the excess of leptin on fertility and some sperm parameters in adult male rats. To achieve these aims, male Wistar rats were fed a high-fat diet (HFD) or standard chow (SD) for 15, 30 or 45 and were evaluated by adiposity index, serum leptin levels, reproductive organ weights and sperm counts. In a second experiment rats received HFD or SD only for 15 weeks, long enough to cause obesity. Sexual hormones, sexual behavior, sperm morphology and motility, fertility after natural mating and after artificial *in utero* insemination were evaluated. Moreover, non-obese adult male rats were treated with exogenous leptin ip (30µg/kg/day) or vehicle for 42 days and were evaluated for sperm count in testis and epididymis, sperm motility and fertility after *in utero* artificial insemination. After 15, 30 or 45 weeks, HFD-fed animals presented significant increases in obesity index and serum leptin levels. Reproductive organ weights and sperm counts in the testis and epididymis were similar between the two groups at all timepoints studied. In HFD-fed animals only for 15 weeks, sexual behavior and fertility after natural mating were not altered by the diet regimen. In these animals, intergroup testosterone levels were also comparable, but estradiol levels

were increased in HFD rats. Furthermore, sperm quality was reduced in 15 weeks HFD-fed animals as evidenced by their decreased percentage of sperm with progressive movement. This altered motility parameter was followed by a quantitative reduction in fertility potential after artificial *in utero* insemination. Leptin treated animals did not show any differences in sperm counts either in the testis or epididymis. In the same way, the percentage of progressive, non-progressive and immotile sperm was similar between the two groups. However, the fertility potential showed a reduction of about 40% whereas the pre-implantation loss rate increased more than two fold in leptin treated animals. These results indicate that obesity lead to a decrease in sperm quality, impairing male fertility and probably the excess of leptin is related with this alteration of fertility.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino

Uma visão dos aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino é importante na avaliação de possíveis distúrbios nesse sistema.

O sistema reprodutor masculino do rato, assim como na maioria dos mamíferos, é composto por testículos (gônadas), epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias como próstata e vesícula seminal, e pênis. Esses órgãos são andrógeno-dependentes sofrendo assim ação dos hormônios testosterona e diidrotestosterona (DHT). A DHT é formada a partir da testosterona por ação da enzima 5 α -redutase sendo um andrógeno potencialmente mais ativo. Esses dois andrógenos se ligam ao mesmo tipo de receptor – o AR (Androgen Receptor), porém com diferentes afinidades de ligação (Robaire and Henderson, 2006).

Os testículos estão localizados dentro da bolsa escrotal, o que resulta numa menor temperatura no órgão em relação ao resto do corpo e proporciona seu estado funcional adequado. Cada testículo pode ser, funcional e anatomicamente, dividido em duas partes: tecido intersticial e túbulos seminíferos, responsáveis pela esteroidogênese e pela espermatogênese, respectivamente (Rodriguez and Favaretto, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos pelo tecido peritubular e epitélio seminífero com as células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides, em animais adultos). A espermatogênese é um processo elaborado pelo qual células-tronco espermatogoniais tornam-se células haplóides altamente diferenciadas, os espermatozóides (Clermont, 1972). O tecido intersticial fica entre os túbulos seminíferos e possui vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células intersticiais (células de Leydig), responsáveis pela produção de andrógenos, e fonte para uma variedade de outros esteróides (Russel et al., 1990). A função testicular é regulada por uma série de relações entre os hormônios do hipotálamo (GnRH), da hipófise (FSH e LH), dos hormônios testiculares (testosterona) com o compartimento germinativo (Sokol, 1997). Assim, qualquer fator que atue desordenando

a interação coordenada do eixo hipotalâmico – hipofisário – testicular pode refletir em alterações no sistema reprodutor masculino as quais podem levar a prejuízos nesse sistema, sobretudo na fertilidade do indivíduo (Sokol, 1997).

O epidídimo dos mamíferos é um órgão formado por um ducto único e enovelado que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (Cosentino and Cockett, 1986; Hermo and Robaire, 2002), sendo anatomicamente dividido em três regiões principais: cabeça (com o segmento inicial), corpo e cauda (Reid and Cleand, 1957; Glover, 1982; Cosentino and Cockett, 1986; Gatti et al., 2004; França et al., 2005), sendo que a cabeça possui uma região inicial conhecida como segmento inicial, para onde convergem os ductos eferentes (Glover, 1982). Estas porções são subdivididas histologicamente em zonas que são designadas de acordo com a altura do epitélio e a distribuição e quantidade dos tipos celulares (Reid and Cleand, 1957). Neste órgão, os espermatozóides vindos do testículo passam por um processo de maturação, tornando-se aptos para fertilizar um ovócito (Orgebin-Crist, 1969; Gatti et al., 2004; França et al., 2005).

A vesícula seminal consiste de um ducto único dilatado e enovelado, o qual é revestido por um epitélio pseudo-estratificado pregueado, constituído por células epiteliais secretoras e células basais. A camada muscular lisa que reveste o órgão é constituída por duas lâminas: uma interna, de fibras circulares, e outra, de fibras longitudinais. A luz é ocupada pelo produto de secreção, de aspecto hialino (Hayward et al., 1996a; 1996b).

A próstata é formada por um conjunto de glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática. O epitélio é colunar simples, formado por células secretoras, basais e neuroendócrinas. Ela é envolta por uma cápsula fibroelástica rica em músculo liso, que envia septos para o interior da glândula (Roy-Burman et al., 2004). A próstata produz um líquido alcalino que neutraliza o conteúdo vaginal ácido, proporcionando nutrientes e transporte para os espermatozóides. No homem, a próstata é um órgão compacto e internamente dividido em três zonas ou regiões distintas denominadas de zona central, zona periférica e zona de transição (McNeal, 1981). Em roedores, essa glândula não é compacta, sendo composta por um par de lobos ventrais, um par de lobos dorsolaterais e um par de lobos anteriores ou glândula de coagulação que estão associados às vesículas seminais (About et al., 2003). Em termos de homologia com as

zonas da próstata humana, os lobos anteriores são considerados homólogos à zona central, enquanto os lobos dorsolaterais são considerados homólogos à zona periférica humana. Entretanto, os lobos ventrais de roedores não apresentam qualquer homologia à próstata humana, apesar de ser o lobo prostático mais estudado em modelos experimentais (Roy-Burman et al., 2004). Na próstata, o hormônio dihidrotestosterona (DHT) é o andrógeno predominante (Soronen et al., 2004).

1.2 Obesidade

Durante grande parte da história da humanidade, ganhar peso e estocar gordura foram vistos como sinal de saúde e prosperidade. Atualmente, no entanto, o aumento do ganho de peso e da incidência da obesidade estão representando um problema crescente para a saúde em todo o mundo (WHO, 2000).

Os efeitos do excesso de peso na morbidade e mortalidade são conhecidos há mais de 2000 anos. Hipócrates reconheceu que a ‘morte súbita é mais comum naqueles que são naturalmente gordos do que em magros’ (Bray, 2004). Apesar das evidências clínicas dos efeitos da obesidade serem conhecidas desde tempos remotos, pouco progresso científico foi feito na busca do entendimento desse distúrbio metabólico até o século XX. Já na primeira metade daquele século houve um considerável avanço na abordagem do tratamento da obesidade, com a inclusão no mercado de drogas com perfis farmacológicos cada vez melhores (WHO, 2000). Ainda assim, a ocorrência da obesidade está aumentando nitidamente em todos os continentes do mundo, representando um desafio à comunidade científica e uma grande preocupação de saúde pública (WHO, 2000; Morris et al., 2005).

A obesidade pode ser definida simplesmente como uma condição de acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo (WHO, 2000). Assim, sua etiologia ou causa principal é o desbalanço entre a energia ingerida na alimentação e a energia gasta. O excesso de energia é estocado nas células de gordura, os adipócitos, que aumentam de tamanho e/ou de número, e a hiperplasia e hipertrofia dessas células representam a lesão patológica da obesidade (Bray, 2004). O controle central da ingestão e gasto de energia deixa o peso corporal dentro de valores normais. Mesmo uma pequena alteração neste balanço homeostático, como, por exemplo, um leve aumento na ingestão diária de comida e /ou

uma redução no gasto de energia a longo prazo leva a um aumento do peso corporal (Vianna and Coppari, 2011).

A massa de gordura no corpo humano é de difícil mensuração, e a definição prática de obesidade é, portanto, segundo a organização mundial da saúde - OMS (WHO, 1995), baseada no índice de massa corpórea (IMC), que relaciona peso e altura [peso (kg)/altura²(m²)]. Segundo a OMS a obesidade é caracterizada quando o IMC é igual ou superior a 30kg/m²; a tabela 1 mostra a classificação de subnutrição, sobrepeso e obesidade de acordo com o índice de massa corpórea. O IMC possibilita a mensuração da obesidade de uma maneira mais fácil em nível populacional, podendo ser usado para estimar a prevalência da obesidade dentro de uma população. No entanto, esse índice não considera a variação na distribuição do tecido adiposo, e pode não corresponder ao mesmo grau de gordura em diferentes indivíduos e populações; por exemplo, essa medida é uma boa indicadora da variabilidade das reservas energéticas em indivíduos com estilo de vida sedentário, mas não em atletas (WHO, 2000).

Tabela 1. Classificação de adultos de acordo com o IMC¹

Classificação	IMC	Risco de comorbidades associadas à obesidade
Baixo peso	< 18,50	Baixo (risco aumentado de outros problemas clínicos)
Peso Normal	18,50 – 24,99	Médio
Excesso de peso:	≥ 25,00	
Pré-obesidade	25,00 – 29,99	Aumentado
Obesidade grau 1	30,00 – 34,99	Moderado
Obesidade grau 2	35,00 – 39,99	Severo
Obesidade grau 3	≥ 40,00	Muito Severo

¹Esses valores de IMC são independentes de idade e igual para ambos os sexos

Indivíduos obesos diferem não só na quantidade de gordura acumulada, mas também na distribuição regional dessa gordura no corpo. O tipo de distribuição da gordura afeta os riscos associados à obesidade e o tipo de doença à qual o indivíduo poderá estar sujeito. De fato, o acúmulo de gordura abdominal é um fator de risco maior para o desenvolvimento de doenças do que o excesso de gordura por si só. Assim, é importante saber distinguir entre a

obesidade androide, ou seja, em que a gordura é acumulada na região abdominal, da obesidade ginóide, menos severa, em que a gordura é distribuída mais uniforme e periféricamente. Tendo isto em vista, além do IMC, outros métodos de medida seriam úteis para a identificação de indivíduos com riscos elevados de doenças. A medida da circunferência da cintura e a razão entre esta e a circunferência do quadril são bons indicadores do acúmulo abdominal de gordura (WHO, 2000).

A obesidade não provem de um único desarranjo, mas de um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas que culminam na expressão do fenótipo de obesidade. A obesidade envolve complexas relações etiológicas entre os quadros genéticos, metabólicos e neurais, por um lado e de comportamento, hábitos alimentares, atividade física e fatores sócio-culturais, por outro (Nammi et al., 2004).

A obesidade é uma doença negligenciada por muitas vezes não ser, sequer, considerada como doença, mas sim como uma condição auto-infligida, que poderia ser facilmente evitada e curada pelo auto-controle e determinação (Björntorp, 1997). Apesar de já ter sido considerada como resultado da falta de força de vontade e da escolha de um estilo de vida errado, a obesidade hoje está sendo considerada pelo mundo moderno, como uma doença crônica que requer estratégias eficazes para sua contenção (Nammi et al., 2004). Esta doença é uma condição médica séria e crônica, associada a uma variedade de condições debilitantes de risco, como doenças cardiovasculares, hipertensão, doenças respiratórias, distúrbios metabólicos como a ocorrência de Diabetes Mellitus tipo 2, distúrbios gastrointestinais e certos tipos de cânceres (Nammi et al., 2004).

1.2.1 Epidemiologia da obesidade no mundo

A obesidade é uma doença crônica, existente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e que afeta crianças e adultos. De fato, a obesidade hoje é tão comum que está substituindo as preocupações mais tradicionais da saúde pública, como desnutrição e doenças infecciosas, tornando-se um dos contribuintes mais significativos para os problemas de saúde. Além disso, como o problema parece estar aumentando rapidamente em crianças, as reais consequências para a saúde poderão se tornar aparentes apenas no futuro (WHO, 2000).

Nos países da África e da Ásia, a obesidade ainda é relativamente incomum, sendo mais predominante nas populações urbanas do que nas rurais. Já nas regiões economicamente avançadas, a incidência da obesidade pode ser comparada à dos países industrializados. Os dados sobre a ocorrência da obesidade no continente africano são limitados, pois tem sido documentados em apenas alguns países, devido à maior atenção dada ao problema da desnutrição neste continente. Ainda assim, estudos mostram uma tendência no aumento da obesidade na região, seguindo a mesma tendência das outras regiões do mundo (WHO, 2000).

Na Europa, a obesidade é relativamente comum, especialmente entre as mulheres e nos países do sul e do leste. Na maioria dos países europeus, a incidência de obesidade aumentou 10 – 40% na década de 90, sendo na Inglaterra o cenário mais drástico (WHO, 2000). Dados recentes da OMS mostram que do ano 2000 a 2009 a incidência da obesidade continuou elevada, por exemplo, 24% dos ingleses (homens e mulheres) são considerados obesos; na Alemanha, os indivíduos obesos representam 20,5% dos homens e 21,1% das mulheres. Na Itália, a incidência de obesidade é menor, sendo 7,4% dos homens e 8,9% das mulheres (WHO, 2010).

Os dados sobre obesidade no continente americano, indicam que sua incidência em homens e mulheres está aumentando nos países desenvolvidos, como Canadá e Estados Unidos, e também nos países em desenvolvimento, como o Brasil, por exemplo, que passa por uma rápida transição socio-econômica (WHO, 2000). Dados recentes da OMS indicam que no Canadá, 22,9% dos homens e 23,2% das mulheres são considerados obesos; nos Estados Unidos os indivíduos obesos representam 31,1% dos homens e 33,2% das mulheres (WHO, 2010). Na região da América Latina, o Brasil é o único país que possui dados sólidos sobre a incidência da obesidade, onde o problema do déficit alimentar está sendo substituído pela alimentação em excesso. Em alguns países da região da América Central, há evidências de que a obesidade seja um problema significativo para a região (WHO, 2000).

1.2.2 Epidemiologia da obesidade no Brasil

Atualmente, existe uma maior quantidade de alimentos disponíveis, enquanto a demanda energética da vida moderna tem caído drasticamente. No Brasil, o excesso de peso e a obesidade estão sendo encontrados com grande frequência, em crianças a partir de 5 anos de idade, em todos os grupos de renda e em todas as regiões. Segundo dados da ‘Pesquisa de Orçamentos Familiares’ do IBGE entre os anos de 2008 e 2009, o déficit de peso foi diagnosticado em 4,1% das crianças entre 5 e 9 anos, enquanto o excesso de peso foi visto em cerca de um terço dessas crianças. Essa prevalência no excesso de peso oscilou de 25 a 30% nas Regiões Norte e Nordeste (mais do que cinco vezes a prevalência do déficit de peso) e de 32 a 40% nas Regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (mais do que dez vezes a prevalência do déficit de peso) (IBGE, 2010).

Semelhante ao que ocorre com as crianças, nos adolescentes o excesso de peso foi diagnosticado em cerca de um quinto dos indivíduos desta faixa etária, excedendo em seis vezes a frequência do déficit de peso, e a obesidade representa cerca de 25% dos casos de sobrepeso. Assim como no caso das crianças, a incidência de obesidade na adolescência foi maior nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (IBGE, 2010).

Em adultos, o déficit de peso foi de 2,7% ficando distante do limite de 5% que caracteriza o quadro de desnutrição na população. Por outro lado, o excesso de peso mostrou-se presente em cerca de metade dos homens e mulheres e dentre estes, cerca de um quarto dos homens e um terço das mulheres apresentaram obesidade. A maior incidência de sobrepeso e obesidade ocorreu nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste entre os homens e na região Sul entre as mulheres (IBGE, 2010).

Dados comparativos dos 34 anos decorridos de 1974-1975 a 2008-2009 mostram que a prevalência de excesso de peso em adultos aumentou em quase três vezes no sexo masculino (de 18,5 para 50,1%) e quase duas vezes no sexo feminino (de 28,7 para 48,0%). No mesmo período, a prevalência de obesidade aumentou em mais de quatro vezes para homens (de 2,8 para 12,4%) e em mais de duas vezes para mulheres (de 8,0 para 16,9%). Essa mesma tendência de aumento do sobrepeso e obesidade foi observada em crianças e adolescentes. A tendência da evolução temporal do excesso de peso e da obesidade nas várias regiões repete, na maioria das vezes, a tendência observada para o Brasil, ou seja, aumentos modestos ou mesmo estabilidade de 1974-1975 a 1989 e aumentos explosivos

entre 1989 e 2008-2009. Particularmente nos últimos seis anos (comparando resultados da POF 2008-2009 com os da POF 2002-2003), a frequência de pessoas com excesso de peso aumentou em mais de um ponto percentual ao ano, o que indica que, em cerca de dez anos, o excesso de peso poderia alcançar dois terços da população adulta do Brasil, magnitude idêntica à encontrada na população dos Estados Unidos (IBGE, 2010).

Como o excesso de peso e a obesidade expressam o desequilíbrio entre ingestão e utilização de calorias pelo organismo humano, a explicação para o aumento da frequência dessas condições deve ser procurada em mudanças nos padrões de alimentação e de atividade física da população.

1.2.3 Obesidade e reprodução

A obesidade é uma epidemia que está aumentando em muitos países e uma capacidade reduzida de se reproduzir é um perigo potencial, mas pouco conhecido, relacionado à obesidade (Ramlau-Hansen et al., 2007). Evidências mostram que o excesso de peso parece ser uma das principais e mais negligenciadas causas de infertilidade (Kort et al., 2006). A obesidade, particularmente a de fenótipo andróide, é associada a vários distrúbios reprodutivos, incluindo a infertilidade (Pasquali et al., 2003).

Apesar dos efeitos negativos da obesidade na função reprodutiva terem sido primeiramente documentados há mais de 2000 anos por Hipócrates (Bray, 1990), a etiologia dos efeitos desfavoráveis dessa relação não foi estudada a fundo por muito tempo (Shaw et al., 1997). Evidências mostram uma ligação entre o estado energético e a função reprodutiva (Spicer, 2001), sendo o controle integrado desse sistema, provavelmente, um fenômeno multifacetado conduzido por uma gama de sinais que atuam em diferentes níveis do eixo neuroendócrino (Nogueiras et al., 2004).

A obesidade está associada a múltiplas alterações do sistema endócrino, incluindo concentrações anormais de hormônio no sangue devido a alterações no seus padrões de secreção e/ou metabolismo, alterações no transporte hormonal e/ou na sua ação em nível dos tecidos alvos. Alterações nos hormônios sexuais estão envolvidas com problemas de fertilidade em ambos os sexos (Pasquali, 2006).

A fertilidade feminina é primorosamente sensível ao peso corporal, sendo que um limite crítico de gordura é necessário para que as meninas entrem na puberdade, o que é uma garantia natural para que elas possam levar uma gestação a termo; no entanto, uma quantidade excessiva de gordura corporal tem um efeito prejudicial na fertilidade feminina (Robker, 2008). Em mulheres, o aparecimento precoce da obesidade favorece o desenvolvimento de irregularidades menstruais, oligo-anovulação crônica e infertilidade na idade adulta. A obesidade em mulheres também pode aumentar o risco de abortos e prejudicar os resultados de técnicas de reprodução assistida (Pasquali et al., 2007; Loret de Mola, 2009).

Apesar da maioria das mulheres obesas não desenvolverem hiperandrogenismo, muitas daquelas que apresentam infertilidade e sinais de excesso de andrógeno são afetadas pela síndrome do ovário policístico (SOP). Recentemente, tem sido hipotetizado que a alta prevalência de ovário policístico pode estar relacionada à crescente epidemia mundial de obesidade. Isso é parcialmente confirmado pelo fato de mais de 50% das mulheres com SOP serem obesas e a maioria apresentar o fenótipo de distribuição de gordura abdominal, que por si só é associado a uma condição de hiperandrogenismo (Pasquali, 2006).

Em estudos experimentais com modelos animais de obesidade induzida por dieta hipercalórica, ratas obesas tiveram um desempenho reprodutivo bem abaixo daquele observado em ratas controle, apresentando menor taxa de gestação e maior mortalidade neonatal (Shaw et al., 1997). Da mesma forma, oócitos coletados de camundongas obesas (por ingestão de dieta rica em gordura) apresentaram um desenvolvimento mais lento após fertilização *in vitro* (Robker, 2008).

O impacto da obesidade em homens é menos investigado do que em mulheres (Pasquali, 2006; Hammoud et al., 2008; Chavarro et al., 2010). Estudos mostram que o acúmulo de tecido adiposo em homens está associado a uma diminuição dos níveis séricos de testosterona total e livre (Giaugulli et al., 1994) e a um aumento dos níveis de estrógeno (Schneider et al., 1979), o que poderia levar a uma diminuição da contagem espermática nesses indivíduos (Hammoud et al., 2008).

Nos últimos anos, estudos têm relacionado o IMC com parâmetros reprodutivos em homens, mas os resultados ainda são contrastantes e pouco conclusivos. Alguns trabalhos

da literatura mostram que o IMC alto está relacionado à baixa qualidade espermática (Magnusdottir et al., 2005), à diminuição da contagem (Jensen et al., 2004) e da motilidade espermática (Kort et al., 2006) e ao aumento do índice de fragmentação do DNA dos espermatozoides (Kort et al., 2006). No entanto, outros estudos mostram pouca ou nenhuma relação entre obesidade e concentração (Aggerholm et al., 2008; Chavarro et al., 2010), morfologia ou motilidade espermática (Chavarro et al., 2010).

Em estudos experimentais, animais com obesidade induzida por dieta mostram uma redução na motilidade espermática (Ghanayem et al., 2010; Bakos et al., 2010) e na taxa de fertilização (Ghanayem et al., 2010; Bakos et al., 2010), bem como um aumento no dano de DNA dos espermatozoides (Bakos et al., 2010). Em contrapartida, Tortoriello e colaboradores (2004) não observaram nenhum dano à fertilidade de camundongos DBA/2J machos obesos por indução de dieta rica em gordura.

1.3 Leptina

A leptina é uma proteína de 167 aminoácidos transcrita à partir do gene *ob* e secretada pelos adipócitos (Auwerx and Staels, 1998; Messinis and Milingos, 1999; Tena-Sempere et al., 1999; Aizawa-Abe et al., 2000), e serve como ligação entre o tecido adiposo e o cérebro, levando informações sobre as reservas energéticas (Cunningham et al., 1999). A palavra leptina é derivada do grego ‘leptos’, que significa magro (Auwerx and Staels, 1998; Messinis and Milingos, 1999). Esse hormônio protéico atua principalmente estimulando o gasto energético e inibindo o apetite, por atuar em receptores hipotalâmicos (Bueno et al., 2005). A leptina também promove efeitos periféricos funcionando como regulador de muitos sistemas metabólicos e neuroendócrinos, incluindo o eixo reprodutivo (Spicer, 2001). Estudos mostram que a concentração plasmática de leptina apresenta-se significativamente elevada em muitos modelos de obesidade em roedores, e na obesidade humana, sendo proporcional à quantidade de gordura (Frederich et al., 1995; Maffei et al., 1995; Considine et al., 1996). Apesar do tecido adiposo ser a fonte primária da leptina, sua produção tem sido observada em vários outros órgão e tecidos, como estômago, músculo esquelético, cartilagem fetal, hipófise, tecido mamário e placenta (Zieba et al., 2005).

Camundongos ob/ob ou db/db são animais em que ocorre a falta da ação biológica da leptina, por deficiência na produção de leptina (mutação do gene ob) ou de seu receptor, o que leva esses animais à infertilidade (Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997; Sone and Osamura, 2001). A aplicação de leptina exógena nesses animais restabelece a fertilidade em machos e fêmeas (Barash et al., 1996; Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997; Cunningham et al., 1999), o que confirma a ligação entre leptina e reprodução. Estudos indicam que a leptina pode atuar tanto em nível hipotalâmico quanto hipofisário estimulando a liberação de GnRH e LH, respectivamente (Cunningham et al., 1999; Tena-Sempere and Barreiro, 2002; Zieba et al., 2005).

Concordando com o seu papel de levar informações sobre o estado nutricional para níveis centrais, a leptina está relacionada com o início da puberdade, principalmente em fêmeas (Cunningham et al., 1999). Em ratas, a restrição alimentar leva a um atraso no início da puberdade, que pode ser revertido pelo tratamento com leptina. Da mesma forma, a administração de leptina para fêmeas pré-puberes antecipou o aparecimento dos sinais clássico da puberdade (Messinis and Milingos, 1999). Em humanos, os níveis de leptina aumentam progressivamente durante o desenvolvimento puberal, havendo uma relação inversa entre a concentração sanguínea de leptina e a idade da menarca. Já nos meninos, essa relação entre leptina e puberdade não é tão clara, com as concentrações do hormônio aumentando até os 10 anos e decaindo subsequentemente. No entanto, a falta da leptina endógena está associada à falta de desenvolvimento puberal e ao hipogonadismo (Tena-Sempere and Barreiro, 2002).

Os mecanismos pelos quais a leptina regula as funções reprodutivas não é completamente caracterizado, mas os locais de ação podem incluir hipotálamo, hipófise e gônada (Tena-Sempere et al., 1999), sendo que no caso dos testículos, receptores de leptina foram identificados nas células germinativas, células de Leydig (Tena-Sempere et al., 2001; Bhat et al., 2006) e células de Sertoli (Tena-Sempere et al., 2001). Nos ovários, receptores de leptina foram encontrados nas células foliculares, da teca e intersticiais (Duggal et al., 2000). A falta de leptina leva a alterações reprodutivas conhecidas, ainda que não sejam completamente elucidados os mecanismos responsáveis por essas alterações. No entanto, as

implicações que o excesso de leptina pode causar para o sistema reprodutor não são conhecidas.

Em homens, a expressão de leptina em células germinativas no testículo mostrou-se inversamente correlacionada à concentração espermática, e pacientes com disfunções espermatogênicas ou varicocele apresentaram uma expressão aumentada da proteína (Ishikawa et al., 2007). A comparação de homens com espermograma normal e homens com algum tipo de alteração no espermograma, mostrou que os primeiros apresentaram uma menor concentração de leptina no plasma seminal; além disso, a concentração de leptina no sêmem foi negativamente correlacionada à porcentagem de espermatozoides móveis (Glander et al., 2002). Esses resultados indicam que a quantidade de leptina presente no trato genital pode ter uma possível ação negativa na qualidade espermática. O tratamento de ratos não-obesos com leptina exógena mostrou uma diminuição na contagem espermática e um aumento na quantidade de espermatozoides morfológicamente anormais (Haron et al., 2010). Assim como a falta da leptina é prejudicial para o sistema reprodutor o excesso também parece ser. No entanto, mais estudos são necessários para que se conheça os efeitos do excesso desse hormônio para a reprodução e também para que se descubra os mecanismos pelos quais a leptina age no trato reprodutor.

1.4 Modelos experimentais de obesidade

Na tentativa de provocar obesidade em animais e permitir o estudo desta doença de maneira mais completa, diversos modelos experimentais de obesidade têm sido desenvolvidos (Pereira et al., 2003). A similaridade e homologia entre os genomas dos roedores e dos humanos tornam esses modelos animais uma importante ferramenta para o estudo de condições que afetam os humanos e que podem ser simuladas em ratos (Von Diemen et al., 2006). A utilização desses modelos animais pode fornecer informações sobre o sistema de controle que regula o armazenamento de nutrientes nos seres humanos (Bray et al., 1989).

A obesidade pode ser induzida em animais com alterações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas. Os modelos mais utilizados para indução de obesidade em ratos são lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) através da administração de glutamato

monossódico ou lesão elétrica direta, ooforectomia, alimentação com dietas hipercalóricas e manipulação genética para obesidade (Von Diemen et al., 2006).

A administração de glutamato monossódico a ratos recém nascidos provoca a destruição dos núcleos hipotalâmicos ventromedial e arqueado, levando ao desenvolvimento de obesidade devido à falta de controle entre ingestão e gasto de energia (Von Diemen et al., 2006). Para indução de obesidade, o glutamato monossódico pode ser administrado por via subcutânea ou intraperitoneal em doses que variam de 2 a 4mg/g de peso corporal, durante o período neonatal (Von Diemen et al., 2006).

A lesão elétrica direta ao VMH também pode ser utilizada para induzir obesidade em ratos, pela destruição bilateral do núcleo hipotalâmico. A lesão elétrica causa obesidade por hiperfagia, ocorrendo uma aparente perda do mecanismo de feedback entre insulina e leptina (Von Diemen et al., 2006).

O modelo de indução de obesidade através da ooforectomia é resultado da observação de mulheres, que após a menopausa apresentam alterações metabólicas, incluindo o ganho de peso. Esse modelo é usado com o intuito de se alcançar um melhor entendimento das alterações que ocorrem nas mulheres após o fim da idade fértil. A remoção das gônadas em ratas causa uma queda nos níveis de leptina, correlacionada a um período de hiperfagia e ganho de peso (Von Diemen et al., 2006).

Os modelos genéticos para o estudo da obesidade começaram a ser mais utilizados a partir da década de noventa, por causa da clonagem e identificação de produtos de cinco genes diferentes relacionados à obesidade (Von Diemen et al., 2006). Os primeiros cinco modelos monogênicos de obesidade foram *ob/ob*, *db/db*, Tubby (*tub*), “Agouti” yellow (*A^y*) e *fa/fa* (Von Diemen et al., 2006). Camundongos homozigotos para os genes *ob* e *db* (*ob/ob* e *db/db*) apresentam mutações nos genes da leptina e do receptor de leptina, respectivamente (Tortoriello et al., 2004). Esses animais apresentam hiperfagia, obesidade mórbida, resistência a insulina e infertilidade (Messinis and Milingos, 1999; Tortoriello et al., 2004).

Embora modelos de obesidade genética sejam úteis na descoberta do papel de neuropeptídeos endógenos na regulação da alimentação, intervenções na dieta fornecem um modelo de obesidade mais fisiológico (Tan et al., 2005), e próximo do comportamento

alimentar humano na atualidade. Existem vários tipos de dietas para induzir obesidade, algumas delas atingem maior valor calórico pela adição de carboidratos enquanto outras, pela adição de gordura (Von Diemen et al., 2006).

Dietas hipercalóricas podem ser produzidas pela adição de alimentos calóricos de consumo humano (como bolachas, chocolate, leite condensado, óleo vegetal etc) a uma ração padrão para roedores (Esteve et al., 1994; Von Diemen et al., 2006), estas dietas são conhecidas como dietas de cafeteria. As dietas hipercalóricas hiperlipídicas são aquelas que possuem maior porcentagem de gordura do que as dietas padrões. Na literatura são encontrados vários exemplos de dietas hiperlipídicas que possuem diferentes porcentagens de gordura em sua composição: 20% de gordura na dieta hipercalórica contra 4% na dieta padrão (Fernandez et al., 2011); 35% vs 12% (Tan et al., 2005); 60% VS 10% (Ghanayem et al., 2010); 22% vs 6% (Bakos et al., 2010); 25% vs 5% (Olivares et al., 2010). Estudos em animais mostram que a alimentação hiperlipídica é um componente importante na etiologia da obesidade, já que a exposição a dietas hiperlipídicas comprovadamente levou ao excesso de gordura corporal em macacos, cães, suínos, esquilos, hamsters e ratos (West and York, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

Diante da grande incidência de sobrepeso e obesidade na sociedade moderna, entre crianças, adolescentes e adultos, e das evidências da literatura que mostram que o excesso de peso pode ser uma das causas mais negligenciadas da infertilidade, entre homens e mulheres, faz-se necessário a realização de estudos que visem um melhor entendimento dos problemas causados ao sistema reprodutor pelo excesso de gordura corporal. Dados da literatura são controversos quando relacionam IMC a parâmetros reprodutivos em homens. Alguns trabalhos mostram que o IMC elevado está relacionado à baixa qualidade espermática, à diminuição da contagem e da motilidade dos espermatozoides, e ao aumento do índice de fragmentação do DNA dos gametas, enquanto outros não estabelecem essa ligação entre obesidade e parâmetros espermáticos. Estudos experimentais também se mostram contraditórios no estabelecimento da relação entre excesso de gordura e fertilidade. Desta forma, justifica-se a realização do presente trabalho, que visa buscar um melhor entendimento dos problemas causados ao sistema reprodutor masculino pelo excesso de gordura corporal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da obesidade induzida por consumo de dieta hipercalórica na função reprodutiva de ratos machos. Além disso, objetivou-se estudar o papel da leptina exógena na fertilidade e em alguns parâmetros espermáticos, em ratos machos adultos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Induzir obesidade em ratos machos através da ingestão de dieta hipercalórica rica em gordura, enquanto animais controle receberam dieta padrão
 - Dosar a concentração de leptina e dos hormônios testosterona, FSH e LH no soro
 - Avaliar concentração, morfologia e motilidade espermática
 - Avaliar o comportamento sexual
 - Avaliar a fertilidade após cruzamentos naturais e após inseminação artificial *in utero*
- ✓ Tratar um grupo de animais não obesos com leptina exógena, ou apenas com o veículo
 - Avaliar concentração e motilidade espermática
 - Avaliar fertilidade após inseminação artificial *in utero*

4. CAPÍTULOS

O presente estudo deu origem a dois artigos que serão apresentados a seguir.

4.1 Artigo I

O primeiro artigo, intitulado: “*Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility*”, foi aceito para publicação no periódico “*Reproductive Biology and Endocrinology*”.

Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility

Carla DB Fernandez^{1,2}§, Fernanda F Bellentani², Glaura SA Fernandes^{1,2}, Juliana E Perobelli^{1,2}, Ana Paula A Favareto^{1,2}, André F Nascimento³, Antonio C Cicogna³, Wilma DG Kempinas²

¹Graduate Program in Cell and Structural Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

³Medical Clinic Department, Botucatu Medical School, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

§Corresponding author

Email addresses:

CDBF: carladbf@yahoo.com.br
FFB: fernandabelle@yahoo.com.br
GSAF: glaura_sf@yahoo.com.br
JEP: jperobelli@gmail.com
APAF: anafavareto@yahoo.com.br
AFN: nascimentoaf@yahoo.com.br
ACC: cicogna@fmb.unesp.br
WDGK: kempinas@ibb.unesp.br

Abstract

Background

Obesity is rapidly becoming a worldwide epidemic that affects children and adults. Some studies have shown a relationship between obesity and infertility, but until now it remains controversial. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of high-fat diet-induced obesity on male reproductive parameters.

Methods

In a first experiment, male Wistar rats were fed a high-fat diet (HFD) or standard chow (SD) for 15, 30 or 45 weeks, after which they were evaluated by adiposity index, serum leptin levels, reproductive organ weights and sperm counts. In a second experiment, rats received HFD or SD only for 15 weeks, long enough to cause obesity. Sexual hormones and sexual behavior were evaluated in these animals, as well as fertility after natural mating. Another group of rats was submitted to motility analysis and fertility evaluation after in utero insemination.

Results

The high-fat diet used in the present study was effective in promoting obesity, as demonstrated by an increased adiposity index in association with a higher body weight. After 15, 30 or 45 weeks, HFD-fed animals presented significant increases in obesity index and serum leptin levels. Reproductive organ weights and sperm counts in the testis and epididymis were similar between the two groups at all timepoints studied. Sexual behavior was not altered by the diet regimen, and HFD fertility after natural mating was also similar to SD-fed animals. Intergroup testosterone levels were also comparable, but estradiol levels were increased in HFD rats. Furthermore, sperm quality was reduced in HFD animals as evidenced by their decreased percentage of sperm with progressive movement. This altered motility parameter was followed by a trend toward reduction in fertility potential after artificial in utero insemination.

Conclusions

The results reported herein showed that obesity can affect sperm quality, by reducing sperm motility, without affecting other sperm parameters. The low sperm quality caused a slight reduction in fertility potential, showing that obesity may lead to impairment in male fertility.

Background

Overweight and obesity constitute a health problem of increasing prevalence and present a major public health concern [1,2] that affects men and women, young and old [3]. These two statuses are often defined simply as a condition of abnormal or excessive fat accumulation in adipose tissue [4] arising from an imbalance between calories ingested versus calories expended [5]. The change in the average weight of the population is occurring quickly, and within a few generations the bell-curve of human-weight distribution has shifted toward greater weight [3].

Obesity is a risk factor for non-insulin-dependent diabetes, cardiovascular disease, osteoarthritis, some types of cancer, and certain reproductive and metabolic disorders [6]. It is also associated with disturbance in the hormonal milieu that can affect the reproductive system, which is clear in women who present reproductive disorders when obese [7,8]. However, in men this relationship is poorly characterized, due to the lower number of studies in the literature [2,9]. In recent years, some studies have associated the body mass index (BMI) with reproductive parameters in men, showing that increased BMI is related to poor semen quality [10], decreased sperm concentration [11], decreased normal-motile sperm cells and increased DNA fragmentation index [12]. On the other hand, some works showed little or no relation between obesity and sperm concentration [2,13], motility or morphology [2] in men, even when serum reproductive hormone levels are altered [2,13].

A small number of energy-balance genes are known to be essential for normal body regulation and a loss-of-function mutation in a single gene can lead to obesity in laboratory animals [14]. However, it does not explain obesity in the majority of the human population where no such genetic changes have been identified. If obesity were entirely genetic in

causation, it would be difficult to explain the increased in prevalence of obesity over the last few decades. Contemporary diets are a major factor in the current obesogenic environment, and most human obesity could probably be assessed as being diet-induced [14]. Although genetic obesity models are useful for finding the role of endogenous neuropeptides in body weight control, the best parallels to human obesity are provided by the physiological model of diet-induced obesity (DIO) [14, 15].

In diet-induced obese male mice decreases in sperm motility [16,17], fertilization rate [17] number of plugs and pregnancy rate [16], as well as increases in sperm DNA damage and sperm intracellular reactive oxygen species (ROS) have been reported [17]. However, Tortoriello and colleagues [18] found no impairment in the fertility of male DBA/2J mice after they were fed a high-fat diet. In studies of rats made obese by cafeteria feeding, a diminished number of ejaculations was observed [19]. Thus, in the literature, few studies report the effects of obesity on male fertility and sperm quality and the results are altogether less clear. Therefore the aim of this study was to determine the effect of high-fat diet-induced obesity on reproductive parameters in male rats.

Methods

Animals

Male (n = 116, aged 5-6 weeks) and female (n = 76, aged 11-12 weeks) Wistar rats were supplied by São Paulo State University Animal Center - UNESP - Botucatu/SP. During the experiment, animals were allocated individually into polypropylene cages, with laboratory grade pine shavings as bedding. Rats were maintained under controlled temperature ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) and lighting conditions (12L, 12D photoperiod, lights switched off at 07:00am). Rat chow and filtered tap water were provided ad libitum. Experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Biosciences Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Research (protocol number 06/07).

Experimental design

Male rats were randomly assigned to one of two different groups: the first was fed a high-fat diet, with a content of 20% fat (RC Focus 2413 Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brazil) and the second received a standard diet with 4% fat content (RC Focus 1765 Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brazil). The dietary regimen was adapted from previous studies [20, 21]. The nutritional composition of diets is presented in Table 1.

The study was divided into two steps. In the first (experiment 1), rats were given the high-fat diet (HFD) or standard diet (SD) for 15, 30 or 45 weeks. In the second step (experiment 2) the animals were exposed to HFD or SD for a period of 15 weeks, long enough to increase adiposity index, which characterizes obesity.

Experiment 1:

Collection of tissue and organs

In this part of the study rats were given a high-fat diet (HFD) or standard diet (SD) for 15, 30 or 45 weeks. Rats were weighed every week, and food consumption was monitored daily. After each period of diet exposure, rats (n = 9-13/group/ food exposure time) were slightly anesthetized with sodium pentobarbital ip (40/mg/kg), weighed and killed by decapitation. Blood was collected from the ruptured cervical vessels for determination of leptin levels, which was measured by ELISA, using the kit LINCO RESEARCH INC, Missouri, USA. Adipose tissue was isolated and weighed from the epididymal, visceral and retroperitoneal pad. The right testis, epididymis, vas deferens, ventral prostate and seminal vesicle (without the coagulating gland) were removed and their weights (absolute and relative to body weights) were determined. Testis and epididymis were used for sperm counts.

Adiposity index

Adiposity index was determined by the sum of epididymal, visceral and retroperitoneal fat weights divided by body weight x 100, and expressed as adiposity percentage [22].

Daily sperm production per testis, sperm number and transit time in the epididymis

Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 19 of spermiogenesis) in the testis were counted as described previously by Robb et al. [23], with adaptations adopted by Fernandes et al. [24]. Briefly, the testis, decapsulated and weighed soon after collection, was homogenized in 5 mL of NaCl 0.9% containing Triton X 100 0.5%, followed by sonication for 30 seconds. After a 10-fold dilution, one sample was transferred to Neubauer chambers (4 fields per animal), and late spermatids were counted. To calculate the daily sperm production (DSP), the number of homogenization-resistant spermatids was divided by 6.1, the number of days these spermatids are present in the seminiferous epithelium. In the same manner, caput/corpus and cauda epididymidis portions were cut into small fragments with scissors and homogenized, and sperm counted as described for the testis. The sperm transit time through the epididymis was determined by dividing the number of sperm in each portion by the DSP.

Experiment 2:

In this part of the study, animals were exposed to the high-fat or standard diet for 15 weeks, a period sufficient to characterize obesity. Rats were weighed every week, and food consumption was monitored daily. After the period of diet exposure, a group of rats (12-13/group) was assessed for sexual behavior and fertility outcomes after natural mating. Then, 15 days after the end of the sexual behavior test, rats were slightly anesthetized with sodium pentobarbital ip (40mg/Kg), weighed and killed by decapitation. Blood was collected from the ruptured cervical vessels for determination of sexual hormone levels (testosterone, follicle stimulating hormone – FSH, luteinizing hormone – LH, estradiol). Three fat deposits - epididymal, visceral and retroperitoneal - were removed and weighed, as already described. Semen was collected from the right and left deferens ducts to evaluate sperm motility and sperm morphology, respectively. The right testes were collected for *in vitro* testosterone assay. Another group of rats (11/group), exposed to the different diets as previously described, had fertility tested by *in utero* artificial insemination.

Serum testosterone, FSH, LH and estradiol levels

The serum was obtained by centrifugation (2400 rpm, for 20 minutes at 4°C) and the concentrations of testosterone, estradiol, luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were determined by the technique of double antibody radioimmunoassay. Testosterone doses were accomplished by using the TESTOSTERONE MAIA® kit (Biochem Immuno System). The LH and FSH doses used specific kits supplied by the National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases (NIADDK, USA). All samples were dosed in the same assay to avoid inter-assay errors. The intra-assay error was 3.4% for LH, 2.8% for FSH and 4% for testosterone.

Evaluation of sexual behavior and natural mating

At the end of the 15-week diet exposure, male rats from each experimental group were placed individually in polycarbonate crystal boxes, measuring 44×31×16 cm, 5 min before introduction of one adult female rat in natural estrus (sexually receptive) determined by vaginal smear. The animals were observed in the dark period of the cycle in a separate room under dim red light, and all sexual behavior tests were performed 2–4 h after the beginning of the dark period. For the next 40 min the following parameters were evaluated: latency to the first mount, intromission and ejaculation; number of intromissions until the first ejaculation; latency of the first post ejaculatory intromission; number of post ejaculatory intromissions; and number of ejaculations [25,26]. The males that did not mount in the initial 10 min were considered sexually inactive.

After the sexual behavior test the couples were kept together for an additional 4 hours. The animals that had been deemed inactive were tested one more time, for fertility, with different females in estrus. At the end of the afternoon males and females were separated and vaginal smears were collected. The day on which sperm were found in the smear was determined to be gestational day 0 (GD0); females were killed 20 days later to evaluate fertility.

Sperm motility and morphology

Immediately after euthanasia, the right vas deferens was collected. Sperm were obtained with the aid of a syringe and needle, through internal rinsing with 1.0mL of

modified HTF medium (Human Tubal Fluid, IrvineScientific) at 34°C. A Makler counting chamber (Sefi-Medical, Haifa, Israel) warmed to 34°C was loaded with a small aliquot of sperm solution. Sperm motility evaluation was performed by the same person throughout the study and was assessed by visual estimation (100 spermatozoa per animal, in duplicate) under a phase-contrast microscope (Leica DMLS) at 200X magnification. Spermatozoa were classified as: immotile, motile without progression and motile with progressive movement. Sperm were also removed from the left vas deferens by internal rinsing with 1.0mL of saline formol, with the aid of a syringe and needle. To analyze sperm morphology, smears were prepared on histological slides that were left to dry for 90 min and observed in a phase-contrast microscope (400× magnification) [27], and 200 spermatozoa were analyzed per animal. Morphological abnormalities were classified into two general categories pertaining to head morphology (without curvature, without characteristic curvature, pin head or isolated form, i.e., no tail attached) and tail morphology (broken, isolated, i.e., no head attached or rolled into a spiral) [28].

Intratesticular testosterone concentration

The right testis of each animal was removed and decapsulated, and the parenchyma was sliced into ~50-mg pieces. Each piece was weighed and placed into a 1.5-ml micro tube containing 1.0 ml of Medium 199 (M199). The M199 was buffered with 0.71 g/L sodium bicarbonate (NaHCO₃) and 2.1 g/L Hepes, and contained 0.1% BSA (bovine serum albumine) and 25 mg/L soybean trypsin inhibitor, pH 7.4. Testosterone concentration was assessed by incubating parenchyma in duplicate, for 2 h at 34°C [29]. After centrifugation (5 min, 10.000 × g), medium was frozen at -70°C until testosterone assay, which was performed as described previously.

***In utero* artificial insemination**

Because rats produce and ejaculate an excess of qualitatively normal sperm, artificial *in utero* insemination of a fixed critical number of sperm has been suggested as a means of increasing the sensitivity of a toxicant-induced decrease in sperm quality in the rat [30]. According to this technique, a fixed number of sperm collected from the cauda epididymis

is inseminated directly into the uterus allowing evaluation of sperm quality, without the interference of other factors such as alterations of the sexual behavior pattern and number of sperm available for ejaculation [31].

A cohort of females (n = 40) was synchronized with a single subcutaneous injection of 80µg of luteinizing releasing hormone (LHRH) agonist (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri), 115 hours prior to the insemination. Shortly after the room lights were turned off on the day of proestrus, the synchronized females were paired with sexually experienced, vasectomized males of proven sterility for 1h. Receptive females (that exhibited lordosis) were selected for insemination. The isolation and preparation of proximal cauda sperm for insemination were the same as described previously [32,33], with the following adaptations. Briefly, the sperm were released from the proximal cauda by nicking the tubule with a n° 11 scalpel and allowed to disperse in 2 ml of modified HTF medium (Human Tubular Fluid, IrvineScientific®). After 5min of dispersion, a sperm aliquot was diluted 1:10 with fixative (10% formalin in PBS) and counted using a Neubauer chamber. Within 15min, each uterine horn was injected with a volume containing 5×10^6 sperm [32]. One female was inseminated per male. All inseminations were performed while the recipient female was in a surgical plane using a mix of ketamine and xylazine anesthesia. The bifurcation of the uterine horns was exposed through a low, midventral incision. Fine curved forceps were used to elevate each horn while the insemination volume was injected through the wall of each horn via an 18-gauge i.v. catheter attached to a 1.0-ml syringe. Each injection site was cauterized immediately upon withdrawal of the needle. When insemination was completed, the abdominal musculature was sutured. Females were killed 20 days later to evaluate fertility.

Fertility evaluation

On the GD20 the females that had been naturally and artificial inseminated were killed by decapitation. After collection of the uterus and ovaries the numbers of corpora lutea, implants, reabsorptions and live and dead fetuses were determined. From these results the following parameters were calculated: gestation rate: number of pregnant females/number of inseminated females \times 100; fertility potential (efficiency of

implantation): implantation sites/corpora lutea \times 100; rate of preimplantation loss: [number of corpora lutea – number of implantations/number of corpora lutea] \times 100; and rate of postimplantation loss: [number of implantations – number of live fetuses]/number of implantations \times 100.

Statistical Analysis

For comparison of results between the experimental groups, Student t test or nonparametric Mann-Whitney test was performed, according to the characteristics of each variable. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed by GraphPad InStat (version 3.02).

Results

Experiment 1

Throughout the course of the study, the mean food intake of HFD rats was significantly lower than the mean food intake of SD rats, in all experimental periods. In contrast, total caloric consumption between the groups was similar at 15 weeks (HFD=SD) and elevated at 30 and 45 weeks (HFD>SD) (Table 2). Body weight, fat deposits, adiposity index and serum leptin increased in a time-dependent manner in obese and control animals but were higher in the obese group (HFD>SD) (Table 3).

Reproductive organs weights did not show any differences between HFD and SD groups in all treatment periods, excepting the relative weight of empty seminal vesicle which was lower in HFD animals than in SD after 45 weeks of diet exposure (Table 4).

There was no statistically significant difference between groups related to the number of mature spermatids in the testis and daily sperm production (Table 5). In the epididymis the number of spermatozoa in caput/corpus was similar between the two groups in all periods of diet exposure, but in epididymal cauda of animals fed HFD for 30 weeks there was an increase in sperm number (Table 5). The sperm transit time did not show any difference either in epididymal caput/corpus or cauda (Table 5).

Experiment 2

As occurred in experiment 1, HFD rats showed a statically significant increase in adiposity index, body weight and weights of fat deposits (data not shown) after 15 weeks of diet exposure.

Sexual behavior, assessed in this experiment, was not exhibited by some of the animals (2/13 in SD and 2/14 in HFD). Among those who presented sexual behavior, HFD animals showed an increase ($p < 0.05$) in latency to the first mount and a decrease ($p < 0.05$) in the number of intromissions after the first ejaculation. The other parameters evaluated in the test were similar between the two groups (Table 6).

Serum testosterone, FSH and LH levels were similar between SD and HFD animals; furthermore , parenchyma testosterone were not affected in HFD rats compared to SD animals. On the other hand, estradiol levels were significantly higher in HFD-fed animals (Table 7).

Results obtained from the morphological assessment of spermatozoa indicated that the percentages of both abnormal and normal sperm were similar between SD and HFD rats [SD = 94 (91-97)% and HFD = 93 (91-95)%, median (Q1-Q3) values for normal sperm]. The percentage of sperm with progressive movement was significantly diminished ($p < 0.05$) and the percentage of sperm without progressive movement was elevated ($p < 0.05$) in the HFD group when compared to SD animals (Figure 1).

The gestational rate was one hundred percent in both groups after natural mating, and thus there were no differences between SD and HFD groups regarding any fertility parameters (Table 8). After the *in utero* artificial insemination, the gestational rate was 100% in SD group and 78% in HFD. Fertility potential showed a tendency to decrease whereas the pre-implantation loss rate tended to increase in HFD animals, but without statistical significance (Table 8).

Discussion

It is believed that with the increasing prevalence of sedentary lifestyles and dietary changes, obesity is emerging, in turn, as an important cause of adverse health outcomes,

including male infertility [34]. Data from different population studies show an inverse relationship between BMI (body mass index) and fertility [10,11], although the mechanism by which fertility is affected is still unclear [35].

In an attempt to achieve deeper knowledge about obesity, several animal models have been developed, among which rodent models of diet-induced obesity (DIO) may provide the best parallels in relation to human obesity [14,15,18]. In this study, an obesity model induced by high-fat diet consumption was chosen. It is cited in the literature as causing obesity in a variety of mammals including nonhuman primates, dogs, pigs, hamsters, squirrels, mice [36], and rats [36,37].

The high-fat diet used in the present study was effective in promoting obesity, as demonstrated by an increased adiposity index in association with a higher body weight. This condition was exacerbated by long-term ingestion of a high-fat diet. The obese state was related to higher caloric intake in the HFD group at 30 and 45 weeks; however, obesity also was evident at 15 weeks even in the absence of higher caloric consumption by HFD rats. This condition may have been due to a high feeding effectiveness ratio in the hyperlipidic diet. There is evidence that high fat consumption is not accompanied by a proportional increase in its oxidation. This phenomenon favors the deposition of lipids such as triacylglycerol in adipose tissue, leading to an increase in body weight [38,39]. Unfortunately, there is no established threshold to differentiate obesity from overweight in animal models, such as those established by the WHO for humans [40]. It should be taken into account that in this study, the adiposity index was at least 25% higher in obese animals than in the control group at all experimental moments.

The adiposity index was calculated as the sum of the weights of the fat pads divided by body weight; this quotient represented an estimation of body fat. Results found herein for control animals are in accordance with other studies in the literature [22,41] that used similar methods for fat measurement. In animal models of genetic obesity, the adiposity index is higher [41] than that found in DIO animals, because the first case represents very severe obesity.

Leptin, a hormone produced mainly by adipocytes, is involved in controlling body weight by increasing both satiety and energy expenditure [18,35,42]. Leptin is also related

to the reproductive system [3,43] through both stimulatory and inhibitory effects [44,45]. The leptin concentration is related to the amount and distribution of body fat [6] such that the heavier the body weight the higher the leptin concentration in human and rodents [42]. The elevated serum leptin levels observed in the current study are likely a consequence of the increased fat accumulation. This result corroborates other studies in the literature that show high leptin levels in models of rodent DIO obesity [16,18,35,44,46,47].

Few studies in the literature relate organ weight to obesity. In Zucker rats, a genetic model of obesity, obese animals show no difference in the weights of **testes** or ventral prostate compared with lean rats [48]. Similarly, DIO male mice exhibited no changes in the average weight of the testis or epididymis [16]. These data are in accordance with the results of present study.

The number of spermatids present in the testis and the total DSP are important indicators of male fertility potential [49]. In this study, the consumption of HFD for 15, 30 or 45 weeks did not affect any of these parameters, nor did it alter the sperm concentration in the epididymal caput-corporis. The epididymal cauda sperm concentration was not altered in animals fed HFD for 15 and 45 weeks, which corroborates studies of male HFD-fed mice, that did not show differences in sperm concentration [16,17]. On the other hand, Sprague-Dawley rats fed a high-fat diet from 21 to 90 days old presented a reduced sperm concentration [35]. Some works show a reduction in sperm concentration in obese and overweight men [9,11] while another found no alterations in sperm concentration related to BMI [2]. Animals fed HFD for 30 weeks showed an increase in epididymal cauda sperm concentration, which was probably due to a non-significant increase in sperm transit time in this segment. However, this change did not alter fertility. Although sperm transit time through the epididymis plays an important role in the maturation of spermatozoa, Fernandez et al. [50] showed that sperm quality and fertility potential after intrauterine insemination are not harmed when transit time through the epididymis is delayed.

In general, sexual behavior among animals fed the high-fat diet was normal, despite the delay to start the test. The normal sexual behavior observed in these animals is in concordance with their normal serum testosterone levels, which were similar to those of rats fed a standard diet. A reduction in testosterone levels expected on account of the higher

leptin level in HFD animals from first experiment was not observed. Contrary to the results in the present study, Sprague-Dawley rats fed HFD from weaning to 90 days had a reduction in testosterone levels [35], and male mice fed HFD (for 9 weeks) showed a trend toward reduction in testosterone levels compared to the control group [17]. Among men, overweight and obesity is frequently related to diminished testosterone levels [2,11,13], a decrease proportional to the degree of obesity [51]. The adiposity gain seen in the animals was not sufficient to produce a significant diminution in the testosterone levels, perhaps because the obesity installed was not severe; however, it was enough to provoke a significant increase in serum estradiol levels, in accordance with results found by Viguera-Villaseñor and colleagues [35]. Obesity is associated with increased estradiol levels also in men [2,11].

Sperm motility is one of the most important parameters used in the evaluation of sperm quality [52-54]. This sperm parameter is acquired during sperm transit through the epididymal duct [55-59]. Epididymal histophysiology and acquisition of sperm motility are dependent on the presence of androgen [60,61]. In the present study the percentage of sperm with progressive motility was reduced despite normal levels of testosterone. Male mice rendered obese by consuming a high-fat diet also showed a diminished percentage of motile sperm without presenting alterations in testosterone levels [16]. In men, an inverse relationship between BMI and the number of normal-motile sperm was observed in some clinical studies [9,12], but was not found in others [2,13].

Alterations in motility parameters may lead to an inefficient sperm penetration of cervix mucus [62-64], impairing the ability of sperm to reach the oocyte. In addition, a high percentage of sperm with progressive motility is related to a high fertilization index [65]. Despite this, even with the decrease in progressive motility, the fertility after natural mating was not altered in HFD animals. Corroborating this result, DIO male DBA/2J mice (24% of fat in diet) did not show any alteration in fertility in relation to lean animals [18]. Contrarily, another study found a significant reduction in fertility after natural mating of diet-induced (60% of fat in diet) obese male C57BL/6J mice [16]. Another important sperm parameter for evaluating male fertility is sperm morphology [66] because it may indicate cytotoxic events [67]. The absence of morphological alterations in obese animals indicates

a high probability that obesity did not negatively affect spermatogenesis. In the literature there is an interesting observation that spermatogenesis is affected only in males with extreme obesity [68].

Given the impairment in sperm motility and the lack of effects on fertility after natural mating in the present study, we chose to utilize artificial insemination, a technique that excludes the influence of excess sperm ejaculated [69], to detect some impairment of fertile capacity of sperm with impaired motility. Fertility potential after artificial insemination showed a trend toward reduction. It is important to take into consideration that although the fertility potential was not significantly affected, there was a reduction of around 20% in this parameter indicating a possible reduction in fertile capacity of sperm. Similar results were found in mice by Bakos and colleagues [17], who observed a reduction in percentage of fertilized oocytes, using sperm from diet-induced obese mice (22% fat in the diet). The absence of statistical significance in the fertility results may be due to high reproductive competence of rats, which need to show a large impairment of sperm quality to be considered infertile [70].

In summary, the results reported herein show that the HFD treatment causes obesity in rats. The obese animals present a low sperm quality, elucidated by the decreased percentage of sperm with progressive movement that tends to impair fertility without affecting other sperm parameters. The reproductive capacity of male rats is known to be higher than that of men; therefore, the decrease in sperm quality seen in obese rats was not sufficient to significantly alter their fertility, whereas such a decrease in quality may be enough to alter fertility among human males. Since obesity is a growing health problem worldwide, additional studies are needed to investigate more deeply the relationship between obesity and male infertility.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors participated in the design, interpretation of the studies, analysis of the data and review of the manuscript; CDBF, GSAF, FFB, APF and JEP conducted the experiments; CDBF and WDGK wrote the manuscript. This study represents part of CDBF Ph.D. thesis presented to the State University of Campinas, under the advisory of WDGK.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Janete Aparecida Anselmo Franci and Dr. Ruither de Oliveira Gomes Carolino for the hormonal dosages. We are also grateful to José Eduardo Bozano, from the Department of Morphology of the São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, for the excellent technical assistance. The authors would also like to thank José Carlos Georgete for the help in diet preparation. Finally, authors are grateful to The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), for the financial support.

References

- [1] Morris MJ, Velkoska E, Cole TJ: **Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment.** *Exp Physiol* 2005, **90(5)**: 697-702.
- [2] Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R: **Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic.** *Fertil Steril* 2010, **93(7)**:2222-2231.
- [3] Power ML, Schulkin J: **Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins.** *Br J Nutr* 2008, **99(5)**:931-940.
- [4] WHO - World Health Organization: **Part I: The problem of overweight and obesity.** In *World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic.* Geneva: WHO Technical Report Series, No. 894. 2000.

- [5] Nammi S, Koka S, Chinnala KM, Boini KM: **Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options.** Nutr J 2004, **3**:3.
- [6] Mayes JS, Watson GH: **Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity.** Obes Rev 2004, **5**(4):197-216.
- [7] Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M and Gambineri A: **Obesity and reproductive disorders in women.** Hum Reprod Update 2003, **9**(4):359-372.
- [8] Robker RL: **Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos.** Pathophysiology 2008, **15**(2):115-121.
- [9] Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle W. **Male obesity and alteration in sperm parameters.** Fertil Steril 2008, **90**(6):2222-2225.
- [10] Magnúsdóttir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdóttir S, María Heimisdóttir M, Ólafsdóttir K: **Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility.** Hum Reprod 2005, **20**(1):208-215.
- [11] Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE: **Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men.** Fertil Steril 2004, **82**(4):863-870.
- [12] Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE: **Impact of Body Mass Index Values on Sperm Quantity and Quality.** J Androl 2006, **27**(3):450-452.
- [13] Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP: **Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile?** Fertil Steril 2008, **90**(3):619-626.
- [14] Archer ZA, Mercer JG: **Brain responses to obesogenic diets and diet-induced obesity.** Proc Nutr Soc 2007, **66**(1):124-130.
- [15] Tan HM, Gundlach AL, Morris JM: **Exaggerated feeding response to central galanin-like peptide administration in diet-induced obese rats.** Neuropeptides 2005, **39**(3):333-336.
- [16] Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U: **Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity.** Biol Reprod 2010, **82**(1):94-104.

- [17] Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M: **The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model.** Int J Androl, in press.
- [18] Tortoriello DV, McMinn J, Chua SC: **Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice.** Endocrinology 2004, **145(3)**:1238-1247.
- [19] Mandenoff A, Bertièrè MC, Betouille D, Apfelbaum M: **Action of naltrexone on the sexual impairment of obese cafeteria rats.** NIDA Res Monogr 1986, **75**:489-492.
- [20] Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, Cicogna AC: **A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats.** Arq Bras Endocrinol Metabol 2008, **52(6)**: 968-974.
- [21] Francia-Farje LAD, Silva DS, Volpato GT, Fernandes GSA, Carnietto N, Cicogna AC, Kempinas WG: **Sibutramine effects on the reproductive performance of pregnant overweight and non-overweight rats.** J Toxicol Environ Health A 2010, **73(13-14)**:985-990.
- [22] Taylor BA, Phillips SJ: **Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling.** Genomics 1996, **34(3)**:389-398.
- [23] Robb GW, Amman RP, Killian GJ: **Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats.** J Reprod Fertil 1978, **54(1)**:103-107.
- [24] Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG: **Reproductive effects in male rats exposed to diuron.** Reprod Toxicol 2007, **23(1)**:106-112.
- [25] Ahlenius S and Larsson K: **Apomorphine and haloperidol-induced effects on male rat sexual behavior: no evidence for actions due to stimulation of central dopanine autoreceptors.** Pharmacol Biochem Behav 1984, **21(3)**:463-466.
- [26] Ågmo A: **Male rat sexual behavior.** Brain Res Protoc 1997, **1(2)**:203-209.
- [27] Seed J, Chapi RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RE, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Rao Veeramachaneni DN, Wise LD: **Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report.** Reprod Toxicol 1996, **10(3)**:237-244.

- [28] Filler R: **Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology.** In *Male reproductive toxicology*. Edited by Chapin RE, Heindel JH. San Diego, California: Academic Press, Inc.; 1993:334-343.
- [29] Laskey JW, Klinefelter GR, Kelce WR, Ewing LL: **Effect of ethane dimethanesulphonate on adult and immature rabbit Leydig cells: comparison with EDS treated rat Leydig cells.** Biol Reprod 1994, **50(5)**:1151–1160.
- [30] Amann RP: **The use of animal models for detecting specific alterations in reproduction.** Fundam Appl Toxicol 1982, **2(1)**:13-26.
- [31] Klinefelter GR: **Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis.** In *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. 1st edition. Edited by Robaire B, Hinton BT. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher; 2002:353-369
- [32] Klinefelter GR, Laskey JW, Kelce WR, Ferrell J, Roberts NL, Suarez JD, Slott V: **Chloroethylmethanesulfonate-induced Effects on the Epididymis seem unrelated to altered Leydig Cell Function.** Biol Reprod 1994^a, **51(1)**:82- 91.
- [33] Kempinas WG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Narotsky MG, Perreault SD, Evenson DP, Ricker DD, Klinefelter GR: **Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy.** Biol Reprod 1998, **59(4)**:897-904.
- [34] Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT: **Obesity and male reproductive potential.** J Androl 2006, **27(5)**:619-626.
- [35] Viguera-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Chávez-Saldaña M, Gutiérrez-Pérez O, García-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O, Reyes-Romero MM, Zambrano E: **Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats.** Acta Histochem, in press.
- [36] West DB, York B: **Dietary fat, genetic predisposition, and obesity; lessons from animal models.** Am J Clin Nutr 1998, **67(3 suppl)**:505S-512S
- [37] Ramirez I, Friedman, MI: **Dietary hyperphagia in rats: role of fat, carbohydrate, and energy content.** Physiol Behav 1990, **47(6)**:1157-1163.
- [38] Schrauwen P, Westerterp KR: **The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight.** Br J Nutr 2000, **84(4)**: 417-427.

- [39] Tentolouris N, Pavlatos S, Kokkinos A, Perrea D, Pagoni S, Katsilambros N: **Diet-induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese women after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat.** *Metabolism*. 2008, **57(3)**: 313-320.
- [40] WHO - World Health Organization: **Physical status: the use and interpretation of anthropometry.** Report of a WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization, 1995 (WHO Technical Report Series, No. 854).
- [41] Jeyakumar SM, Lopamudra P, Padmini S, Balakrishna N, Giridharan NV, Vajreswari A: **Fatty acid desaturation index correlates with body mass and adiposity indices of obesity in Wistar NIN obese mutant rats strains WNIN/Ob and WNIN/GR-Ob.** *Nutr Metab* 2009, **6**:27.
- [42] Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebinara K, Satoh N, Iwai H, Matsuoka N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimura Y, Nakao K: **Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension.** *J Clin Invest* 2000, **105(9)**:1243-1252.
- [43] Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E: **Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor Messenger ribonucleic acid expression.** *J Endocrinol* 2001, **170(2)**:413-423.
- [44] Olivares A, Méndez JP, Zambrano E, Cárdenas M, Tovar A, Perera-Marín G, Ulloa-Aguirre A: **Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity.** *Gen Comp Endocrinol* 2010, **166(2)**: 356-364.
- [45] Tena-Sempere M, Barreiro ML: **Leptin in male reproduction: the testis paradigm.** *Mol Cell Endocrinol* 2002, **188(1-2)**:9-13.
- [46] Farley C, Cook JA, Spar BD, Austin TM, Kowalski TJ: **Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats.** *Obes Res* 2003, **11(7)**:845-851.

- [47] Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, Thorburn AW: **Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in rat model of diet-induced obesity.** Diabetes Obes Metab 2007, **9(6)**:840-852.
- [48] Edmonds ES, Dallie SK, Withyachumnarnkul B: **Reproductive System of the Obese Male Zucker Rat. Reproductive Capacity, Artificial Insemination and Plasma Testosterone Levels.** Biol Reprod 1982, **27(4)**:891-897.
- [49] Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J: **The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisfenol A between postnatal days 91-97.** Toxicol Sci 2003, **74(1)**:129-138.
- [50] Fernandez CDB, Porto EM, Arena AC, Kempinas WG: **Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality.** Int J Androl 2007, **31**:427-437.
- [51] Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A: **Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men.** J Clin Endocrinol Metab 1994, **79(4)**:997-1000.
- [52] Mahadevan MM, Trounson AO: **The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization.** Fertil Steril 1984, **42(3)**:400-405.
- [53] Bostofte E, Bagger P, Michael A, Stakemann G: **Fertility prognosis for infertile men from two different population evaluated by the Cox regression model.** Fertil Steril 1990, **54(6)**:1100-1106.
- [54] Barratt CL, Tomlinson MJ, Cooke ID: **Prognostic significance of computerised motility analysis for in vivo fertility.** Fertil Steril 1993, **60(3)**:520-525.
- [55] Brooks DE: **Epididymal functions and their hormonal regulation.** Aust J Biol Sci 1983, **36(3)**:205-221.
- [56] Cooper T G: **Epididymis.** In *Encyclopedia of Reproduction*. Volume 2. Edited by Knobil E & Neill JD. California: Academic Press; 1998:1-17.
- [57] Jones RC: **To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis.** Int J Androl 1999, **22(2)**:57-67.
- [58] Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecruid H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL: **Post-testicular sperm environment and fertility.** Anim Reprod Sci 2004, **82-83**:321-339.

- [59] Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G: **Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract.** Blood Cells Mol Dis 2005, **35(1)**:1-10.
- [60] Orgebin-Crist MC, Tichenor PL: **Effect of testosterone on sperm maturation in vitro.** Nature 1973, **245**:328-329.
- [61] Henderson NA, Robaire B: **Effects of PNU157706, a dual 5 α -reductase inhibitor, on rat epididymal sperm maturation and fertility.** Biol Reprod 2005, **72(2)**:436-443.
- [62] Aitken RJ, Sutton M, Waner P, Richardson DW: **Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamsters oocytes.** J Reprod Fertil 1985, **73(2)**:441-449.
- [63] Feneux D, Serres C, Jouannet P: **Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility?** Fertil Steril 1985, **44(4)**:508-511.
- [64] Mortimer D, Pandya IJ, Sawers RS: **Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro.** J Reprod Fertil 1986, **78(1)**:93-102.
- [65] Donnelly ET, Lewis SEM, McNally JA, Thompson W: **In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome.** Fertil Steril 1998, **70(2)**:305-314.
- [66] Plassmann S, Urwyler H: **Improved risk assessment by screening sperm parameters.** Toxicol Lett 2001, **119(2)**:157-171.
- [67] U.S.EPA-United State Environmental Protection Agency: ***Reproductive Toxicity Risk Assessment Guidelines***; 1996.
- [68] Pascuali R: **Obesity, fat distribution and infertility.** Maturitas 2006, **54(4)**:363-371.
- [69] Klinefelter GR, Laskey JW, Perreault SD, Ferrel J, Jeffay S, Suarez J, Roberts N: **The ethane dimethanesulphonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis.** J Androl, 1994^b, **15(4)**:318-327.

[70] Perreault SD, Cancel AM: **Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies.** *Reproduction* 2001, **121(2):207-216**

Figure legend

Figure 1 – Sperm motility

Sperm motility of rats from SD and HFD groups. Values expressed by median. Mann-Whitney test. **p < 0.001.

Tables

Table 1. Nutritional composition of experimental diets

Components	Diets	
	SD (RC Focus 1765)	HFD (RC Focus 2413)
Protein (%)	22	20
Carbohydrate (%)	48	37
Fat (%)	4	20
Others (%)*	26	23
Calories (Kcal/g)	3,16	4,08

Others: fiber and mineral matter, calcium and phosphorus

Table 2. Daily mean food and calories consumption

	<i>15 weeks</i>		<i>30 weeks</i>		<i>45 weeks</i>	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
Daily food intake (g)	28.6 ± 0.4	22.5 ± 0.3***	27.1 ± 0.3	23.1 ± 0.3***	26.5 ± 0.2	22.0 ± 0.2***
Daily calories intake (kcal)	90.5 ± 1.2	91.8 ± 1.2	85.5 ± 1.0	94.4 ± 1.0***	83.8 ± 0.7	89.7 ± 0.7***
<i>N</i>	11	13	12	11	11	9

Values expressed by mean ± S.E.M. Mann-Whitney test. ***p < 0.0001.

Table 3. Body weight, fat weighs and leptin levels in rats from SD and HD group.

	15 weeks		30 weeks		45 weeks	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
Final body weight (g)	472.00 ± 6.86	502.31 ± 8.41*	533.08 ± 8.44	583.09 ± 13.00**	567.82 ± 13.18	644.22 ± 20.43**
Fat deposits (g)						
Epididymal	7.85 ± 0.31	10.67 ± 0.69**	8.90 ± 0.73	12.87 ± 1.29*	12.77 ± 1.05	16.84 ± 1.08*
Visceral	4.98 ± 0.36	7.08 ± 0.59*	5.62 ± 0.43	9.46 ± 0.95**	9.32 ± 0.76	13.17 ± 1.21*
retroperitoneal	7.06 ± 0.30	11.56 ± 1.38*	8.79 ± 1.03	14.71 ± 1.82*	13.83 ± 0.90	22.65 ± 2.34**
Adiposity index (%) ^b	4.15 (3.81 – 4.54)	5.53 (5.31 – 6.37)**	4.55 (3.39 – 5.16)	6.71 (4.39 – 7.51)*	6.57 (5.37 – 7.37)	7.82 (7.58 – 8.72)**
Leptin levels (ng/mL)	2.88 ± 0.28	5.42 ± 0.34**	4.98 ± 0.41	8.17 ± 0.80**	7.32 ± 0.77	10.92 ± 0.93*
<i>N</i>	11	13	12	11	11	9

Values expressed by mean ± S.E.M. Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 4. Absolute and relative organ weight from rats fed standard or high-fat diet

	15 weeks		30 weeks		45 weeks	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
<i>Absolute organ weight</i>						
Testis (g)	1.88 ± 0.04	1.82 ± 0.06	1.74 ± 0.11	1.91 ± 0.06	1.94 ± 0.05	2.12 ± 0.11
Epididymis (mg)	666.73 ± 14.77	671.69 ± 14.87	629.33 ± 34.61	668.55 ± 18.35	646.45 ± 14.75	683.78 ± 40.45
Vas deferens (mg)	99.73 ± 2.81	98.41 ± 6.29	116.17 ± 4.97	114.00 ± 5.52	119.73 ± 4.14	130.11 ± 3.71
Ventral prostate (mg)	478.91 ± 43.43	542.54 ± 37.14	588.75 ± 29.11	556.55 ± 32.37	418.18 ± 39.68	417.89 ± 32.18
Seminal vesicle full (g)	1.24 ± 0.08	1.37 ± 0.09	1.36 ± 0.09	1.48 ± 0.07	1.46 ± 0.07	1.59 ± 0.07
Seminal vesicle empty (mg)	578.36 ± 38.34	658.62 ± 30.83	728.83 ± 59.15	745.00 ± 34.09	703.73 ± 33.48	680.89 ± 43.02
<i>Relative organ weight</i>						
Testis (g/100g)	0.40 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.02
Epididymis (mg/100g)	141.44 ± 3.41	133.93 ± 3.03	121.46 ± 5.48	115.52 ± 4.93	114.21 ± 2.90	107.49 ± 8.21
Vas deferens (mg/100g)	21.16 ± 0.62	19.68 ± 1.25	21.97 ± 0.98	19.59 ± 0.86	21.23 ± 0.96	20.37 ± 0.97
Ventral prostate (mg/100g)	101.90 ± 9.58	107.74 ± 7.01	111.11 ± 5.43	96.49 ± 6.76	74.30 ± 7.54	65.72 ± 6.09
Seminal vesicle full (g/100g)	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.01
Seminal vesicle empty (mg/100g)	122.55 ± 7.92	130.96 ± 5.28	140.21 ± 11.65	127.93 ± 5.87	123.90 ± 5.06	105.85 ± 6.34*
<i>N</i>	11	13	12	11	11	9

Values expressed by mean ± S.E.M. Mann-Whitney test. *p < 0.05.

Table 5. Sperm counts in rats from SD and HFD groups

	<i>15 weeks</i>		<i>30 weeks</i>		<i>45 weeks</i>	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
Sperm number in the testis (x10 ⁶)	291.70 ± 6.02	294.02 ± 8.25	228.42 ± 12.30	248.05 ± 13.56	233.92 ± 9.64	239.54 ± 19.73
Daily sperm production (x10 ⁶ /testis/day)	47.82 ± 0.99	48.20 ± 1.35	37.45 ± 2.02	40.66 ± 2.22	38.35 ± 1.58	39.27 ± 3.24
Sperm number in the caput/corpus epididymis (x10 ⁶)	171.32 ± 7.97	171.77 ± 8.2	142.44 ± 14.01	152.26 ± 6.13	172.58 ± 8.99	162.86 ± 18.06
Sperm transit time in the caput/corpus (days)	3.62 ± 0.17	3.58 ± 0.15	4.22 ± 0.26	3.83 ± 0.22	4.52 ± 0.21	4.26 ± 0.42
Sperm number in the cauda epididymis (x10 ⁶)	347.61 ± 17.72	330.30 ± 13.3	243.82 ± 31.46	320.94 ± 16.77*	291.78 ± 14.44	281.57 ± 24.61
Sperm transit time in the cauda (days)	7.35 ± 0.41	6.85 ± 0.2	6.6 ± 0.81	8.02 ± 0.43	7.74 ± 0.50	7.30 ± 0.68
<i>N</i>	11	13	12	11	11	9

Values expressed by mean ± S.E.M. Mann-Whitney test. *p < 0.05.

Table 6. Sexual behavior of rats fed SD or HFD during 15 weeks.

	SD	HFD
Latency to the first mount (s)	56.45 ± 12.06 (n = 11)	133.3 ± 35.93* (n = 12)
Latency to the first intromission (s)	110.45 ± 24.09 (n = 11)	169.67 ± 44.98 (n = 12)
Number of intromissions until the first ejaculation	19.94 ± 2.01 (n = 11)	14.50 ± 1.36 (n = 12)
Latency to the first ejaculation (s)	664.00 ± 68.82 (n = 8)	946.67 ± 123.91 (n = 12)
Latency to the first post-ejaculatory intromissions (s)	952.00 ± 66.01 (n = 8)	1234.64 ± 142.30 (n = 11)
Number of post-ejaculatory intromissions	25.75 ± 2.207 (n = 8)	14.82 ± 2.75* (n = 11)
Number of ejaculations	2.88 ± 0.23 (n = 8)	2.17 ± 0.30 (n = 12)
N	11	13

Values expressed by mean ± S.E.M. Student t test. *p < 0.05.

Table 7. Serum sexual hormone levels and parenchyma testosterone of rats fed SD or HFD during 15 weeks.

	SD	HFD
Serum testosterone (ng/mL)	1.93 ± 0.31	2.89 ± 0.55
Serum LH (ng/mL)	0.99 ± 0.27	0.91 ± 0.27
Serum FSH (ng/mL)	10.20 ± 0.71	11.97 ± 1.74
Estradiol (pg/mL)	8.69 ± 0.38	11.11 ± 0.91*
Parenchyma (ng/mg)	69.50 ± 7.72	70.56 ± 8.19
N	13	14

Values expressed by mean ± S.E.M. Mann-Whitney test. *p < 0.05.

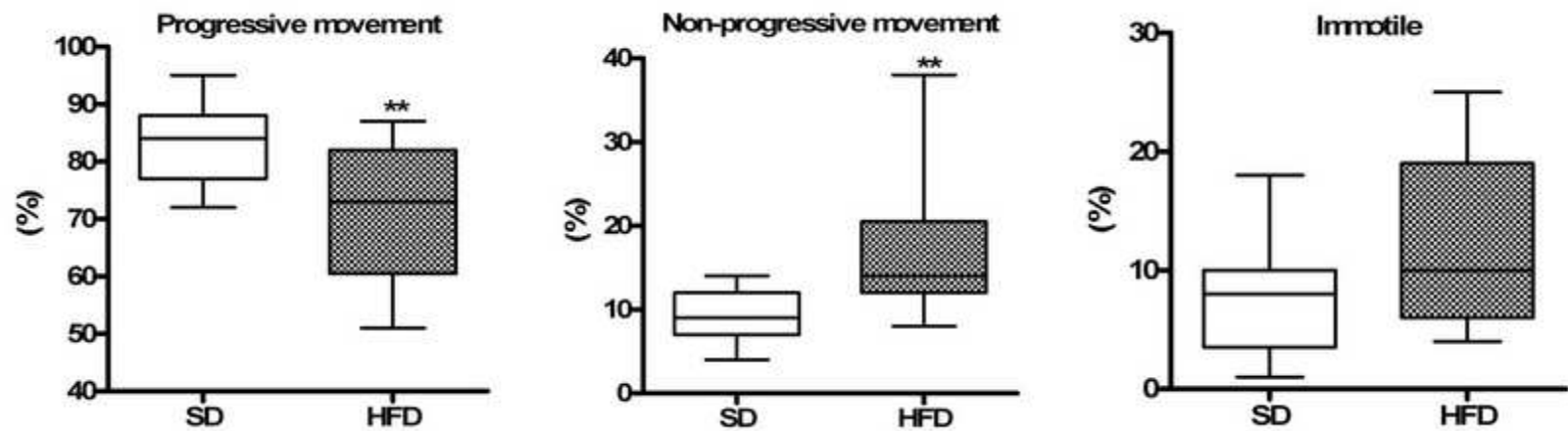
Table 8. Fertility parameters after natural mating and *in utero* artificial insemination of rats fed SD or HFD during 15 weeks.

	Natural Mating		<i>In utero</i> insemination	
	SD	HFD	SD	HFD
Fertility potential (%) ^a	100 (92.15 – 100)	100 (85.7 – 100)	91.89 (77.43 – 100)	75.00 (65.39 – 95.46)
Body weight of dams (g) ^b	356.67 ± 10.67	355.88 ± 6.51	314.80 ± 12.58	286.16 ± 12.43
Number of corpora lutea ^b	12.25 ± 0.45	13.15 ± 0.37	12.90 ± 0.74	11.86 ± 0.40
Number of implantation sites ^b	11.67 ± 0.69	12.38 ± 0.40	10.9 ± 0.55	8.71 ± 1.41
Number of fetuses per litter ^b	11.25 ± 0.66	10.85 ± 1.00	10.7 ± 0.58	7.86 ± 1.41
Preimplantation loss (%) ^a	0 (0 – 7.85)	0 (0 – 14.3)	8.12 (0 – 22.32)	25.00 (4.55 – 34.62)
Postimplantation loss (%) ^a	0 (0 – 7.1)	0 (0-7.1)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
<i>N</i>	12	13	10	7

^aValues expressed by median (Q1 – Q3). ^bValues expressed by mean ± S.E.M. Mann-Whitney test. *p* > 0.05

Figure

Figure 1



4.2 Artigo II

O segundo artigo foi intitulado “*Exogenous leptin treatment impair fertility potential in adult male rats*”, e após formatado será submetido para periódico internacional.

Exogenous leptin treatment impair fertility potential in adult male rats

Carla DB Fernandez^{1,2§}, Glauro SA Fernandes, Ana Paula A Favareto^{1,2}, Juliana E Perobelli^{1,2},
Marciana Sanabria², Wilma DG Kempinas²

¹Graduate Program in Cell and Structural Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil.

§Corresponding author

Email addresses:

CDBF: carladbf@yahoo.com.br

GSAF: glaura_sf@yahoo.com.br

APAF: anafavareto@yahoo.com.br

JEP: jperobelli@gmail.com

MS: marcisanabria@gmail.com

WDGK: kempinas@ibb.unesp.br

Abstract

Leptin is a protein transcribed from the *ob* gene and secreted by the adipocytes, serving as a link between fat and brain. Its main action is to decrease appetite and increase energy expenditure, but it is also involved in the control of different neuroendocrine systems, including gonadal axis. Although the effects of leptin deficiency on reproduction are well recognized, the effect of excess leptin on male reproductive function is not clear. The aim of present study was evaluated fertility and some sperm parameters in male rats exposed to exogenous leptin. For this, a group of adult male rats was treated with exogenous leptin ip (30µg/kg/day) for 42 days and other group received the vehicle. After treatment period, animals were evaluated by sperm count in testis and epididymis, sperm motility and fertility after artificial insemination. There was no statistically significant difference between groups related to the number of late spermatids in the testis, daily sperm production and number of spermatozoa in epididymal caput/corpus or cauda. In the same way, the percentages of progressive, non-progressive and immotile sperm were similar between groups. However, fertility evaluated after artificial insemination showed a quantitative decrease of the uterus plus fetuses weight, number of implantation sites and number of live fetuses. The fertility potential showed a reduction of about 40% whereas the pre-implantation loss rate increased more than two fold in leptin treated animals. Taking into account that the reproductive potential of rats is higher compared to other animals including men, the impairment of fertility showed in the present study might indicate that an increase in leptin levels may affect human fertility.

Introduction

Leptin is a 16 KDa protein transcribed from the *ob* gene and secreted by the adipocytes (Auwerx and Staels, 1998; Messinis and Milingos, 1999; Tena-Sempere et al., 1999), mainly in white adipose tissue (Auwerx and Staels, 1998), and it serves as a link between fat and brain. The word leptin is derived from the Greek word 'leptos' that means thin (Auwerx and Staels, 1998; Messinis and Milingos, 1999). Leptin achieves most of its

metabolic effects by interaction with specific receptors located in the central nervous system and in peripheral tissues (Auwerx and Staels, 1998). The main action of leptin is to decrease appetite and increase energy expenditure, (Messinis and Milingos, 1999, Aizawa-Abe et al, 2000), but it is also involved in the control of different neuroendocrine systems, acting as regulatory signal for growth, adrenal, thyroid and gonadal axes (Tena-Sempere and Barreiro, 2002), in last case acting as a metabolic link between nutrition and fertility.

It is well-known that the absence of biological actions of leptin, due to mutations in the *ob* gene (*ob/ob* mice) or in the leptin receptor gene (*db/db* mice), leads to infertility in males and females (Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997; Sone and Osamura, 2001). It is also known that the treatment of mutant mice with exogenous leptin, restore fertility in both sexes (Barash et al., 1996; Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997; Cunningham et al., 1999). In human, there is an inverse correlation between leptin levels and the age at menarche in women; and in men, the lack of endogenous leptin is associated to hypogonadism and absence of pubertal development (Tena-Sempere and Barreiro, 2002).

Leptin levels is augmented in obese human, and some studies have associated the increased BMI (body mass index) to poor sperm quality (Magnusdottir et al., 2005), decreased sperm concentration (Jensen et al., 2004), decreased normal-motile sperm cells and increased DNA fragmentation index (Kort et al., 2006). However, the mechanisms by which these sperm parameters are altered are still unknown. Although the effects of leptin deficiency on reproduction are well recognized, the effect of excess leptin on male reproductive function is not clear. Exogenous leptin treatment, in non-obese Sprague-Dawley rats, for 42 days leads to a decrease in sperm count and an increase in percentage of abnormal sperm (Haron et al., 2010), showing that leptin could play a role in the reported negative correlation between BMI and sperm quantity and quality.

In attempt to understand more deeply the relation of leptin and the male reproductive system, including fertility, the aim of present study was evaluate fertility and some sperm parameters in male rats exposed to exogenous leptin.

Material and methods

Animals and treatment

Male (n = 24, 100 days old) and females (n = 36, 80 days old) Wistar rats were supplied by Central Biotherium of the State University of São Paulo and housed in Biotherium of the Small Mammals of the Morphology Department, Institute of Biosciences, State University of São Paulo. During the experiment, animals were allocated into polypropylene cages (43x30x15 cm) with laboratory grade pine shavings as bedding. Rats were maintained under controlled temperature ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) and lighting conditions (12L, 12D photoperiod, lights switched off at 07:00 pm). Rat chow and filtered tap water were provided *ad libitum*. Animals were allowed to adapt for at least 1 week before the beginning of the experiment. Experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Biosciences Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Research.

Male rats were randomly assigned to one of two different groups, treated for 42 days: the first received daily ip injections of 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ leptin (recombinant rat leptin, Preprotech

inc, ref: 400-21) dissolved in saline solution (n = 12), and the second, control group (n = 12), received just the vehicle. Rats were weighed on alternate days. The dose of leptin was chosen based on the study of Haron and colleagues (2010), which were based on the serum leptin levels of obese human.

Collection of tissue and organs

On the day following the end of treatment, rats from leptin and control group was slightly anesthetized with CO_2 and induced to death by decapitation. The left testis, epididymis, vas deferens, ventral prostate and seminal vesicle (without the coagulating gland) were removed and their weights (absolute and relative to body weights) were determined. Testis and epididymis were used for sperm counts. The right epididymal cauda was used for sperm collection to artificial *in utero* insemination and sperm motility assay.

***In utero* artificial insemination**

Because rats produce and ejaculate an excess of qualitatively normal sperm, artificial *in utero* insemination of a fixed critical number of sperm has been suggested as a means of increasing the sensitivity of a toxicant-induced decrease in sperm quality in the rat (Amann, 1986). According to this technique, a fixed number of sperm collected in the cauda epididymis is inseminated directly into the uterus allowing evaluation of sperm quality, without the interference of other factors such as alterations of the sexual behavior pattern and number of sperm available for ejaculation (Klinefelter, 2002).

A cohort of females (n = 36) was synchronized with a single subcutaneous injection of 80µg of luteinizing releasing hormone (LHRH) agonist (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri), 115 hours prior to the insemination. Shortly after the room lights were turned off on the day of proestrus, the synchronized females were paired with sexually experienced, vasectomized males of proven sterility for 1h. Receptive females (that exhibited lordosis) were selected for insemination. The isolation and preparation of proximal cauda sperm for insemination were the same as described previously (Klinefelter et al., 1994; Kempinas et al., 1998b), with the following adaptations. Briefly, the sperm were released from the proximal cauda by nicking the tubule with a n° 11 scalpel and allowed to disperse in 2 ml of modified HTF medium (Human Tubular Fluid, IrvineScientific®). After 5min of dispersion, a sperm aliquot was diluted 1:10 with fixative (10% formalin in PBS) and counted using a Neubauer chamber. Within 15min, each uterine horn was injected with a volume containing 5×10^6 sperm, a value that typically results in 75% fertility using control males (Klinefelter et al., 1994). One female was inseminated per male. All inseminations were performed while the recipient female was in a surgical plane using a mix of ketamine and xylazine anesthesia. The bifurcation of the uterine horns was exposed through a low, midventral incision. Fine curved forceps were used to elevate each horn while the insemination volume was injected through the wall of each horn via an 18-gauge i.v. catheter attached to a 1.0-ml syringe. Each injection site was cauterized immediately upon withdrawal of the needle. When insemination was complete, the abdominal musculature was sutured. Females were killed 20 days later to evaluate fertility.

Fertility evaluation

On gestational day 20 the females were slightly anesthetized with CO₂ and killed by decapitation. After collection of the uterus and ovaries the numbers of corpora lutea, implants, reabsorptions and live and dead fetuses were determined. From these results the following parameters were calculated: gestation rate: number of pregnant females/number of inseminated females \times 100; fertility potential (efficiency of implantation): implantation sites/corpora lutea \times 100; rate of preimplantation loss: [(number of corpora lutea – number of implantations)/number of corpora lutea] \times 100; rate of postimplantation loss: [(number of implantations – number of live fetuses)]/number of implantations \times 100.

Sperm motility

Sperm motility was evaluated in the same sample used for *in utero* insemination. An aliquot of 10 μ L was pipetted and transferred to a warmed Makler counting chamber (Sefi-Medical, Haifa, Israel). Sperm motility evaluation was performed by the same person throughout the study and was assessed by visual estimation (100 spermatozoa per animal, in duplicate) under a phase-contrast microscope (Leica DMLS) at 200X magnification. Spermatozoa were classified as: immotile, motile without progression and motile with progressive movement.

Daily sperm production per testis and sperm number in the epididymis

Homogenization-resistant testicular spermatids (stage 19 of spermiogenesis) in the testes were counted as described previously by Robb et al. (1978), with adaptations adopted by Fernandes et al. (2007). Briefly, the testis, decapsulated and weighed soon after collection, was homogenized in 5 mL of NaCl 0.9% containing Triton X 100 0.5%, followed by sonication for 30 seconds. After a 10-fold dilution, one sample was transferred to Neubauer chambers (4 fields per animal), and late spermatids were counted. To calculate the daily sperm production (DSP), the number of homogenization-resistant spermatids was divided by 6.1, the number of days these spermatids are present in the seminiferous epithelium. In the same manner, caput/corpus and cauda epididymidis portions were cut

into small fragments with scissors and homogenized, and sperm counted as described for the testis.

Statistical Analysis

For comparison of results between the experimental groups, Student t test or nonparametric Mann-Whitney test was performed, according to the characteristics of each variable. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The statistical analyses were performed by GraphPad InStat (version 3.02).

Results

Throughout the course of the experiment, body weight and the average of food intake of treated and control rats were similar (Figure 1). Reproductive organ weights, absolute and relative to body weight, did not show any differences between control and leptin treated rats (Table1). Furthermore, there was no statistically significant difference between groups related to the number of late spermatids in the testis, daily sperm production, number of spermatozoa in epididymal caput/corpus or cauda (Table 2).

The sperm motility parameters were not affected by treatment with exogenous leptin, and the percentages of progressive, non-progressive and immotile sperm were similar between groups (Figure 2).

After artificial insemination, gestational rate was one hundred percent in control group (8 pregnant/ 8 inseminated females) and ninety percent in leptin treated group (9 pregnant/ 10 inseminated female). There was a quantitative reduction in the uterus plus fetuses weight, in the number of implantation sites and in the number of live fetuses (table 3), but without statistical significance. Additionally, it was found two died fetuses in leptin group, and one of these presented an external malformation, while in control group all fetuses were born live. Fertility potential showed a statically significant reduction, of about 40% percent, in leptin treated animals, whereas the pre-implantation loss rate was more than two fold higher in these animals (table 3).

Discussion

Leptin is well known to be the hormonal link between energy stores and several vital functions. Furthermore, it plays an important role in reproduction both in male and female, however the action of leptin on male reproductions is still unclear. Although it is true that leptin supplementation in leptin-deficient states results in improved reproductive function, it is, however, also possible that when in excess, leptin could have some adverse effects on reproduction (Haron et al., 2010).

When genetic obese mice (*ob/ob*) are treated with leptin, the body weight of the animals decreases throughout the treatment (Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997). However, when exogenous leptin was given to normal rats it was not observed differences in body weight and food intake between controls and leptin-treated rats (Haron et al., 2010), corroborating the results found in the present study. In these homozygous mice (*ob/ob*) the testis and seminal vesicles are smaller than in the lean mice (Bhat et al., 2006) and the treatment with exogenous leptin restores their weights, as well as testicular histological features (Mounzih et al., 1997). In the present study, none of male reproductive organs had their weights altered by the leptin exposure, indicating that this treatment did not cause general toxicity to the reproductive system of the animals. The determination of relative and absolute weights of reproductive organs is useful parameters in the evaluation of risk from toxic effects on the male reproductive apparatus (Clegg et al., 2001).

In human, there is a study that shows an infertile oligozoospermic group of men in which serum leptin levels is higher than in the fertile normozoospermic group (Hanafy et al., 2007). In the same way, the concentration of leptin in seminal plasma was significantly lower in 'normal' semen sample (sperm concentration > 20 million mL⁻¹, normal morphology > 30% and motility > 50%) than in the 'pathological' semen sample (one or more semen parameters below the characteristics of the normal group), without relationship between serum leptin levels and spermiogram parameters (Glander et al., 2002). These data demonstrate that increased levels of leptin probably play a role in men's infertility and poor sperm parameters.

Similarly, in an animal study in which non-obese rats received daily injections of leptin, it was observed a significant reduction in epididymal sperm count and a significant

increase in the percentage of abnormal sperm in treated animals (Haron et al., 2010). In contrast with that evidences, in the present study it was not observed any alterations in sperm counts, either in testis or epididymis.

Seminal plasma leptin concentration is negatively associated with the percentage of motile spermatozoa, what may indicate an involvement of the hormone in the mechanisms of motility development (Glander et al., 2002). In contrast with this, in the present study, leptin treatment did not alter the motility pattern of sperm.

The lack of leptin is a well-known cause of infertility in the genetically obese mice (Messinis and Milingos, 1999; Tena-Sempere and Barreiro, 2002) and is also known that the replacement of this hormone, restore the fertility in that animals, in both sexes (Chehab et al., 1996; Mounzih et al., 1997). Although this study had not shown any alterations in sperm parameters, it showed a significant reduction in fertility potential, ie, in the implantation efficiency, after artificial insemination. In animals exposed to exogenous leptin the fertility potential was reduced to 60% compared to control animals. As previously described, human clinical studies have shown that high levels of serum leptin is related to infertility in oligozoospermic men (Hanafy et al., 2007), although the mechanism by which this occurs is not understood.

Another parameter of fertility affected by the leptin treatment was the pre-implantation loss rate, which was increased to more than two fold in treated animals. The increased pre-implantation loss rate found in the present study indicates that either spermatozoa from treated animals were not able to fertilize the oocyte, or they have some kind of genetic alteration that did not allow the posterior development.

In conclusion, the results of this study indicate that leptin administration to non-obese male rats impair the fertility of animals. Taking into account that the reproductive potential of rats is higher compared to other animals including men, the impairment of fertility showed in the present study might indicate that an increase in leptin levels may affect human fertility. More studies are needed to understand the mechanism by which leptin acts in reproductive system of male individuals.

Acknowledgements

The authors are grateful to The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), for the financial support.

References

Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebinara K, Satoh N, Iwai H, Matsuoka N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimura Y, Nakao K. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 2000; 105(9):1243-52.

Amann RP. The use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundam Appl Toxicol* 1982; 2(1):13-26.

Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351:737-42.

Barash, IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabinting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137:3144-7.

Bhat GK, Sea TL, Olatinwo MO, Simorangkir D, Ford GD, Ford BD, Mann DR. Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse. *J Androl* 2006; 27(2):302-10.

Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12(3):318-20.

Clegg ED, Perreault D, Klinefelter GR. Assessment of male reproductive toxicity. In: Hayes AW, editor. *Principles and Methods of Toxicology*. Philadelphia: Taylor & Francis; 2001. p. 1263-1300.

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999; 60:216-22.

Fernandes GS, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF, Kempinas WG. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* 2007; 23(1):106-12.

Glander HJ, Lammert A, Paasch U, Glasow A, Kratzsch J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia* 2002; 34:227-33.

Hanafy S, Halawa FA, Mostafa FA, Mikhael NW, Khalil KT. Serum leptin correlates in infertile oligozoospermic males. *Andrologia* 2007; 39:177-80.

Haron MN, D'Souza UJA, Jaafar H, Zakaria R, Singh HJ. Exogenous leptin administration decreases sperm count and increases the fraction of abnormal sperm in adult rats. *Fertil Steril* 2010; 93(1):322-4.

Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004; 82(4):863-70.

Kempinas WG, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Narotsky MG, Perreault SD, Evenson DP, Ricker DD, Klinefelter GR. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod* 1998^b; 59(4):897-904.

Klinefelter GR, Laskey JW, Perreault SD, Ferrel J, Jeffay S, Suarez J, Roberts N. The ethane dimethanesulphonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis. *J Androl*, 1994^b, 15(4):318-27.

Klinefelter GR. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. 1st ed. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher; 2002. p.353-69.

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of Body Mass Index Values on Sperm Quantity and Quality. *J Androl* 2006; 27(3):450-2.

Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Maria Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 2005; 20(1):208-15.

Messinis IE, Milingos SD. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; 5 (1):52-63.

Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescue the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997; 138(3):1190-3

Robb GW, Amman RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978; 54(1):103-7.

Sone M, Osamura RY. Leptin and Pituitary. *Pituitary* 2001; 4(1-2):15-23.

Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188(1-2):9-13.

Tena-Sempere M, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol* 1999; 161:211-8.

Figure legends

Figure 1. Evolution of body weight (A) and food intake (B) during the 42 days of treatment, in control and leptin groups.

Figure 2. Sperm motility of rats from control and leptin treated groups. Values expressed by median. Mann-Whitney test.

Tables

Table 1. Body and organs weights of control and leptin treated rats

	Control	Leptin
Final body weight	465.01 ± 12.91	469.93 ± 12.72
<i>Absolute organs weights</i>		
Testis (g)	1.81 ± 0.07	1.79 ± 0.06
Epididymis (mg)	679.40 ± 22.65	696.39 ± 16.90
Vas deferens (mg)	94.56 ± 4.00	95.41 ± 2.45
Ventral prostate (mg)	544.63 ± 31.40	550.86 ± 29.14
Seminal vesicle full (g)	1.10 ± 0.10	1.12 ± 0.07
Seminal vesicle empty (mg)	477.66 ± 62.14	419.71 ± 24.82
Seminal vesicular secretion (mg)	626.80 ± 79.89	697.62 ± 53.79
<i>Relative organs weights</i>		
Testis (g/100g)	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.01
Epididymis (mg/100g)	146.45 ± 4.28	148.84 ± 3.80
Vas deferens (mg/100g)	20.40 ± 0.85	20.38 ± 0.52
Ventral prostate (mg/100g)	116.99 ± 5.93	117.25 ± 5.58
Seminal vesicle full (g/100g)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.01
Seminal vesicle empty (mg/100g)	82.25 ± 8.97	88.73 ± 3.56
<i>N</i>	12	12

Values expressed by mean ± S.E.M. Student t test.

Table 2. Sperm counts of control and leptin treated rats

	Control	Leptin
Sperm number in the testis ($\times 10^6$)	186.18 \pm 11.42	182.78 \pm 14.74
Daily sperm production ($\times 10^6$ /testis/day)	30.52 \pm 1.87	29.97 \pm 2.42
Sperm number in the caput/corpus epididymis ($\times 10^6$)	164.39 \pm 9.45	165.55 \pm 9.04
Sperm number in the cauda epididymis ($\times 10^6$)	289.34 \pm 15.76	296.75 \pm 19.11
<i>N</i>	12	12

Values expressed by mean \pm S.E.M. Student t test.

Table 3. Fertility parameters after *in utero* artificial insemination of control and leptin treated rats

	Control	Leptin
Body weight of dams (g) ^a	354.65 ± 7.68	336.16 ± 10.44
Uterus + fetuses weight (g) ^a	46.23 ± 3.79	28.96 ± 7.80
Number of corpora lutea ^a	13.25 ± 0.49	13.67 ± 0.58
Number of implantation sites ^a	10.13 ± 0.67	6.56 ± 1.56
Number of fetuses per litter ^a	9.25 ± 0.84	5.78 ± 1.65
Number of live fetuses per litter ^a	9.25 ± 0.84	5.56 ± 1.73
Fertility potential (%) ^b	76.79 (69.23 – 85.42)	46.67 (23.07 – 60)*
Preimplantation loss (%) ^b	23.21 (14.58 – 30,77)	53.33 (40 – 76.9)*
Postimplantation loss (%) ^b	9.13 (0 – 11.46)	14.29 (9.09 – 50)
<i>N</i>	8	9

^aValues expressed by mean ± S.E.M.

^bValues expressed by median (Q1 – Q3). The values in percentage were transformed in arc sen prior to statistical analysis

**p* < 0.05. Student t test.

Figures

Figure 1

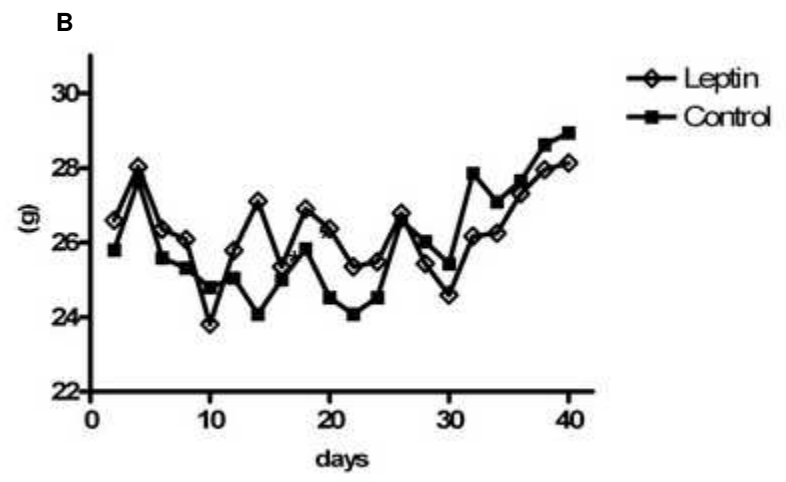
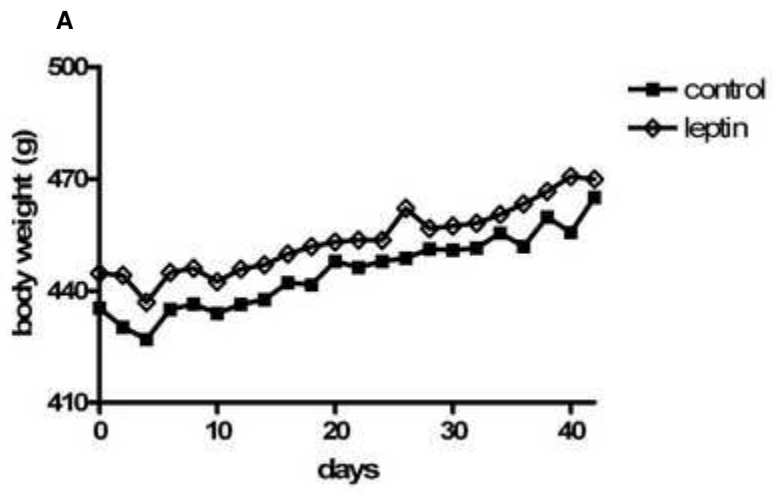
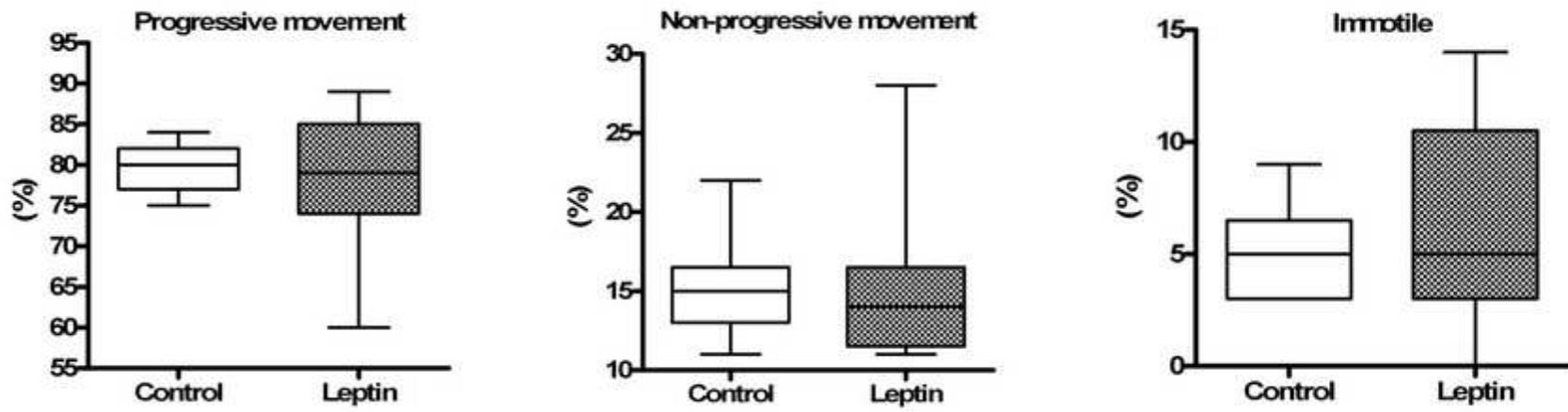


Figure 2



5. CONCLUSÕES FINAIS

A dieta hipercalórica rica em gordura usada no presente estudo provocou obesidade nos animais que a ingeriram, como demonstrado pelo aumento do índice de adiposidade associado ao aumento estatisticamente significativo do peso corpóreo. Esses animais apresentaram uma redução da qualidade espermática, que foi elucidada pela diminuição da porcentagem de espermatozóides com movimento progressivo sem que outros parâmetros espermáticos fossem alterados. Acompanhando essa alteração da motilidade, houve uma redução quantitativa da fertilidade dos animais obesos após a realização de inseminação artificial *in utero*. O tratamento de ratos não-obesos com leptina exógena também levou a uma redução significativa no potencial de fertilidade, como ocorrido nos animais obesos, sem, no entanto alterar a motilidade dos espermatozóides. Assim, conclui-se que a obesidade, segundo esse modelo experimental, altera a qualidade espermática e que provavelmente a leptina está relacionada com o prejuízo da fertilidade. Tendo-se em vista que a capacidade reprodutiva do rato é maior que a do homem, as alterações de fertilidade observadas neste estudo experimental podem ter implicações para a fertilidade humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- About DE, Pritchard C, Clegg NJ, Fergunson C, Dumpit R, Sikes RA, Nelson PS. Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate. *Genome Biol* 2003; 4(12): R79.
- Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril* 2008; 90(3):619-26.
- Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebinara K, Satoh N, Iwai H, Matsuoka N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimura Y, Nakao K. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J Clin Invest* 2000; 105(9):1243-52.
- Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351:737-42.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M: The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 2010; in press.
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabinting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137:3144-7.
- Bhat GK, Sea TL, Olatinwo MO, Simorangkir D, Ford GD, Ford BD, Mann DR. Influence of a leptin deficiency on testicular morphology, germ cell apoptosis, and expression levels of apoptosis-related genes in the mouse. *J Androl* 2006; 27(2):302-10.
- Björntorp P. Obesity. *Lancet* 1997; 350:423-6.
- Bray GA, York DA, Fisher JS. Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system. *Vitam Horm* 1989; 45:1-125.
- Bray GA. Obesity: historical development of scientific and cultural ideas. *Int J Obesity* 1990; 14:909-26.
- Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2583-9.

- Bueno AA, Oyama LM, Estadella D, Habitante BSS, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Lipid metabolism of monosodium glutamate obese rats after partial removal of adipose tissue. *Physiol Res* 2005; 54:57-65.
- Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010; 93(7):2222-31.
- Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12(3):318-20.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52: 198-236.
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334(5): 292-5.
- Cosentino MJ, Cokett AT. Structure and function of the epididymis. *Urol Res* 1986; 14(5): 229-40.
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999; 60:216-22.
- Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DA, Magoffin DA, Norman RJ. The in vivo and vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 2000; 141(6):1971-6.
- Esteve M, Rafecas I, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M. Effect of a cafeteria diet on energy intake and balance in Wistar rats. *Physiol Behav* 1994 Jul; 56(1):65-71.
- Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WD. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9:32.
- França LR, Avelar GF, Almeida FFL. Spermatogenesis and transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63: 300-18.

- Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995; 1(12):1311-14.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecruid H, Métayer S, Thimon V, Dacheux J L. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83:321-39.
- Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod* 2010; 82(1):94-104.
- Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A. Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(4):997-1000.
- Glander HJ, Lammert A, Paasch U, Glasow A, Kratzsch J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia* 2002; 34:227-33.
- Glover TD. The epididymis. In: Chisholm GD, Williams DI, editors. *Scientific Foundations of Urology*. London: William Heinemann Medical Books; 1982. p.544-55.
- Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle W. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008; 90(6):2222-25.
- Haron MN, D'Souza UJA, Jaafar H, Zakaria R, Singh HJ. Exogenous leptin administration decreases sperm count and increases the fraction of abnormal sperm in adult rats. *Fertil Steril* 2010; 93(1):322-4.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Epithelial developmental in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel)* 1996a; 155:81-93.
- Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR. Stromal developmental in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)* 1996b; 155:94-103.
- Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. 1st ed. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher; 2002. p.81-102.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. In: Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Rio de Janeiro; 2010.
- Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia* 2007; 39(1):22-7.
- Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004; 82(4):863-70.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of Body Mass Index Values on Sperm Quantity and Quality. *J Androl* 2006; 27(3):450-2.
- Loret de Mola JR. Obesity and its relationship to infertility in men and women. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2009 36(2):333-46.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S et al. Leptin levels in human and rodent: measurements of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1(11):1155-61.
- Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Maria Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod* 2005; 20(1):208-15.
- McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 1981; 2:35-49.
- Messinis IE, Milingos SD. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999; 5(1):52-63.
- Morris MJ, Velkoska E, Cole TJ. Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment. *Exp Physiol* 2005; 90(5):697-702.
- Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescue the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997; 138(3):1190-3
- Nammi S, Koka S, Chinnala KM, Boini KM. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. *Nutr J* 2004; 3:3.

- Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytán F, Souminen JS, Navarro VM, Casanueva FF, Aguilar E, Toppari J, Diéguez C, Tena-Sempere M. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci* 2004; 117:3247-57.
- Olivares A, Méndez JP, Zambrano E, Cárdenas M, Tovar A, Perera-Marín G, Ulloa-Aguirre A: Reproductive axis function and gonadotropin microheterogeneity in a male rat model of diet-induced obesity. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 166(2):356-64.
- Orgebin-Crist MC. Studies on the function of the epididymis. *Biol reprod* 1969; 1:155-75.
- Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M and Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update* 2003; 9(4):359-72.
- Pasquali R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas* 2006; 54(4):363-71.
- Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14(6):482-7.
- Pereira LO, Francischi RP, Lancha AH. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47(2):111-27.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sørensen TI, Olsen J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod* 2007; 22(6):1634-7.
- Reid BL, Cleand KW. The structure function of the epididymis. I-The histology of the rat epididymis. *Aust J Zool* 1957; 5(3):223-51.
- Robaire B, Henderson NA. Actions of 5 α - reductase inhibitors in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2): 190-5.
- Robker RL. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology* 2008; 15(2):115-21.
- Rodrigues JA, Favaretto ALV. Sistema reprodutor. In: Aires MM, editor. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 877-917.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer developmental. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11:225-324.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinhaikin AT, Clegg ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press; 1990.

- Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R, Ertel NH. Increased estrogen production in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48:633-8.
- Shaw MA, Rasmussen KM, Myers TR. Consumption of a high fat diet impairs reproductive performance in Sprague-Dawley rats. *J Nutr* 1997; 127(1):64-69.
- Sokol RZ. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. In: Sipes G, McQueen CA, Gandolfi AJ, editors. *Comprehensive toxicology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. p.87-98.
- Sone M, Osamura RY. Leptin and Pituitary. *Pituitary* 2001; 4(1-2):15-23.
- Soronen P, Laiti M, Torn S, Harkonen P, Patrikainen L, Li Y, Pulkka A, Kurkela R, Herrala A, Kaija H, Isomaa V, Vihko I. Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroids Biochem Mol Bio* 2004; 92:281-6.
- Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21:251-70.
- Tan HM, Gundlach AL, Morris JM. Exaggerated feeding response to central galanin-like peptide administration in diet-induced obese rats. *Neuropeptides* 2005; 39(3):333-6.
- Tena-Sempere M, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol* 1999; 161:211-8.
- Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, González LC, Diéguez C, Huhtaniemi I, Aguilar E. Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor Messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol* 2001; 170:413-23.
- Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188(1-2):9-13.
- Tortoriello DV, McMinn J, Chua SC. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology* 2004; 145(3):1238-47.
- Vianna CR, Coppari R. A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis. *Endocrinology* 2011; 152(1):11-8.
- Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MR. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir Bras* 2006; 21(6):425-9.

- West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity; lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(3):505S-512S
- WHO - World Health Organization: Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: World Health Organization, 1995 (WHO Technical Report Series, No. 854).
- WHO - World Health Organization: Part I: The problem of overweight and obesity. In World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO Technical Report Series, No. 894. 2000.
- WHO - World Health Organization. World health statistics 2010.
- Zieba DA, Amstalden M, Williams GL. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domest Anim Endocrinol* 2005; 29(1):166-85.

7. ANEXOS

7.1 RESULTADOS ADICIONAIS

Além dos resultados e avaliações apresentadas anteriormente nos dois artigos, foram realizadas as análises histopatológicas em testículo e epidídimo, bem como a avaliação estereológica do epidídimo. Estas análises foram realizadas nos animais expostos às diferentes dietas, padrão (DP) e hipercalórica (DH), durante o período de 15 semanas. Os resultados dessas análises não foram inclusos no artigo I por não terem apresentado diferenças entre os grupos.

A seguir apresenta-se a metodologia empregada nas referidas análises, bem como os resultados observados.

Material e Métodos

Análise histopatológica

Os testículos e epidídimos esquerdos foram colhidos, limpos e imersos em uma solução fixadora de Alfac (85% álcool, 10% formol e 5% ácido acético). Após uma pré-fixação de 4 horas, os órgãos foram removidos do fixador e recortados, retornando em seguida ao fixador. Após 24 horas, a solução foi substituída por álcool 80°, onde as peças permaneceram até o processamento, que consistiu na inclusão do material em Paraplast, obtenção de cortes com espessura de 7 μ m e coloração com hematoxilina e eosina, para posterior avaliação em microscópio de luz.

Avaliação estereológica

Além da inspeção histopatológica, foi realizada uma avaliação mais detalhada do epidídimo dos animais experimentais através de análise estereológica do órgão, segundo método descrito por Weibel (1963). Utilizou-se um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 120 pontos e 60 linhas, obtendo-se a proporção relativa dos compartimentos luminal, epitelial e intersticial. Foram analisados 10 campos por animal, na

região 6A da cauda proximal do epidídimo, com o auxílio de microscópio de luz, no aumento de 200X.

Análise estatística

Para comparação dos dados obtidos foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos dados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

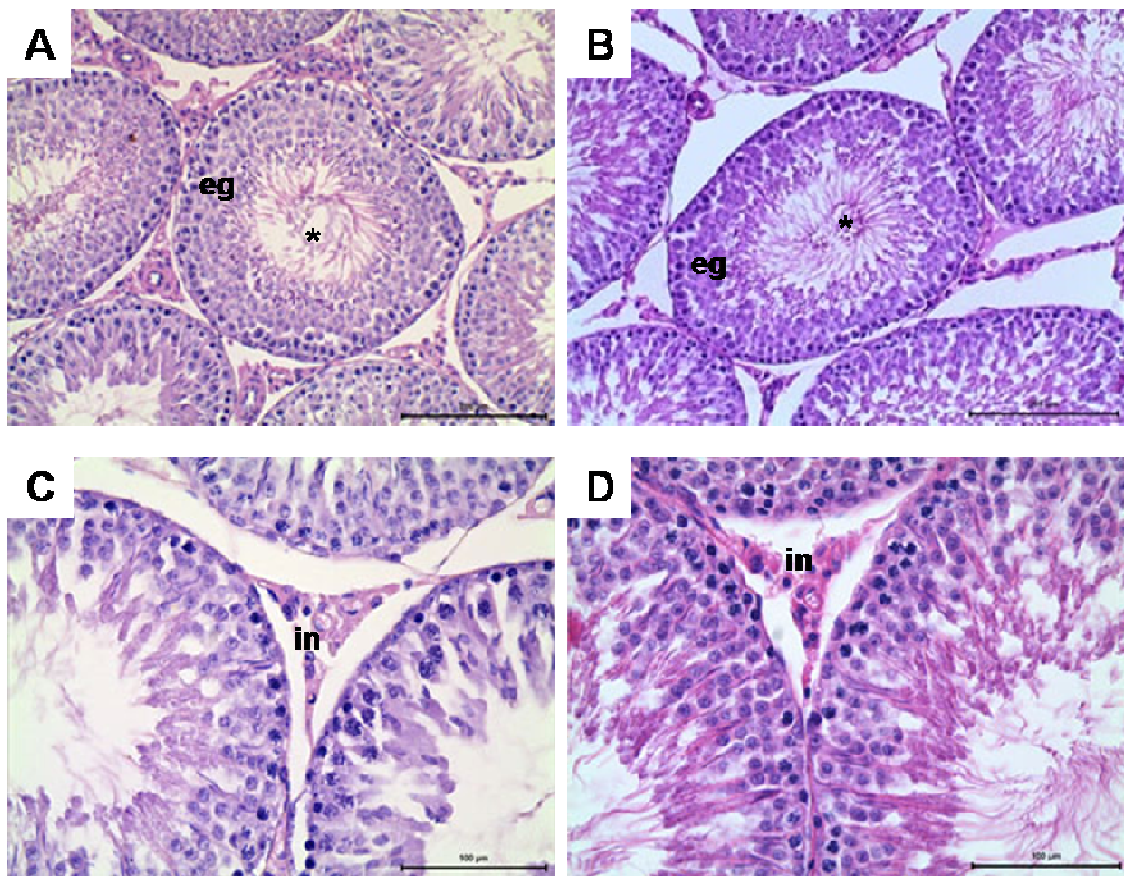
Análise Histopatológica

Os testículos são órgãos pares e ovóides, envolvidos por uma cápsula fibrosa composta por três camadas (túnica vaginal, túnica albugínea e túnica vascular). São constituídos de túbulos seminíferos, separados por tecido intersticial que contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células de Leydig e um número apreciável de mastócitos e macrófagos. Os túbulos seminíferos são circundados por membrana própria delgada e são formados por um epitélio seminífero constituído de células da linhagem germinativa e células de Sertoli.

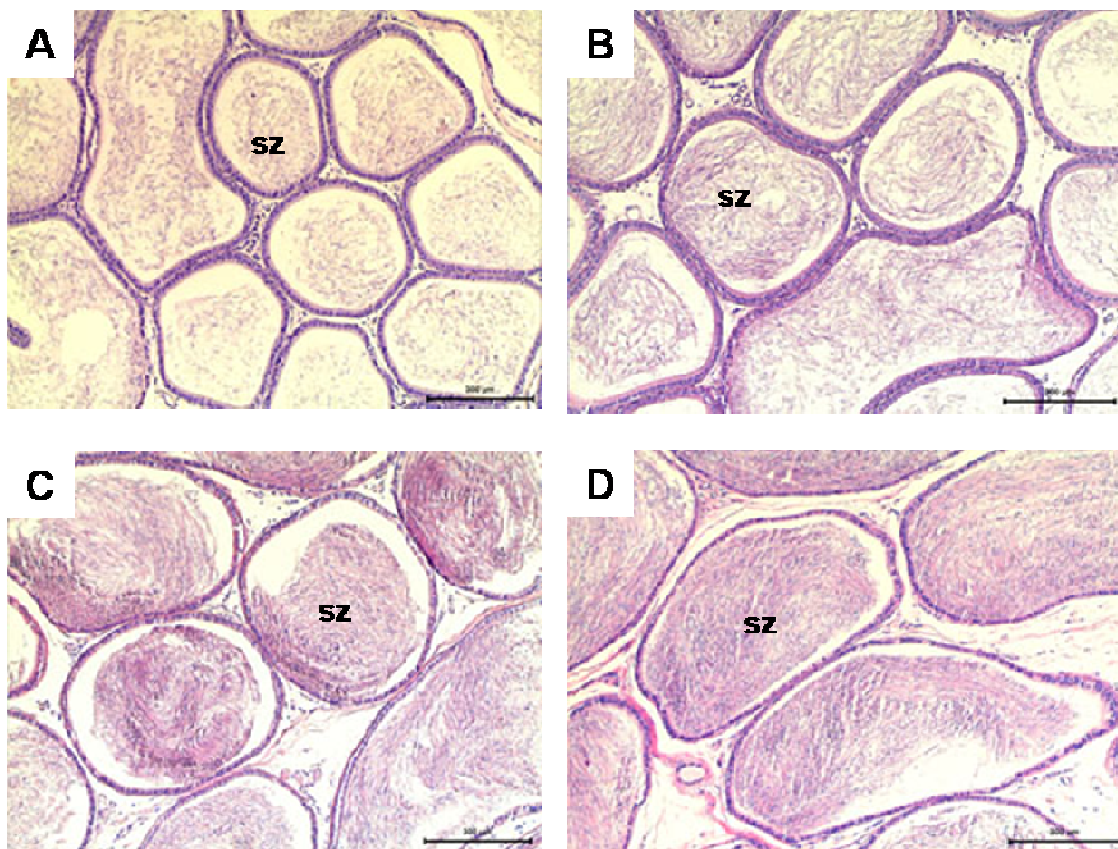
Observando-se panoramicamente o testículo dos ratos tratados, não foi possível identificar alterações tais como vacuolização do epitélio germinativo, esfoliação de células para o lúmen ou falta de alguma das camadas de células germinativas como consequência da exposição à dieta hipercalórica. No interstício a aparência das células de Leydig foi semelhante nos dois grupos experimentais.

O epidídimo é um órgão que consiste de uma extremidade expandida, a cabeça, seguida por uma porção mais estreita e alongada, o corpo, tendo na extremidade oposta a cauda. É constituído por um ducto único, extenso e enovelado, revestido internamente por um epitélio pseudo-estratificado, contendo diferentes tipos celulares: células principais, basais, apicais, claras e células estreitas, cuja morfologia e distribuição variam de acordo com a região do ducto. No presente estudo não foram observadas alterações morfológicas no epitélio e luz do ducto, bem como no interstício ductular, observáveis ao microscópio óptico, que pudessem ser atribuídas à exposição à dieta hipercalórica.

Prancha 1 – Fotomicrografias de cortes transversais de testículos de ratos. A e C) ratos expostos à dieta padrão (DP), B e D) ratos expostos à dieta hipercalórica (DH) Observar o aspecto normal do epitélio germinativo (eg), luz tubular (*) e tecido intersticial (in) nos dois grupos experimentais. A e B (200x), C e D (400x).



Prancha 2 – Fotomicrografias de cortes longitudinais da porção inicial da cabeça (A e B) e da cauda (C e D) de epidídimos de ratos. A e C ratos expostos à dieta padrão (DP), B e D ratos expostos à dieta hipercalórica (DH). Aspecto panorâmico mostrando o epitélio do ducto, luz ductular com espermatozóides (sz) e interstício (100x).



Avaliação estereológica

A avaliação estereológica não mostrou nenhuma alteração que possa ser atribuída à exposição à dieta hipercalórica (tabela 2)

Tabela 2 - Avaliação estereológica do epidídimo de ratos dos grupos expostos à dieta padrão (DP) e dieta hipercalórica (DH) após 15 semanas

	DP (n=8)	DH (n=8)
Epitélio (%)	12,80 [11,31-15,48]	12,50 [10,71-14,29]
Luz (%)	73,81 [69,64 – 77,23]	74,40 [70,83-78,57]
Interstício (%)	12,80 [10,12- 10,71]	12,80 [10,71-14,88]

Valores expressos em mediana [1ºquartil – 3ºquartil], Teste de Mann-Whitney.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "**Função reprodutiva em ratos machos obesos por consumo de dieta hipercalórica**":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:
CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, sob Protocolo(s) no 06/07.

** Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



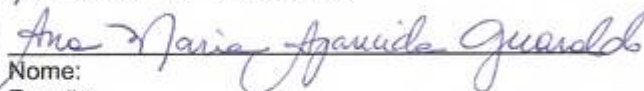
Aluno: Carla Dal Bianco Fernandez



Orientador: Wilma De Grava Kempinas

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido




Nome:
Função:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEEA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 06/07-CEEA, sobre "Função reprodutiva em ratos machos obesos por consumo de dieta hipercalórica", sob a responsabilidade de **WILMA DE GRAVA KEMPINAS**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de 27/04/2007.

Botucatu, 27 de abril de 2007.


Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA


NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA