

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

BÁRBARA RAMALHO LADEIRA CARDOSO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS  
ESPERMATOGÊNICOS DE RATOS WISTAR PORTADORES DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 INDUZIDA POR MEIO DE DIETA HIPERCALÓRICA**

**Belo Horizonte**

**2021**

**BÁRBARA RAMALHO LADEIRA CARDOSO**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS  
ESPERMATOGÊNICOS DE RATOS WISTAR PORTADORES DE DIABETES  
MELLITUS TIPO 2 INDUZIDA POR MEIO DE DIETA HIPERCALÓRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Gleide Fernandes de Avelar

Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Danusa Soares Dias

**Belo Horizonte**

**2021**

043

Cardoso, Bárbara Ramalho Ladeira.

Avaliação dos parâmetros espermatogênicos de ratos wistar portadores de diabetes mellitus tipo 2 induzida por meio de dieta hipercalórica [manuscrito] / Bárbara Ramalho Ladeira Cardoso. – 2021.

50 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Gleide Fernandes de Avelar. Coorientadora: Profa. Dra. Danusa Soares Dias.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Diabetes Mellitus Tipo 2. 3. Espermatogênese. 4. Células Intersticiais do Testículo. 5. Testosterona. I. Avelar, Gleide Fernandes de. II. Dias, Danusa Soares. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**

**BÁRBARA RAMALHO LADEIRA CARDOSO**

345/2021  
entrada  
1º/2019  
2019690009

Às **quatorze horas** do dia **31 de agosto de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ESPERMATOGÊNICOS DE RATOS WISTAR PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 INDUZIDA POR MEIO DE DIETA HIPERCALÓRIA**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Gleide Fernandes de Avelar**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA
Dra. Danusa Dias Soares	UFMG	APROVADA
Dr. André Gustavo de Oliveira	UFMG	APROVADA
Dra. Giselle Foureaux	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de agosto de 2021.**

Dr<sup>a</sup>. Gleide Fernandes de Avelar (Orientadora) \_\_\_\_\_  
Gleide Fernandes de Avelar:03457412693  
Assinado de forma digital por Gleide Fernandes de Avelar:03457412693  
Dados: 2021.08.31 21:56:59 -03'00'

Dr<sup>a</sup>. Danusa Dias Soares (Coorientadora) \_\_\_\_\_  
Danusa Dias Soares  
Assinado de forma digital por Danusa Dias Soares  
Dados: 2021.08.31 20:46:11 -03'00'

Dr. André Gustavo de Oliveira \_\_\_\_\_  
André Gustavo de Oliveira

Dr<sup>a</sup>. Giselle Foureaux \_\_\_\_\_

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e o carimbo do Coordenador

Ao meu pai, por ser minha base.

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gleide Fernandes de Avelar e coorientação da Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danusa Soares Dias, e com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com a minha jornada e o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, agradeço:

Ao meu pai, João, pelo apoio e amor incondicional;

Ao meu Irmão André que por muitas vezes foi meu abrigo;

À professora Doutora Orientadora e Tutora Gleide Fernandes de Avelar pela orientação, ensinamentos, confiança e apoio;

À professora Danusa pela oportunidade de expandir meus conhecimentos.

Aos professores Samyra e Guilherme por sempre colaborarem para o meu desenvolvimento;

A técnica Mara Livia pelo companheirismo, carinho e apoio;

Aos meus colegas de laboratório por me proporcionarem um ambiente de trabalho saudável e cooperativo. Em especial agradeço ao André Figueiredo, que a amizade é fundamental, à Talita Farias, Natália Wnuk, Luiza Colen e Rafael Leite, que parceria transcende o ambiente acadêmico. Obrigada pelo carinho e incentivo;

A todos os membros do Departamento de Morfologia e do programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais;

Aos colegas do LAFISE, em especial ao Bruno Melo e Aline;

À família Maroso Irigaray, que mesmo distante fisicamente me acolheram sempre com muito amor. Em especial a Paula, minha amiga, que nunca deixou de me incentivar e participou ativamente de todas as minhas conquistas;

Ao meu amigo Sul-Matogrossense Anderson Escobar, que em momentos difíceis fez meus dias mais leves;

As minhas amigas Anna Paola, Morgana, Lara Davoli e Ludmila Cioffi pela parceria de longos anos;

À Flávia Cioffi por ser luz em meu caminho;

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições;

Ao Dr. Arthur Parreiras Gomes, que há anos tem contribuído para a minha evolução;

As agencias financiadoras (CAPES, CNPq e FAPEMIG) pelo suporte financeiro e bolsa concedida;

Aos meus familiares Maria Beatriz e Rafael, obrigada pelo apoio;

Ao meu afilhado Henrique que me ensina sobre o amor mais puro que conheço;

Muito obrigada!



“O que se perde é infinitamente menor do que aquilo que se ganha. Você se perde nesta forma que você tem agora, mas ao mesmo tempo compreende que você é algo infinitamente maior. Você é o universo inteiro.”

(Jostein Gaarder)

## RESUMO

Diabetes mellitus é uma doença crônica relacionada a distúrbios metabólicos como, por exemplo, hiperglicemia devido à resistência periférica e/ou baixa produção de insulina. DM tipo 1 é uma doença autoimune caracterizada por uma perda de função das células  $\beta$ -pancreáticas em secretar insulina. Já a DM tipo 2 tem correlação com o estilo de vida sedentário, dietas hipercalóricas, obesidade e estresse. A DM tipo 2 tem sido diagnosticada cada vez mais cedo na população e, de acordo com a OMS, em 2014 havia cerca de 442 milhões de pessoas diabéticas no mundo. Então sabendo-se que a diabetes tem consequências sistêmicas, há uma preocupação em relação a fertilidade masculina, uma vez que já foi observado que homens diabéticos apresentam parâmetros seminais alterados e redução dos níveis de testosterona levando à infertilidade. Estudos prévios descrevem alterações na espermatogênese e morfofuncionais em espermatozoides. Porém, em grande parte, os dados encontrados são a partir da indução medicamentosa através da estreptozotocina. Entretanto, uma vez que a evolução clínica da diabetes está associada a fatores comportamentais, como alimentação hipercalórica, nosso projeto investigou os efeitos da DM tipo 2 utilizando um protocolo de dieta que é capaz de mimetizar a fisiopatologia da doença. Assim, ratos da linhagem Wistar foram tratados com dieta hipercalórica por período de 30 e 90 dias. Os efeitos da dieta hipercalórica sobre a glicemia, e parâmetros biométricos nos animais de 30 dias não apresentaram diferença significativa, embora nos animais de 90 dias a glicemia e peso corporal estavam significativamente aumentados, resultando na redução do IGS neste grupo. Apesar de não haverem alterações marcantes na organização do parênquima testicular, as células de Leydig responderam de maneira dicotômica às intervenções de 30 e 90 dias. Hiperplasia compensatória, caracterizada por células com menor volume individual, representou a resposta das células de Leydig frente à intervenção por 30 dias. Por outro lado, a intervenção prolongada com dieta hipercalórica gerou uma resposta das células esteroidogênicas típica de hipertrofia, onde as células aumentaram seu volume individual, principalmente no compartimento citoplasmático. Apesar do número de células estar reduzido, as adaptações volumétricas marcaram a tentativa de manutenção da homeostase da síntese dos esteroides sexuais. Ademais, a expressão da enzima 3 $\beta$ -HSD, que no grupo 30 dias foi menor ( $p < 0,05$ ) já estava semelhante ao controle no grupo 90 dias.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus tipo 2, espermatogênese, células de Leydig, testosterona.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease related to metabolic disorders such as hyperglycemia due to peripheral resistance and/or low insulin production. Type 1 DM is an autoimmune disease characterized by a loss of function of pancreatic  $\beta$ -cells to secrete insulin. Type 2 DM is correlated with a sedentary lifestyle, high-calorie diets, obesity and stress. Type 2 DM has been diagnosed earlier in the population and, according to the WHO, in 2014 there were about 442 million people with diabetes in the world. So, knowing that diabetes has systemic consequences, there is a concern about male fertility, since it has been observed that diabetic men have altered seminal parameters and reduced testosterone levels leading to infertility. Previous studies describe spermatogenesis and morphofunctional changes in sperm. However, in large part, the data found are from drug induction through streptozotocin. However, since the clinical course of diabetes is associated with behavioral factors such as hypercaloric eating, our project investigated the effects of type 2 DM using a diet protocol that is able to mimic the pathophysiology of the disease. Thus, Wistar rats were treated with a high-calorie diet for a period of 30 and 90 days. The effects of the high-calorie diet on blood glucose and biometric parameters in 30-day-old animals did not show significant difference, although in 90-day-old animals blood glucose and body weight were significantly increased, resulting in a reduction in the IGS in this group. Although there are no marked changes in the organization of the testicular parenchyma, Leydig cells responded in a dichotomous way to the 30- and 90-day interventions. Compensatory hyperplasia, characterized by cells with smaller individual volume, represented the response of Leydig cells to intervention for 30 days. On the other hand, prolonged intervention with a hypercaloric diet generated a steroidogenic cell response typical of hypertrophy, where the cells increased their individual volume, mainly in the cytoplasmic compartment. Despite the reduced number of cells, volumetric adaptations marked the attempt to maintain homeostasis in the synthesis of sex steroids. Furthermore, the expression of the 3 $\beta$ -HSD enzyme, which was lower in the 30-day group ( $p < 0.05$ ), was already similar to the control in the 90-day group.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, spermatogenesis, Leydig cells, testosterone.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da via esteroidogênica.....	19
Figura 2 – Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos tratados com dieta padrão (A e B) e hipercalórica (C e D), por período de 30 dias.....	32
Figura 3 – Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos tratados com dieta padrão (A e B) e hipercalórica (C e D), por período de 90 dias.....	34
Figura 4 – Parâmetros morfométricos, estereológicos e funcionais das células de Leydig de ratos tratados com dieta padrão e hipercalórica, por período de 30 dias.....	38
Figura 5 – Parâmetros morfométricos, estereológicos e funcionais das células de Leydig de ratos tratados com dieta padrão e hipercalórica, por período de 90 dias.....	39
Figura 6 – Modelo para a resposta celular e mecanismo compensatório das células de Leydig em ratos portadores de T2DM, desenvolvido a partir de dieta hipercalórica.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Números de animais utilizados para as diferentes análises e tratamento estatístico.....	25
Tabela 2 - Dados de glicemia e biométricos de Ratos Wistar tratados durante 30 e 90 dias com dieta hipercalórica e seus respectivos controles tratados com dieta padrão.....	31
Tabela 3 – Componentes do parênquima testicular de Ratos Wistar alimentados com dieta padrão (controle) e hipercalórica (tratado) durante 30 dias.....	33
Tabela 4 – Componentes do parênquima testicular de Ratos Wistar alimentados com dieta padrão (controle) e hipercalórica (tratado) durante 90 dias.....	35
Tabela 5 – Dados morfométricos do túbulo seminífero de Ratos Wistar alimentados com dieta padrão (controle) e hipercalórica (tratado), durante 30 e 90 dias.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celcius

µm: micrômetros

µm<sup>3</sup>: micrômetros cúbicos

3β – HSD: 3β – Hidroxiesteróide desidrogenase

AC: Anticorpo

CEBIO: Centro de Bioterismo

DAB: Diaminobenzidina

dL: decilitros

dpi: dots per inch

EEFFTO: Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

FSH: Hormônio folículo estimulante

g: gramas

GLUT: transportador de glicose

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

HFD: dieta hiperlipídica

HOMA-IR: Homeostasis model assessment

IGS: Índice gonadossomático

Kcal: quilocaloria

LH: Hormônio luteinizante

min: minutos

mL: mililitros

ng: nanogramas

PFA: Paraformaldeído

rpm: rotações por minuto

T1DM: Diabetes Mellitus tipo 1

T2DM: Diabetes Mellitus tipo 2

v/v: volume por volume

# Sumário

<b>1. Introdução e Revisão de Literatura</b> .....	16
1.1. Estrutura testicular.....	16
1.2. Espermatogênese e sua regulação.....	16
1.3. Diabetes mellitus.....	19
1.4. Diabetes mellitus tipo 2 e espermatogênese.....	20
<b>2. Objetivos</b> .....	22
2.1. Objetivos específicos.....	22
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Indução do DM tipo 2 por meio de dieta hipercalórica .....	23
3.3. Coleta e processamento dos testículos.....	23
3.4. Histomorfometria testicular.....	24
<b>3.4.1. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero</b> .....	24
<b>3.4.2. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo</b> .....	26
<b>3.4.3. Parâmetros das células de Leydig</b> .....	26
3.5. Imunohistoquímica .....	28
3.6. Análise da intensidade de pixels .....	28
3.7. Dosagem de testosterona .....	29
3.8. Análise estatística.....	29
<b>4. Resultados</b> .....	29
4.1 Efeitos do tratamento realizado durante 30 e 90 dias com dieta hipercalórica sobre a concentração da glicose periférica e parâmetros de biometria corporal e testicular de ratos. .....	29
4.2 Efeitos do tratamento realizado durante 30 e 90 dias com dieta hipercalórica sobre a composição do parênquima testicular de ratos. ....	30
<b>4.2.1. Componentes dos compartimentos tubular e intertubular de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 30 dias.</b> .....	30
<b>4.2.2. Componentes dos compartimentos tubular e intertubular de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 90 dias.</b> .....	32
<b>4.2.3 Avaliação morfométrica do compartimento tubular de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 30 e 90 dias.</b> .....	34
<b>4.2.4 Morfometria, estereologia e função das células de Leydig de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 30 e 90 dias.</b> .....	35
<b>5. Discussão</b> .....	39
<b>6. Conclusão</b> .....	42
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	44



## **1.Introdução e Revisão de Literatura**

### **1.1. Estrutura testicular**

Os testículos são órgãos pares que, na maioria dos mamíferos, estão situados no escroto (Setchell e Breed, 2006). São revestidos por uma camada de tecido conjuntivo denso denominada túnica albugínea. Esta apresenta um espessamento formando o mediastino, do qual partem septos dividindo o parênquima dos testículos em lóbulos testiculares (Russell *et al.*, 1990). No interior dos lóbulos são encontradas estruturas com aspecto convoluto, os túbulos seminíferos, local onde ocorre a espermatogênese. Assim, o parênquima testicular é dividido morfofuncionalmente em dois compartimentos: o tubular e o intertubular. O compartimento tubular é formado pela túnica própria; epitélio seminífero, constituído pelas células somáticas de Sertoli e células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento; e o lume tubular, formado a partir da secreção do fluido testicular pela célula de Sertoli. No compartimento intertubular são encontradas células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos e linfáticos (Russell *et al.*, 1990; Cooper e Yeung, 2006; Sullivan *et al.*, 2007).

### **1.2. Espermatogênese e sua regulação**

A espermatogênese é um processo cíclico e organizado, que ocorre no interior dos túbulos seminíferos. A fim de melhor compreendê-lo, a espermatogênese pode ser dividida em três fases (França e Russell, 1998; Hess e França, 2007). A primeira etapa denominada espermatogonial ou mitótica tem como principal função a proliferação das espermatogônias do tipo A indiferenciadas, resultando na renovação de sua população bem como em células comprometidas com a formação de gametas. Essa fase se estende até que as espermatogônias do tipo B deem origem aos espermatócitos primários. A segunda etapa chamada espermatocitária é caracterizada pela multiplicação, recombinação e a segregação do material genético. Então, neste momento, ocorre a primeira divisão meiótica, dando origem aos espermatócitos secundários (De Rooij e Griswold, 2012). Os espermatócitos secundários sofrem a segunda divisão meiótica originando assim as espermátides que, conseqüentemente, são células haploides. Com isso inicia-se a terceira fase da

espermatogênese: a espermiogênese. Nessa etapa as células sofrem grande diferenciação com a formação do acrossoma, migração dos centríolos para o desenvolvimento do flagelo, condensação e alongamento do núcleo. Parte do citoplasma é perdido formando assim os espermatozoides e os corpos residuais (Russel *et al.*, 1990).

O processo espermatogênico é suportado e regulado pelas células de Sertoli e Leydig, respectivamente. Nos mamíferos sexualmente maduros, as células de Sertoli envolvidas com a manutenção da espermatogênese estão completamente diferenciadas e mantêm uma população estável. Dentre as múltiplas funções das células de Sertoli, pode-se destacar: sustentação física e nutricional das células espermatogênicas, mediação da ação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e testosterona, participação na formação da barreira hematotesticular (barreira da célula de Sertoli, as junções de oclusão), participação na espermição assim como na fagocitose dos corpos residuais e células apoptóticas (Hess e França, 2005). Outra função das células de Sertoli é a secreção de fluido tubular, que além de conter substâncias fundamentais para a maturação do espermatozoide, atua como um meio de transporte dessa célula ao longo do lume em direção ao ducto epididimário (Hess e França, 2005).

As células de Leydig têm como principal função a produção de esteróides sexuais, entre eles a testosterona. A capacidade esteroidogênica desta célula fica evidente a partir da observação da distribuição abundante do retículo endoplasmático liso no compartimento citoplasmático, além da presença de mitocôndrias com cristas tubulares e gotas lipídicas (Russell *et al.*, 1996). Essa produção está intrinsecamente ligada ao eixo hipotálamo – hipófise – gônadas (HHG), uma vez que o hormônio GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) secretado pelo hipotálamo estimula a síntese na adenohipófise, de ambas gonadotrofinas, isto é, o FSH e o hormônio luteinizante (LH). Este hormônio, de natureza glicoproteica, tem seus receptores alocados na membrana das células de Leydig, aos quais se ligam e disparam uma cascata de sinalização que culmina com a translocação do colesterol para a membrana interna da mitocôndria (Rochira *et al.*, 2006; Zirkin e Papadopoulos, 2018). A partir da internalização do colesterol, dar-se-á início a uma série de eventos enzimáticos

ainda na mitocôndria, que resulta na formação da pregnenolona, substrato que é direcionado ao REL onde será convertido pelas enzimas hidroxilases em testosterona ou estradiol (figura 1, extraída de Zirkin e Papadopoulos, 2018; adaptada).

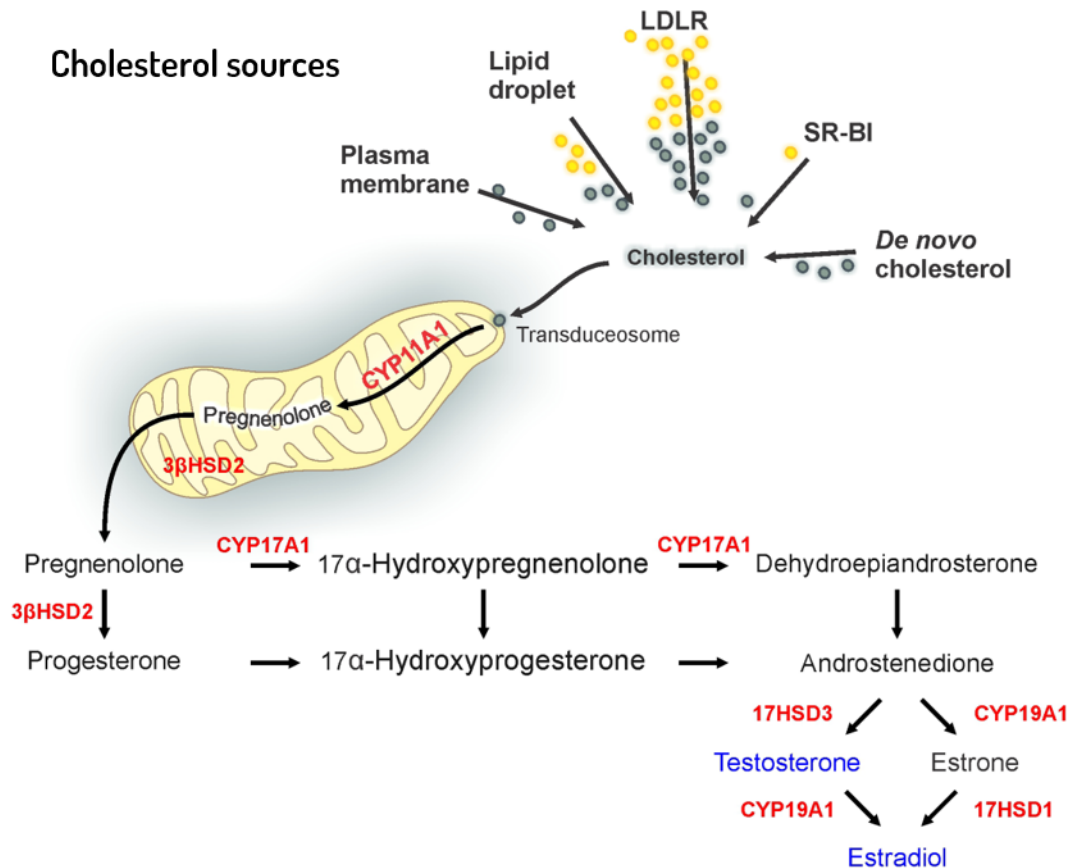


Figura 1 – Representação esquemática da via esteroidogênica. Nas células de Leydig, os andrógenos são derivados do colesterol. O colesterol utilizado na estoidogênese deriva da síntese *de novo* (*de novo cholesterol*), lipoproteínas (LDLR), gotículas de lipídios (*lipid droplet*) ou membrana plasmática (*plasma membrane*). Lipoproteínas, LDL (por meio da via do receptor de LDL), HDL (por meio da via SR-BI) e gotículas de lipídios contêm colesterol esterificado (amarelo) que pode ser usado na esteroidogênese após desesterificação (verde). O colesterol é importado para as mitocôndrias através de um grande complexo de proteínas, o transduceossomo (*transduceosome*), composto de proteínas mitocondriais e citosólicas. O colesterol atinge membrana mitocondrial interna, onde é metabolizado à pregnenolona pela CYP11A1. A pregnenolona (*pregnenolone*) é convertida pelo 3beta-HSD localizada na mitocôndria e no retículo endoplasmático liso. Metabolismo subsequente para andrógenos e seus metabólitos é por meio das enzimas CYPs e HSDs cuja a expressão é específica das células de Leydig. *Progesterone*, progesterona; *Testosterone*, testosterona; *Dehydroepiandrosterone*, dehidroepiandrosterona; *Androstenedione*, androstenediona. Extraído de Zirkin e Papadopoulos, 2018. Adaptação.

Nesse contexto da esteroidogênese é importante destacar o papel dos macrófagos presentes no compartimento intertubular. Apesar de serem reconhecidos como células do sistema imune inato e por sua capacidade fagocitária, homeostase e organização tecidual (Tauber, 2003), nos testículos os

macrófagos são as células de defesa em maior quantidade e exercem funções específicas no processo da espermatogênese (Winnall *et al.*, 2013; Indumathy *et al.*, 2020). Contribuem na manutenção do ambiente de imunoprivilégio do testículo, através da produção de citocinas imunossupressoras e anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  e ainda, controlando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Fijak e Meinhardt, 2006; Shechter *et al.*, 2013). Quanto a sua participação na síntese dos esteroides sexuais, os macrófagos são responsáveis pela secreção de diversos fatores para as células de Leydig como, por exemplo, o 25-hidroxicolesterol (Nes *et al.*, 2000; Lukyanenko *et al.*, 2001; Hutson, 2006). Essa interação com as células de Leydig, além de funcional é também física, uma vez que as membranas dos macrófagos e células de Leydig estão conectadas através de digitações intercitoplasmáticas (Hutson, 1992; Lara *et al.*, 2018a). As digitações são compostas por finas projeções citoplasmáticas que têm como principal função a comunicação entre os dois tipos celulares (Giannessi, 2005; Hutson, 2006, Lara *et al.*, 2018a). Além disso, em condições de homeostase observa-se um macrófago para cada três a cinco células de Leydig, em ratos (Bergh, 1985) enquanto em camundongos essa proporção é maior, chegando à 50% da população de células esteroideogênicas (Oliveira *et al.*, 2020a).

### 1.3. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) é uma doença de origens múltiplas, envolvendo aspectos genéticos e estilo de vida (AD Association *et al.*, 2002) e é caracterizada, principalmente, por hiperglicemia devido a não produção e/ou resistência periférica à insulina (WHO, 1999). DM tipo 1 é uma doença crônica, autoimune e inflamatória, onde o sistema imune destrói as células beta pancreáticas, responsáveis pela produção do hormônio insulina. Com o comprometimento dessas células a secreção da insulina é deficiente e pode chegar a ser ausente, ocasionando a não internalização da glicose e caracterizando um quadro de hiperglicemia (AD Association *et al.*, 2002). Portanto, pacientes portadores do DM tipo 1 (T1DM) são dependentes de insulina, ou seja, ocorre a necessidade de administração do hormônio exógeno (WHO, 1999). A DM tipo 2 (T2DM) é uma doença associada ao estilo de vida sedentário, dieta rica em lipídios e carboidratos, obesidade e estresse. É

caracterizada por uma resistência à insulina, inabilidade das células em responderem ao comando do hormônio, ou combinada com a sua baixa secreção pelo pâncreas (Vazquez *et al.*, 2007; Ramachandran *et al.*, 2010; WHO, 2013). Como consequência, se estabelece o quadro hiperglicêmico seguido pela perda gradual das células beta-pancreáticas (Barsiah *et al.*, 2019). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (2016) foi estimado que em 2014, havia aproximadamente 442 milhões de pessoas diabéticas no mundo, sendo 62 milhões no continente americano.

#### **1.4. Diabetes mellitus tipo 2 e espermatogênese**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2010), a infertilidade é caracterizada pelo insucesso de estabelecer uma gestação após 12 meses ininterruptos de tentativas. Apesar das causas da infertilidade serem diversas, os fatores relacionados com o estilo de vida e alimentação tem grande impacto na gametogênese (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017).

O diagnóstico de T2DM aumentou significativamente na população de indivíduos jovens, uma vez que o consumo excessivo de dietas não saudáveis, associado a um estilo de vida sedentário são hábitos que vem sendo observados em crianças, adolescentes e jovens adultos. Diante disso, o desenvolvimento precoce de alterações metabólicas crônicas tem levantando preocupações relacionadas com infertilidade e saúde reprodutiva dos pacientes do sexo masculino (Rato *et al.*, 2014).

Nesse contexto, vários sinais de comprometimento da fertilidade têm sido relatados em pacientes diabéticos, entre eles diminuição dos parâmetros seminais, redução dos níveis de testosterona, presença de células germinativas mais iniciais no sêmen (Jangyr e Jain, 2014). Os mecanismos com os quais essas alterações ocorrem vem sendo alvo de inúmeros estudos (Barkabi-Zanjani *et al.*, 2020), sendo a inibição do eixo HHG apontada como um dos principais. Contudo, ainda não está totalmente esclarecido se a hiperinsulinemia ou a resistência à insulina (ou ainda, a combinação de ambos) sejam responsáveis pela supressão do eixo HHG nos pacientes T2DM (Costanzo e Knoblovits, 2016).

Assim como para outras patologias humanas, o avanço do conhecimento acerca da T2DM é dependente da utilização de modelos animais. Nesse sentido, são diversificados os protocolos para preparação dos modelos animais para DM, sendo a indução por via medicamentosa frequentemente utilizada. Entre os fármacos utilizados para essa finalidade, a estreptozotocina está presente em um grande número de protocolos, seja aqueles inteiramente farmacológicos ou na associação com a manipulação da dieta. Entretanto, a estreptozotocina é uma substância citotóxica, com especial afinidade pelas células beta pancreáticas de mamíferos (Furman, 2015). Nessas condições experimentais DM leva a infertilidade masculina devido a alterações na espermatogênese, alterações morfofuncionais dos espermatozoides, metabolismo alterado da glicose na célula de Sertoli, alteração na barreira hematotesticular, redução na síntese e secreção de testosterona (Scarano *et al.*, 2006; La Vignera *et al.*, 2012, Alves *et al.*, 2013; El Baba *et al.*, 2013; Jangyr e Jain, 2014; Omolaoye *et al.*, 2018).

Entretanto, a condição clínica de T2DM em pacientes humanos é determinada pela ingestão de dietas hipercalóricas e a não prática de atividades físicas. Assim, a fim de estabelecer um modelo animal que fosse capaz de mimetizar os eventos metabólicos que decorrem de T2DM adquirida dessa forma, protocolos baseados exclusivamente em dietas associando altas concentrações de lipídeos e carboidratos têm sido propostos. Melo *et al.* (2021) demonstraram a eficiência da associação de dieta com alto teor de lipídios equivalente ao consumido diariamente por seres humanos, associada à ingestão de frutose diluída na água por 30 dias, em promover alterações metabólicas compatíveis à resistência à insulina em ratos Wistar. Portanto, este modelo animal, que reproduz a etiologia da doença humana possibilita investigar, livre de possíveis vieses devido à indução farmacológica, os fenômenos associados ao estabelecimento da infertilidade masculina em indivíduos portadores de T2DM.

Diante disso, estabelecemos uma colaboração com o Laboratório de Fisiologia do Exercício, onde foi desenvolvido o modelo de rato T2DM baseado em dieta hipercalórica. Este modelo, que apresenta resistência periférica à insulina, hiperglicemia e índice de HOMA compatível com DM2 possibilitou

avaliar os parâmetros espermatogênicos, no contexto do distúrbio metabólico, sem uma possível interferência farmacológica.

## **2. Objetivos**

Avaliar dos parâmetros histomorfométricos dos testículos e investigar a função das células de Leydig em ratos Wistar adultos após a intervenção com dieta hipercalórica pelos períodos de 30 e 90 dias.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Determinar os valores da massa corporal e testicular dos ratos tratados ou não com dieta hipercalórica durante 30 e 90 dias;
- Determinar como o índice gonadossomático (IGS);
- Avaliar histomorfometricamente o testículo (tratado e controle), com ênfase nos seguintes parâmetros:
  - A) Determinação da proporção volumétrica e do volume ocupado pelos diferentes componentes do parênquima testicular;
  - B) Cálculo da altura do epitélio, diâmetro e comprimento total dos túbulos seminíferos;
  - C) Cálculo da área dos túbulos seminíferos, epitélio germinativo e lúmen;
- Calcular os parâmetros volumétricos e o número de Leydig;
- Avaliar a capacidade funcional das células de Leydig através da avaliação da expressão da enzima esteroidogênia 3beta-HSD;
- Dosar os níveis periféricos de testosterona.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1. Animais**

Ratos machos da linhagem Wistar (n = 40) com aproximadamente 8 semanas de idade foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciência Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram alocados em caixas coletivas (4 ratos por caixa) de polipropileno (41 x 34 x 16 cm) e durante sete dias permaneceram no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício - LAFISE - EEFFTO para adaptação ao ambiente, recebendo água e ração padrão (Presence®) *ad libitum*. O macroambiente foi mantido com fotoperíodo (ciclo claro/escuro) de 14/10 horas (ciclo claro iniciando às 5 horas e ciclo escuro às 19 horas), controlado por

temporizador *Brasfort*® e temperatura variando entre 20 e 24°C durante todo o protocolo experimental. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFMG (Protocolo CEUA 110/2016) e seguiram os princípios éticos da experimentação animal de acordo com as resoluções normativas do CONCEA/MCTIC.

### **3.2. Indução do DM tipo 2 por meio de dieta hipercalórica**

Após o período de adaptação, os ratos foram balanceados por meio da massa corporal em dois grupos, os quais receberam dieta padrão (Controle) e dieta hipercalórica, constituída pela ração hiperlipídica (HDF) em associação a frutose diluída na água (Tratado), *ad libitum*. Assim, os animais foram tratados por trinta e noventa dias, conforme protocolo validado por Melo e colaboradores (2021) para o desenvolvimento de resistência periférica a insulina e hiperglicemia (Diabetes mellitus tipo 2). Antes da introdução da dieta, sangue foi coletado pela veia da cauda para verificação da condição normoglicêmica dos animais.

A composição da HFD seguiu as seguintes proporções: 78% correspondente ao farelo de ração padrão (moída) e 22% de gordura saturada. Brevemente, 500g de HFD era composta por 390g de ração padrão moída, 110g de gordura vegetal (PRIMOR®) e 40g de polvilho azedo (PACHÁ®). A massa obtida foi modelada em *pellet* e assada em forno elétrico à 180°C por duas horas (Melo et al., 2021). A fim de complementar a dieta hipercalórica, os cristais de frutose (SYNTH®) foram diluídos em água resultando em uma solução final homogênea a 30% p/v e ofertadas *ad libitum* durante 30 e 90 dias.

### **3.3. Coleta e processamento dos testículos**

No 31º e 91º dia após o início da dieta (6 horas após a última alimentação), quando contavam com aproximadamente 95 e 155 dias de idade, respectivamente, os ratos foram pesados e então eutanasiados por meio de decapitação em guilhotina apropriada para a espécie, sem a utilização de sedação/anestesia prévia. Os testículos foram retirados, pesados e o índice gonadossomático (IGS) [(massa total dos testículos / massa corporal) X 100] foi calculado para cada animal. Posteriormente, as gônadas foram fixadas por imersão em glutaraldeído 4% v/v em tampão fosfato 0,05M e também em paraformaldeído (PFA) 4% v/v, por 24 horas à 4°C. Após desidratação em



sequência crescente de álcoois, conforme rotina histológica praticada no Laboratório de Biologia Celular, os órgãos fixados em glutaraldeído foram incluídos em resina glicol metacrilato, sendo obtidas secções de 4µm de espessura, coradas com azul de toluidina 1% borato de sódio e destinadas aos estudos histomorfométricos. Os testículos fixados em PFA, após desidratação e diafanização, foram incluídos em Paraplast® dos quais foram obtidas secções com 5µm e utilizadas em ensaios de imunohistoquímica. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck) e analisadas ao microscópio óptico Olympus BX60.

### 3.4. Histomorfometria testicular

A fim de facilitar a compreensão da distribuição do número amostral, a tabela 1 apresenta o quantitativo de animais utilizados nas diferentes avaliações realizadas no presente estudo.

Tabela 1 – Números de animais utilizados para as diferentes análises e tratamento estatístico.

Parâmetros	30 dias		90 dias	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Peso corporal	12	12	8	8
Peso testicular	12	12	8	8
IGS*	12	12	8	8
Glicemia	12	12	8	8
Diâmetro tubular	6	6	5	4
Altura do epitélio	6	6	5	4
CTTS**	6	6	5	4
Áreas	6	6	5	4
Proporção volumétrica	6	6	5	4
Parâmetros das células de Leydig	6	6	5	4
3-βHSD (Intensidade de Pixel)	6	6	5	4
Testosterona	6	6	6	6

\*IGS, Índice gonadossomático; \*\*CTTS, comprimento total de túbulo seminífero.

#### 3.4.1. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno circular utilizando-se uma régua micrométrica acoplada à ocular. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular, foi mensurada a

altura do epitélio seminífero, tomada pela distância da membrana basal até a borda luminal. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas. Todas as medidas foram obtidas a partir da objetiva de 40x.

O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo, em metros, foi estimado empregando-se a seguinte equação:

$$CTT = \frac{VTS}{\pi R^2}$$

Onde: VTS = Volume total de túbulos seminíferos dos testículos

$\pi R^2$  = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos

R = Diâmetro tubular

O CTT foi dividido pelo peso dos testículos para estimar o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

Com base nas medidas do diâmetro tubular foram calculados os seguintes parâmetros: áreas tubulares (AT), luminal (AL) e epitelial (AE), de acordo com as fórmulas:

$$AT = \pi \cdot RT^2$$

Onde: AT = Área Tubular

$\pi = 3,14$

RT = Raio tubular

$$AL = \pi \cdot RL^2$$

Onde: AL = Área luminal

$\pi = 3,14$

RL = Raio Luminal

$$AE = AT - AL$$

Onde: AE = Área epitelial

AT = Área tubular

AL = Área Luminal

. Por serem grandezas não lineares a mensuração das áreas dos componentes tubulares testiculares torna a comparação mais confiável. A relação túbulo/epitélio (RT/E) foi calculada dividindo AT / AE (Dias et al., 2019). Quanto mais próxima de 1 for esta relação, maior a quantidade de epitélio.

### **3.4.2. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes do testículo**

As proporções volumétricas foram estimadas utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos) por campo, em aumento de 400x. Para cada animal foram analisados 15 campos, escolhidos ao acaso, perfazendo um total de 6615 pontos. Do compartimento tubular foram avaliadas túnica própria, células germinativas, células de Sertoli, células em apoptose e lúmen; enquanto do compartimento intertubular foram analisadas células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos e macrófagos. O volume de cada componente testicular, expresso em ml foi estimado a partir do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o valor relativo ao peso da túnica albugínea, que em ratos equivale a 6,5% da massa testicular. Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991), o volume do testículo foi considerado igual ao seu peso.

Após a obtenção do percentual dos diferentes componentes e do volume testicular (VT), o volume de cada um dos componentes estudados foi estimado conforme a fórmula:

$$Vx = \frac{VT \times X}{100}$$

onde: Vx = volume de um determinado componente do parênquima  
 VT = volume total testículo  
 X = percentual do componente do parênquima

### **3.4.3. Parâmetros das células de Leydig**

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi realizado empregando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Mil pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig foram contados por animal, com a finalidade de se determinar à proporção (%) entre núcleo e

citoplasma. Posteriormente, o diâmetro nuclear médio destas células foi obtido com o auxílio de ocular micrométrica (10x) acoplada à objetiva de 100x, o que resultou em aumento final de 1000x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal, sendo escolhidos aqueles com contorno mais arredondado possível e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir dos dados assim obtidos e aplicando-se as fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear, o volume citoplasmático e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig por animal. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ).

$$V_{nuclear} = \frac{4}{3} \pi R^3$$

onde,  $V_{nuclear}$  = volume nuclear

$R$  = raio nuclear (diâmetro nuclear/2)

$\pi$  = 3,1416

$$V_{citoplasmático} = \frac{\%cit. \times Vn}{\%nuc}$$

onde,  $V_{citoplasmático}$  = volume citoplasmático

$\%cit$  = porcentagem de citoplasma

$Vn$  = volume nuclear

$\%nuc$  = porcentagem de núcleo

$$V_{celular} = Vn + V_{cit}$$

onde,  $V_{celular}$  = volume celular

$Vn$  = volume nuclear

$V_{cit}$  = volume citoplasmático

De posse do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Leydig, da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, e do volume total (ml) ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, em cada animal.

### 3.5. Imunohistoquímica

Os cortes destinados à imunohistoquímica foram aderidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma), desparafinizados em xilol e reidratados. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato (pH 6,0) por aquecimento dos tecidos por 40 minutos em banho-maria a 80° C. Após o resfriamento, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 30 minutos com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) em PBS. Ligações inespecíficas foram bloqueadas utilizando soro normal de coelho 10% v/v.

Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-3βHSD (1:100, sc-30820, Santa Cruz Biotechnology), à 4°C durante a noite. Após lavar as lâminas em PBS, seguiu-se a incubação com anticorpo secundário biotilado (1:200, ab93697, Abcam) durante 60 minutos à temperatura ambiente. A detecção do sinal foi obtida após 20 minutos de incubação em solução de estreptavidina, seguida da exposição das amostras ao substrato da peroxidase 3,3-diaminobenzidina (Sigma) e contra coradas com hematoxilina (Merck). Após a desidratação, as lâminas foram analisadas sob microscopia de luz. Nos controles negativos, o anticorpo primário foi substituído pela solução utilizada para diluição.

### 3.6. Análise da intensidade de pixels

A intensidade da marcação para enzima 3β-HSD nas células de Leydig foi mensurada usando a análise da intensidade de pixels, conforme previamente descrito por Oliveira e colaboradores (2020b). Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX60 acoplado a câmera fotográfica digital e adquiridas com resolução de 2576x 1932 pixels (300 dpi). Através do Adobe photoshop CS6 as imagens foram primeiramente convertidas para escala de cinza e a intensidade de pixels medida usando ImageJ 1.47t. Os valores computados no histograma corresponderam a intensidade de pixels total, dos quais, posteriormente, excluiu-se o *background*. A intensidade de pixels relativa ao *background* foi calculada da mesma forma, a partir de imagens de áreas sem tecido das lâminas usadas para a quantificação. Para esta análise foram selecionadas 50 células de Leydig com marcação positiva.

### **3.7. Dosagem de testosterona**

As amostras de sangue coletadas à eutanásia foram centrifugadas à 1500 rpm durante 20 minutos (centrífuga SIGMA® 2k15). O soro obtido foi encaminhado para a avaliação direta da concentração de testosterona por meio do ensaio de quimiluminescência. Esta etapa foi realizada pelo Laboratório Tecsa (Tecnologia em Sanidade Animal) em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O nível mínimo de sensibilidade considerado foi 10 nanogramas/decilitro (ng/dl) e o coeficiente de variação intra-ensaio igual a 1,7%.

### **3.8. Análise estatística**

Os dados obtidos foram testados quanto a normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto a homoscedasticidade, por meio do teste de Fisher. As médias das variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas por meio do teste de t e quando não seguiram a distribuição gaussiana, foram comparadas por meio do teste de Mann-Whitney. Correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a interação entre o peso testicular e número de célula de Leydig por testículo. O tratamento estatístico aplicado aos dados foi realizado no programa GraphPad Prism 6.0 para Windows, versão 6.01. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$  e os valores representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## **4. Resultados**

### **4.1 Efeitos do tratamento realizado durante 30 e 90 dias com dieta hipercalórica sobre a concentração da glicose periférica e parâmetros de biometria corporal e testicular de ratos.**

Conforme pode ser observado na tabela 2, as médias obtidas para glicemia e parâmetros biométricos avaliados após 30 dias de dieta hipercalórica, não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e tratado. Contudo, o coeficiente de variação para o peso testicular e peso líquido do testículo foi significativamente maior nos animais tratados ( $p = 0,0148$  e  $p = 0,0151$ ; respectivamente).

Por outro lado, a manutenção da dieta hipercalórica por um período de 90 dias foi suficiente para elevar a concentração da glicose sanguínea e o peso corporal cerca de 30% em relação aos valores obtidos para o grupo controle.

Conseqüentemente, o IGS foi significativamente menor nos animais que sofreram a intervenção com a dieta hipercalórica (tabela 2).

Tabela 2 - Dados de glicemia e biométricos de Ratos Wistar tratados durante 30 e 90 dias com dieta hipercalórica e seus respectivos controles tratados com dieta padrão (média  $\pm$  EPM).

Parâmetros	30 dias		90 dias	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
<b>Glicemia em jejum (mg/dL)</b>	122,06 $\pm$ 3,06	122,25 $\pm$ 3,31	108,44 $\pm$ 1,93	139,69 $\pm$ 2,69*
<b>Peso corporal (g)</b>	383,21 $\pm$ 7,84	367,67 $\pm$ 9,10	335,00 $\pm$ 12,24	450,50 $\pm$ 33,81*
<b>Peso testicular (g)<sup>1</sup></b>	1,53 $\pm$ 0,03	1,55 $\pm$ 0,06	1,77 $\pm$ 0,05	1,80 $\pm$ 0,07
<b>Peso líquido do testículo (g)<sup>2</sup></b>	1,43 $\pm$ 0,03	1,45 $\pm$ 0,06	1,66 $\pm$ 0,05	1,68 $\pm$ 0,07
<b>IGS (%)</b>	0,83 $\pm$ 0,016	0,88 $\pm$ 0,023	1,17 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,05*

<sup>1</sup>Representa o peso testicular médio, isto é, a soma do peso dos testículos direito e esquerdo dividido por 2.

<sup>2</sup>Representa o peso testicular do qual foi subtraído o valor correspondente ao percentual da túnica albugínea, que em ratos equivale a 6,5% da massa testicular.

O símbolo (\*) representa diferença significativa entre o grupo tratado e o seu controle ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Efeitos do tratamento realizado durante 30 e 90 dias com dieta hipercalórica sobre a composição do parênquima testicular de ratos.

### 4.2.1. Componentes dos compartimentos tubular e intertubular de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 30 dias.

A avaliação histológica demonstrou que o parênquima testicular dos ratos tratados com dieta hipercalórica (figura 2C, 2D) apresentou a composição típica para espécie, em comparação estabelecida com o grupo controle e conforme pode ser observado nas figuras 2A e 2B.

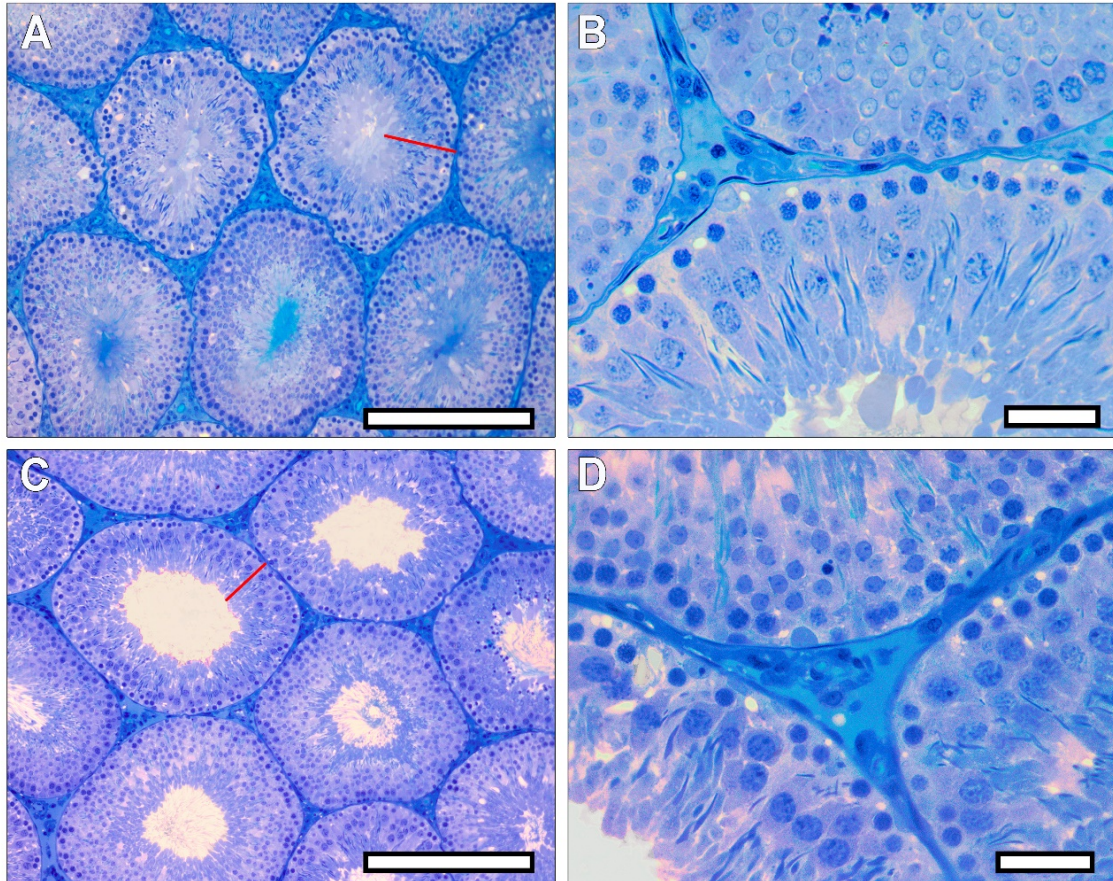


Figura 2 – Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos tratados com dieta padrão (A e B) e hipercalórica (C e D), por período de 30 dias. A avaliação qualitativa não demonstrou diferenças na citoarquitetura geral do testículo. Linha vermelha em A e C destaca a altura do epitélio. Azul de toluidina + 1% borato de sódio. Barras: A e C = 300  $\mu\text{m}$ ; B e D = 40  $\mu\text{m}$ .

De maneira geral e semelhante ao verificado pela histologia, a distribuição dos componentes, obtida pelo percentual ocupado pelos diferentes elementos dos compartimentos tubular e intertubular, bem como o volume de cada um deles, não apresentaram diferenças entre os grupos estudados (tabela 3). No entanto, os resultados obtidos para células de Sertoli e Leydig foram significativamente maiores ( $p = 0,04$ ;  $p = 0,006$ ; respectivamente) no grupo de animais submetidos à dieta hipercalórica. Neste mesmo grupo foi observada uma redução no percentual e no volume ocupado pelo tecido conjuntivo ( $p = 0,01$ ).



Tabela 3 – Componentes do parênquima testicular de Ratos Wistar alimentados com dieta padrão (controle) e hipercalórica (tratado) durante 30 dias (média ± EPM).

Parâmetro	Controle	Tratado
Túbulo seminífero % (mL) <sup>1</sup>	85,30 ± 2,11 (1,21 ± 0,05)	82,70 ± 0,68 (1,19 ± 0,05)
Túnica própria	2,29 ± 0,34 (0,033 ± 0,005)	2,11 ± 0,16 (0,03 ± 0,002)
Células germinativas	77,21 ± 1,99 (1,11 ± 0,04)	75,63 ± 0,83 (1,10 ± 0,05)
Apoptose	0,41 ± 0,22 (0,006 ± 0,003)	0,82 ± 0,16 (0,01 ± 0,003)
Células de Sertoli	1,31 ± 0,18 (0,02 ± 0,002)	1,81 ± 0,10* (0,03 ± 0,001*)
Lume	4,05 ± 0,78 (0,06 ± 0,01)	2,34 ± 0,80 (0,03 ± 0,01)
Interstício	14,70 ± 2,11 (0,21 ± 0,03)	17,30 ± 0,68 (0,25 ± 0,01)
Células de Leydig	6,03 ± 0,60 (0,08 ± 0,008)	9,79 ± 0,92* (0,13 ± 0,01*)
Vasos Linfáticos	3,13 ± 0,88 (0,04 ± 0,01)	4,20 ± 0,73 (0,06 ± 0,01)
Vasos Sanguíneos	3,01 ± 0,56 (0,04 ± 0,008)	2,27 ± 0,38 (0,03 ± 0,005)
Tecido conjuntivo	1,75 ± 0,62 (0,02 ± 0,009)	0,31 ± 0,20* (0,004 ± 0,003*)
Macrófago	0,78 ± 0,25 (0,011 ± 0,004)	0,68 ± 0,04 (0,01 ± 0,0008)

<sup>1</sup>Valores entre parênteses expressam o volume em mL dos diferentes componentes do parênquima testicular.

O símbolo (\*) representa diferença significativa entre o grupo tratado e o seu controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Componentes dos compartimentos tubular e intertubular de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 90 dias.

A constituição geral dos compartimentos testiculares nos grupos submetidos ao tratamento com dieta padrão e dieta hipercalórica pelo período de 90 dias foi semelhante, conforme observado por meio das avaliações histológica (figura 3) e estereológica (tabela 4). Entretanto, foi observada a presença de vacúolos no epitélio seminífero dos animais tratados (figura 3C e 3D).

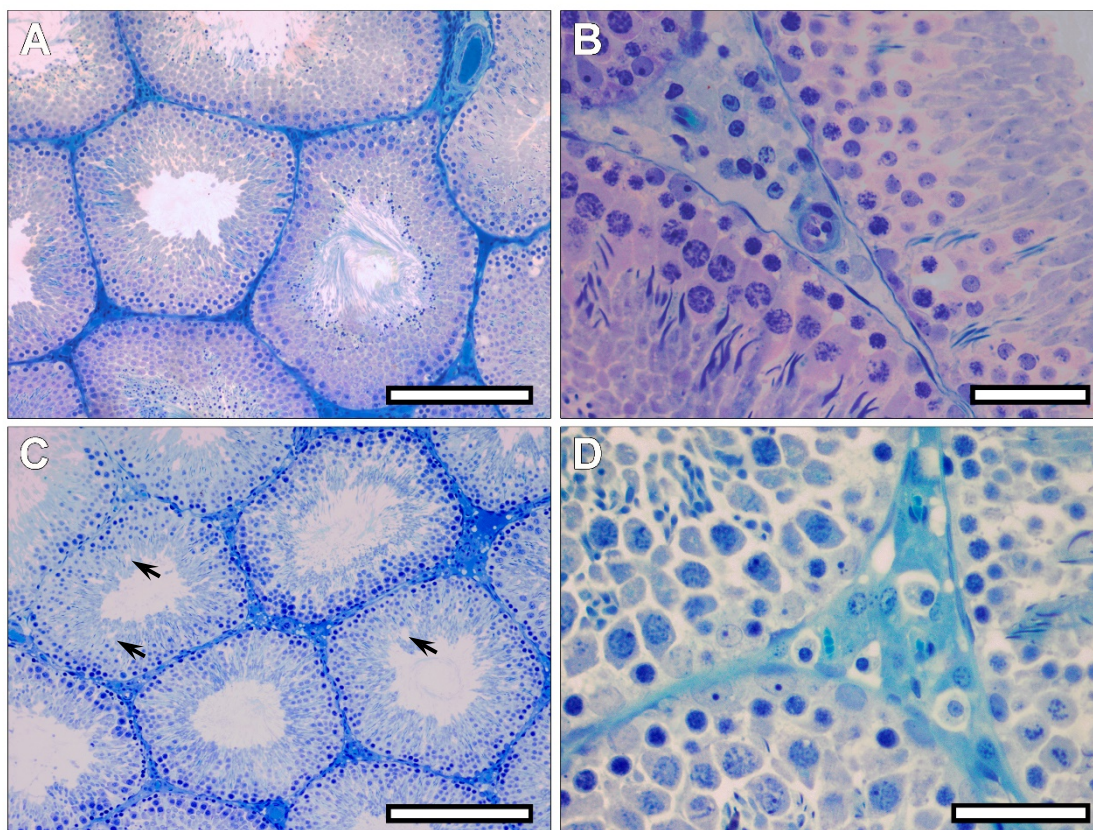


Figura 3 – Fotomicrografias do parênquima testicular de ratos tratados com dieta padrão (A e B) e hipercalórica (C e D), por período de 90 dias. A avaliação qualitativa mostrou que a citoarquitetura geral do testículo foi preservada. Entretanto, nos animais tratados foi observada a ocorrência de vacúolos entre as células germinativas (seta). Azul de toluidina + 1% borato de sódio. Barras: A e C = 200  $\mu$ m; B e D = 40  $\mu$ m.

Tabela 4 – Componentes do parênquima testicular de Ratos Wistar alimentados com dieta padrão (controle) e hipercalórica (tratado) durante 90 dias (média ± EPM).

Parâmetro	Controle	Tratado
<b>Túbulo seminífero % (mL)<sup>1</sup></b>	81,94 ± 0,73 (1,42 ± 0,03)	87,72 ± 1,43 (1,49 ± 0,09)
<b>Túnica própria</b>	1,76 ± 0,07 (0,03 ± 0,001)	2,46 ± 0,22 (0,04 ± 0,005)
<b>Células germinativas</b>	73,91 ± 0,79 (1,28 ± 0,03)	77,56 ± 1,78 (1,31 ± 0,06)
<b>Apoptose</b>	0,78 ± 0,16 (0,01 ± 0,003)	1,05 ± 0,17 (0,01 ± 0,004)
<b>Células de Sertoli</b>	1,59 ± 0,16 (0,03 ± 0,003)	1,43 ± 0,15 (0,02 ± 0,003)
<b>Lume</b>	3,88 ± 0,64 (0,07 ± 0,01)	5,20 ± 1,34 (0,09 ± 0,02)
<b>Interstício</b>	18,06 ± 0,73 (0,31 ± 0,01)	12,28 ± 1,43 (0,21 ± 0,03)
<b>Células de Leydig</b>	9,30 ± 0,68 (0,16 ± 0,01)	5,67 ± 1,82 (0,10 ± 0,03)
<b>Vasos Linfáticos</b>	3,63 ± 0,16 (0,06 ± 0,003)	2,86 ± 0,52 (2,11 ± 0,52)
<b>Vasos Sanguíneos</b>	1,93 ± 0,18 (0,03 ± 0,003)	1,81 ± 0,37 (0,03 ± 0,006)
<b>Tecido conjuntivo</b>	2,28 ± 0,96 (0,03 ± 0,01)	1,12 ± 0,47 (0,01 ± 0,007)
<b>Macrófago</b>	0,90 ± 0,12 (0,02 ± 0,002)	0,81 ± 0,13 (0,01 ± 0,002)

<sup>1</sup>Valores entre parênteses expressam o volume em mL dos diferentes componentes do parênquima testicular.

O símbolo (\*) representa diferença significativa entre o grupo tratado e o seu controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Avaliação morfométrica do compartimento tubular de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 30 e 90 dias.

Nos animais alimentados por 30 dias com dieta hipercalórica foi observada uma redução significativa da altura do epitélio ( $p = 0,04$ ) e aumento da área luminal (0,001). A razão obtida a partir da área tubular e epitelial, mostrou que no grupo tratado o equivalente ao epitélio seminífero é significativamente menor ( $p = 0,0007$ ) que nos animais alimentados com dieta padrão (tabela 5).

Os parâmetros tubulares avaliados após o período de 90 dias com alimentação hipercalórica (tratado) não apresentaram diferenças frente aos resultados obtidos para os animais do grupo controle (tabela 5).

Tabela 5 – Dados morfométricos do túbulo seminífero de Ratos Wistar alimentados com dieta padrão (controle) e hipercalórica (tratado), durante 30 e 90 dias (média  $\pm$  EPM).

Parâmetro	30 dias		90 dias	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
<b>Diâmetro tubular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	303,5 $\pm$ 17,8	318 $\pm$ 8,3	349,2 $\pm$ 9,9	361,2 $\pm$ 14,9
<b>Altura do epitélio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	106,3 $\pm$ 7,2	87,9 $\pm$ 3,8*	108,2 $\pm$ 5,4	100,0 $\pm$ 4,2
<b>Área tubular (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	73591 $\pm$ 8344	79707 $\pm$ 4179	96081 $\pm$ 5479	102982 $\pm$ 8382
<b>Área luminal (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	6580 $\pm$ 938	16150 $\pm$ 1954*	14260 $\pm$ 2350	20710 $\pm$ 2841
<b>Área epitélio (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	67011 $\pm$ 7826	63557 $\pm$ 3344	81821 $\pm$ 4926	82272 $\pm$ 6288
<b>Razão T/E<sup>1</sup></b>	1,1 $\pm$ 0,01	1,3 $\pm$ 0,03*	1,2 $\pm$ 0,03	1,3 $\pm$ 0,03
<b>CTTS<sup>2</sup> (m)</b>	17,5 $\pm$ 1,9	15,3 $\pm$ 1,1	14,9 $\pm$ 0,7	14,9 $\pm$ 1,9
<b>CTTS/g (m)</b>	11,6 $\pm$ 1,3	10,1 $\pm$ 0,6	8,2 $\pm$ 0,5	8,1 $\pm$ 0,6

O símbolo (\*) representa diferença significativa entre o grupo tratado e o seu controle ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> T/E, área tubular/área epitélio.

<sup>2</sup> CTTS, comprimento total de túbulo seminífero.

#### 4.2.4 Morfometria, estereologia e função das células de Leydig de ratos submetidos à intervenção com dieta hipercalórica durante 30 e 90 dias.

As células de Leydig apresentaram respostas significativas em diferentes parâmetros avaliados nos grupos tratados, frente aos respectivos controles (figuras 4 e 5).

No grupo tratado durante 30 dias com dieta hipercalórica, foi observada redução do diâmetro ( $p = 0,0083$ ; 4A) e volume ( $p = 0,0226$ ; 4B) nuclear. O volume citoplasmático foi caracterizado pela variância significativamente diferente entre os grupos. Diante disso, apesar da tendência observada do menor volume de citoplasma no grupo tratado (4C), não houve diferença entre as médias. O valor absoluto encontrado para o volume celular individual foi menor no grupo tratado ( $657,8 \pm 22,08$ ) quando comparado ao controle ( $751,7 \pm 69,62$ ) e apesar da tendência verificada ( $p = 0,0649$ ), não foi estatisticamente significativo (4D). Nos indivíduos alimentados por 90 dias com dieta hipercalórica foram observados maiores diâmetros nucleares ( $p = 0,0239$ ; 5A) bem como

volumes nuclear ( $p = 0,0227$ ; 5B), citoplasmático ( $p = 0,0317$ ; 5C) e celular ( $p = 0,0317$ ; 5D).

O número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo apresentou aumento significativo ( $p = 0,0075$ ;  $p = 0,0031$ ) nos animais tratados com dieta hipercalórica durante 30 dias, conforme pode ser verificado na figura 3E, havendo correlação alta e significativa ( $r = 7455$ ;  $p = 0,0085$ ) entre o número de células por testículo e o peso testicular (3F). Por outro lado, comportamento oposto foi observado no grupo tratado por 90 dias, uma vez que o número de células obtido por testículo e por grama, foi significativamente menor ( $p = 0,0441$  e,  $p = 0,0185$ ; respectivamente).

A avaliação funcional das células de Leydig, a partir da concentração periférica de testosterona, revelou que os animais submetidos à intervenção com dieta hipercalórica por 30 e 90 dias tenderam aos menores valores absolutos para esse parâmetro (figura 4G e 5F). No entanto, a variância obtida para a concentração de testosterona nos grupos de 30 dias foi significativamente diferente, sendo maior no grupo controle ( $s^2 = 76,06\%$ ) comparada ao tratado ( $s^2 = 35,92\%$ ).

A imunomarcção para a enzima da via esteroidogênica 3beta-hidroxiesteroide desidrogenase (3beta-HSD) demonstrou ser específica às células de Leydig nos grupos tratados e controles (figuras 4H, 4I e 5G, 5H). Entretanto, foi observado que nos animais com 30 dias de dieta hipercalórica, a intensidade da marcação para esta enzima foi menor ( $p = 0,0269$ ; 4J) em comparação aos controles. Nos grupos de 90 dias a intensidade de pixels foi semelhante entre controles e tratados, conforme pode ser observado no histograma apresentado na figura 5I.

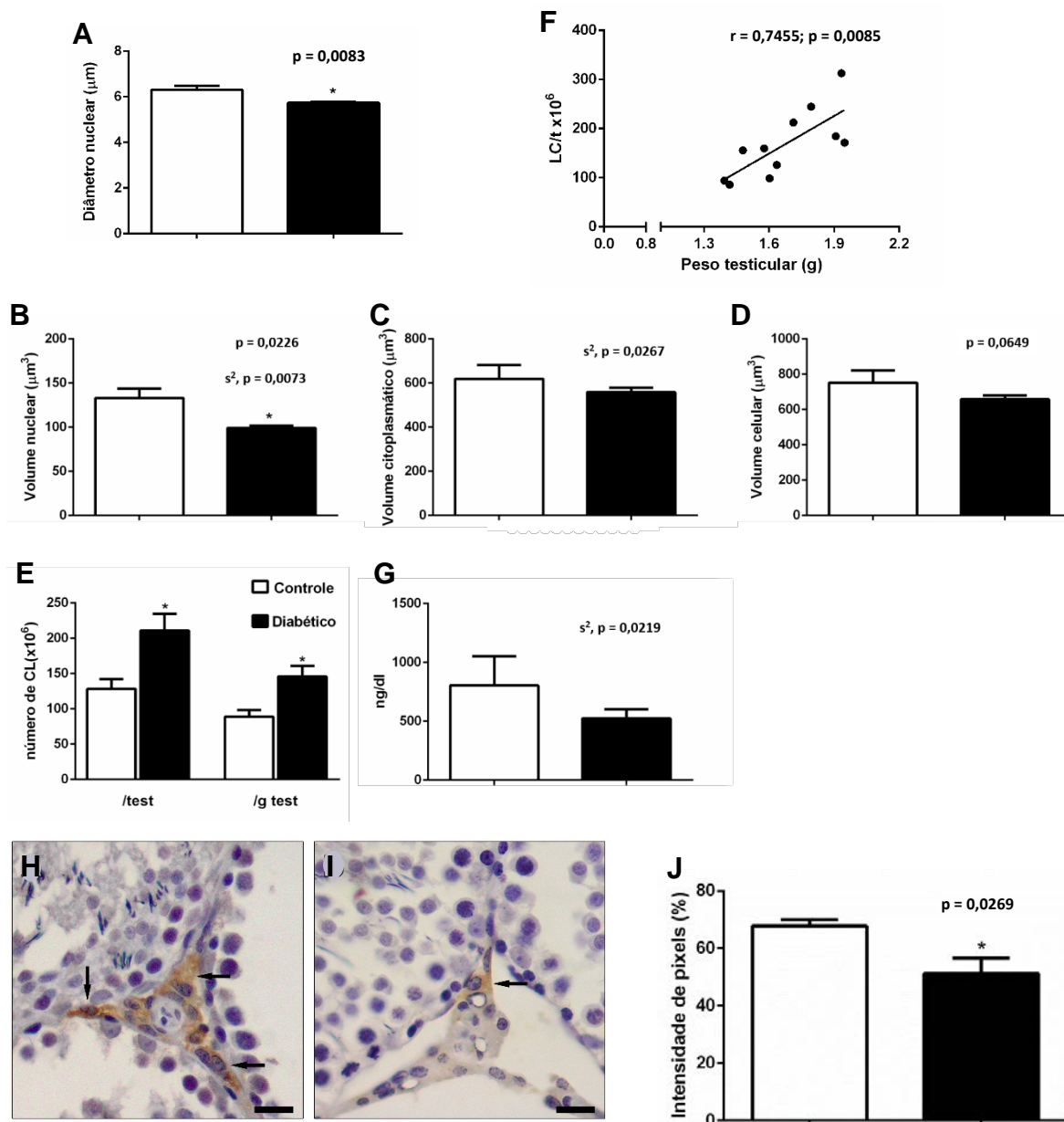


Figura 4 – Parâmetros morfométricos, estereológicos e funcionais das células de Leydig de ratos tratados com dieta padrão e hipercalórica, por período de 30 dias. Setas pretas em H e J indicam células de Leydig positivas para o marcador da função esteroidogênica  $3\beta$ -HSD. Hematoxilina de Harys. Barras = 20  $\mu\text{m}$ .

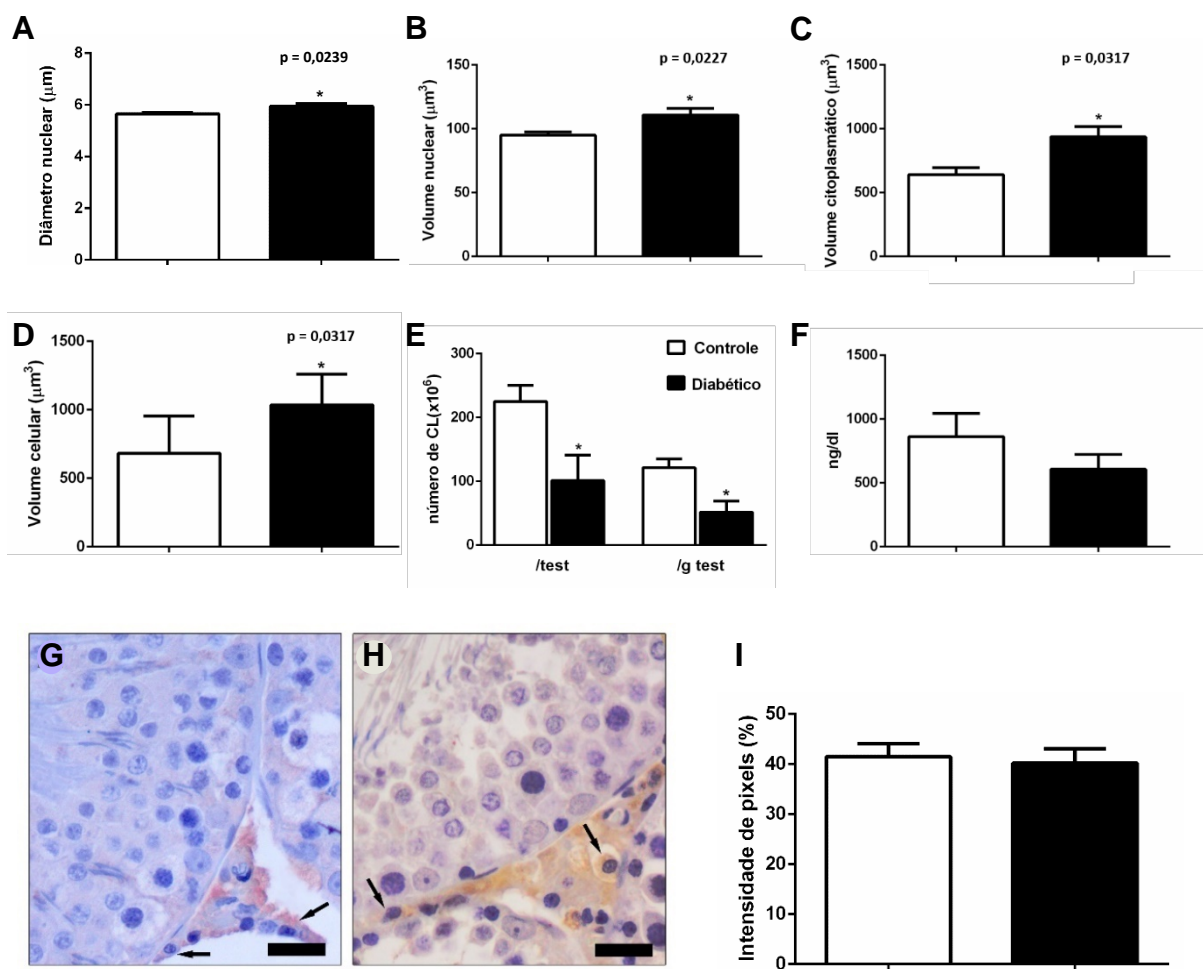


Figura 5 – Parâmetros morfométricos, estereológicos e funcionais das células de Leydig de ratos tratados com dieta padrão e hipercalórica, por período de 90 dias. Setas pretas em G e H indicam células de Leydig positivas para o marcador da função esteroidogênica  $3\beta$ -HSD. Hematoxilina de Harris. Barras = 20  $\mu\text{m}$ .

## 5. Discussão

No presente estudo avaliamos os parâmetros testiculares de ratos que desenvolveram T2DM a partir de protocolo fundamentado na dieta hipercalórica. Nossos achados indicam haver efeito da dieta hipercalórica, estabelecida conforme os hábitos alimentares ocidentais, isto é, associando alimentos hiperlipídicos e hiperglicídicos, sobre a função testicular de ratos, especialmente nas células de Leydig. Assim, observamos que o comportamento responsivo da população de células esteroidogênicas frente ao tratamento com a dieta hipercalórica foi diferente entre os animais que passaram pela intervenção pelos períodos de 30 e 90 dias.

A dieta hipercalórica utilizada no presente estudo, constituída pela combinação ração hiperlipídica (HFD) e frutose (FRT), demonstrou ser eficiente no desenvolvimento de alterações nos parâmetros metabólicos de ratos, sobretudo mimetizando a fisiopatologia da resistência à insulina (IR) (Melo et al., 2021). Nesse contexto, o aumento nos índices de adiposidade e HOMA, citocinas pró-inflamatórias; hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia de ratos alimentados por 30 dias com dieta hipercalórica foram compatíveis aos encontrados no perfil de pacientes com resistência periférica à insulina na diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) (Kharroubi e Darwish, 2015; Melo et al, 2021). Portanto, o modelo animal de resistência periférica à insulina, induzida pela dieta hipercalórica, foi validado como promissor para o estudo dos efeitos sistêmicos desencadeados por esta desordem metabólica (Melo et al., 2021).

Entre as várias consequências sistêmicas decorrentes da IR/T2DM, estão os efeitos sobre a função sexual e a espermatogênese. Assim, vários estudos longitudinais, que acompanharam populações masculinas em diferentes regiões (revisão em Allan, 2013) indicaram baixos níveis de testosterona associados ao aumento da IR assim como pacientes diabéticos com níveis de testosterona abaixo do limite inferior considerado adequado (10 nmol/l). Alterações na qualidade espermática também foram observadas em pacientes portadores desta disfunção metabólica (Barkani-Zanjani et I., 2020). Portanto, é consenso na literatura que T2DM influencia a função reprodutiva nos diferentes níveis, tais como controle endócrino e o processo da espermatogênese *per se*, disfunção erétil e ejaculação (Barkani-Zanjani et I., 2020). Particularmente em relação ao



estudo da espermatogênese *in situ*, o acesso limitado às amostras de testículo de pacientes humanos T2DM impulsionou o desenvolvimento de modelos animais que possibilite investigar, de forma pragmática, os efeitos desta entidade patológica sobre o parênquima testicular. Nesse sentido, é fundamental que a metodologia empregada no estabelecimento do fenótipo diabético no modelo experimental reproduza as condições de desenvolvimento da doença nos pacientes humanos (Al-Awar\_et al., 2016; Preguiça et al., 2020).

Baseando-se nessa importante ferramenta biológica, a literatura até agora publicada acerca da função testicular no contexto da T2DM têm grande parte de seus resultados pautados em modelos animais que podem apresentar diversos vieses, que decorrem, por exemplo, da necessidade de associar um fármaco à dieta hipercalórica (Al-Awar\_et al., 2016). Assim, apesar das alterações que retratam a disfunção metabólica sejam importantes para a caracterização do modelo, a aproximação da etiopatogenia da diabetes, principalmente a T2DM, que se desenvolve sobretudo, pela conjunção de hábitos alimentares inadequados, sedentarismo e obesidade, é fundamental e deve ser considerada.

É diante desse interessante contexto que obtivemos os resultados deste estudo. Assim, observamos que nos animais tratados por 30 dias com a dieta hipercalórica, o percentual e o número de células de Leydig foi maior nos animais tratados em detrimento ao menor volume celular. Esse padrão já foi observado em diferentes modelos experimentais (Oliveira et al., 2020b) e sugere que essa modificação é uma estratégia para manter a homeostase e o ambiente androgênico nos túbulos seminíferos. Nesse contexto, a redução observada na concentração de testosterona na T2DM conforme demonstrado por outros grupos (Barkabi-Zanjani et al., 2020) e cuja tendência persistiu no presente estudo, tem sido atribuída a efeitos da hiperinsulinemia sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Barkabi-Zanjani et al., 2020). Esta interferência resulta na diminuição nos níveis das gonadotrofinas, sendo o hormônio luteinizante (LH) o principal fator responsável pela manutenção da função das células de Leydig, inclusive atuando na regulação da expressão da enzima esteroideogênica 3-beta-hidroxi desidrogenase (3beta-HSD) (Keeney et al., 1988; Keeney e Mason, 1992;

Oliveira et al., 2020b). Corroborando essa hipótese, a expressão de 3 beta-HSD está reduzida nos animais tratados por 30 dias com dieta hipercalórica.

Com relação aos animais submetidos à intervenção pelo período de 90 dias, nossos achados indicam a tentativa de restabelecer a condição de homeostase testicular. Nesse sentido, observamos um aumento dos parâmetros volumétricos das células de Leydig, apesar do menor número encontrado para essa população celular. As análises funcionais mostraram que a expressão de 3beta-HSD atingiu os níveis do controle assim como a testosterona, que à semelhança do observado para o grupo 30 dias, permaneceu abaixo do controle, mas sem diferença significativa. A reorganização protagonizada pelas células de Leydig retrata a plasticidade desta população celular frente a um desafio de curso agudo, conforme observado em resposta à intervenção por 30 dias, assim como na resposta crônica obtida no grupo tratado por 90 dias. Assim, em um primeiro momento, as células de Leydig priorizam o aumento da população (hiperplasia), como mecanismo para manutenção da função testicular mediada pelos esteroides sexuais, tendo em vista o menor percentual de citoplasma dessas células. Diante disso, é importante ressaltar que o citoplasma celular tem importante relação com a síntese, pois aloca o retículo endoplasmático liso (REL), organela responsável pelas etapas finais da esteroidogênese testicular (Zirkin e Papadopoulos, 2018). Por outro lado, como efeito da intervenção crônica, as células de Leydig desenvolvem uma hipertrofia, aumentando significativamente o percentual de citoplasma, conseqüentemente, de REL (Mori e Christensen, 1980; Johnson e Thompson-Jr, 1987, Oliveira et al., 2020b).

Este cenário de desequilíbrio endócrino intratesticular na fase aguda, está associado a diminuição da altura do epitélio seminífero e aumento da área luminal observados no grupo 30 dias. A testosterona corresponde ao fator que garante o número de células germinativas produzidas a cada ciclo espermatogênico. A ação desse hormônio, intermediada pelas células de Sertoli, sobre as células germinativas é especialmente importante durante a fase meiótica da espermatogênese, sendo que a supressão deste andrógeno leva a um bloqueio do processo nesta fase (Lara et al., 2018b). Dada a complexa interação entre células de Sertoli e germinativas, inclusive regulada pela testosterona, os mecanismos envolvidos na diminuição da medida linear do

epitélio seminífero podem estar relacionados ao desmonte das junções entre esses tipos celulares, resultando em células livres no lúmen tubular e epididimário (Lara et al., 2018a) ou ainda, a apoptose das células germinativas. No presente estudo foi avaliado o segundo mecanismo, por meio da densidade volumétrica. Assim, apesar de uma tendência de maior frequência de apoptose registrada nos animais tratados, não houve diferença entre os grupos. Com 90 dias verificamos a persistência da tendência para esses mesmos parâmetros acrescido da presença de vacúolos no epitélio, indicando uma atividade subnormal do testículo a despeito da tentativa de restabelecimento da homeostase.

De maneira geral, os resultados até agora obtidos convergem para a confirmação que o modelo de T2DM, baseado em um protocolo que manipula exclusivamente a dieta dos animais, tem validade para o estudo dos efeitos do desequilíbrio endócrino desencadeado pela hiperglicemia e hiperinsulinemia sobre a função testicular. Adicionalmente, são perspectivas deste estudo avaliar os mecanismos diretos sobre as células testiculares, por meio da investigação da expressão das proteínas da família de transportadores de glicose (GLUT), com foco sobre as diferentes etapas da diferenciação das células de Leydig adultas (progenitoras, imaturas e maduras) além de expandir para uma abordagem sobre o papel dos macrófagos na mediação da modelagem das respostas aguda e crônica das células de Leydig.

## **6. Conclusão**

O modelo T2DM baseado na ingestão de dieta hipercalórica por 30 e 90 dias possibilitou avaliar o comportamento da resposta das células de Leydig ao desequilíbrio endócrino em dois momentos distintos. Diante disso, foi possível verificar uma hiperplasia na fase aguda seguida de hipertrofia na fase crônica, a que atribuímos estar associado à manutenção do equilíbrio androgênico intratesticular, conforme ilustrado na figura 6. No entanto, permanece ainda para ser elucidado quais as vias diretas que medeiam essas respostas celulares.

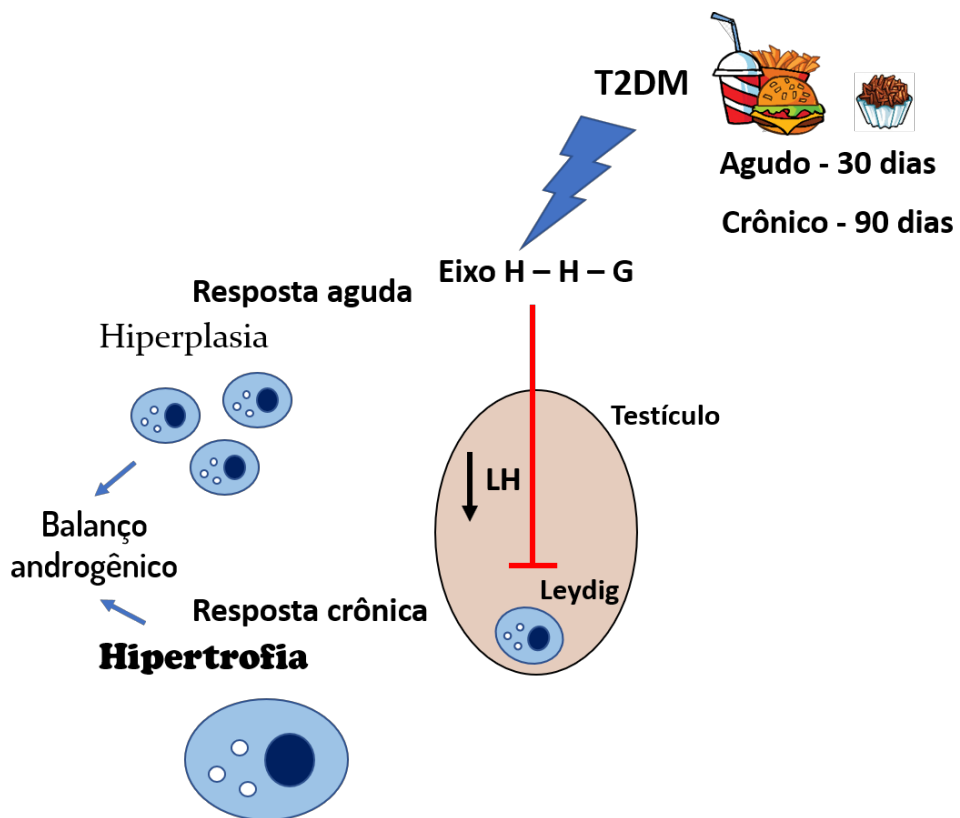


Figura 6 – Modelo para a resposta celular e mecanismo compensatório das células de Leydig em ratos portadores de T2DM, desenvolvido a partir de dieta hipercalórica.

## 7. Referências Bibliográficas

AL-AWAR A, KUPAI K, VESZELKA M, SZÚCS G, ATTIEH Z, MURLASITS Z, TÖRÖK S, PÓSA A, VARGA C. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res.* 2016; 2016:9051426.

ALLAN CA. Sex steroids and glucose metabolism. *Asian Journal of Andrology.* 2014, 16, 232–238.

ALVES MG. et al. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue barriers.* 2013, v. 1, n. 2, p. e23992,

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. The prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes care.* 2002, v. 25, n. 4, p. 742-749.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care.* 2018, v. 41, n. Supplement 1, p. S13-S27.

BARSIAH S, BEHNAM-RASSOULI M, SHAHABIPOUR F, ROSTAMI S, SABBAGHI MA, MOMENI Z, TAVASSOLI A, SAHEBKAR A. Evaluation of testis hormonal and histopathological alterations in type I and type II diabetic rats. *J Cell Biochem.* 2019; 120(10):16775-16785.

BARKABI-ZANJANI S, GHORBANZADEH V, ASLANI M, GHALIBAFSABBAGHI A, CHODARI L. Diabetes mellitus and the impairment of male reproductive function: Possible signaling pathways. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(5):1307-1314.

BERGH A. Effect of cryptorchidism on the morphology of testicular macrophages: evidence for a Leydig cell-macrophage interaction in the rat testis. *International Journal of Andrology.* 1985, v. 8, n. 1, p. 86-96.

COOPER TG, YEUNG CH. Computer-aided evaluation of assessment of “grade a” spermatozoa by experienced technicians. *Fertility and sterility.* 2006, v. 85, n. 1, p. 220-224.

COSTANZO PR, KNOBLOVITS P. Male gonadal axis function in patients with type 2 diabetes. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2016, DOI 10.1515/hmbci-2016-0014.

DE ROOIJ DG, GRISWOLD MD. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. J Androl. 2012, 33(6):1085-95.

DIAS FCR, MARTINS ALP, MELO FCSA, CUPERTINO MC, GOMES MLM, OLIVEIRA JM, DAMASCENO EM, SILVA J, OTONI WC, MATTA SLP. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. J. Ethnopharmacol. 2019, 233, 179–189.

EL, K. Baba; AZAR, Sami T. Low testosterone and diabetes. Current diabetes reviews. 2013, v. 9, n. 5, p. 418-421.

FIJAK M, MEINHARDT A. The testis in immune privilege. Immunol. Rev. 2006, 213:66–81.

FRANÇA LR. *Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau*. 185p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, Brasil. 1991.

FRANÇA LR; RUSSELL LD. The testis of domestic animals. Male reproduction: a multidisciplinary overview. 1998, v. 197, p. 219.

FURMAN BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. Current protocols in pharmacology. 2015, v. 70, n. 1, p. 5.47. 1-5.47. 20.

GIANNESI F et al. Ultrastructure of testicular macrophages in aging mice. Journal of morphology. 2005, v. 263, n. 1, p. 39-46.

HESS RA., FRANÇA LR. Structure of the Sertoli cell. Sertoli cell biology. 2005, p. 19-40.

HESS RA., FRANÇA LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular mechanisms in spermatogenesis. Springer, New York, NY, 2007. p. 1-15

HUTSON JC. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. Cell and tissue research. 1992, v. 267, n. 2, p. 385-389.

HUTSON JC. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2006, v. 231, n. 1, p. 1-7.

INDUMATHY S, PUESCHL D, KLEIN B, FIETZ D, BERGMANN M, SCHUPPE HC, DA SILVA N, LOVELAND BE, HICKEY MJ, HEDGER MP, LOVELAND KL. Testicular immune cell populations and macrophage polarisation in adult male mice and the influence of altered activin A levels. *J Reprod Immunol*. 2020 Nov; 142:103204.

JAIN GC; JANGIR, RN. Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. *Pharmacognosy reviews*. 2014, v. 8, n. 16, p. 113.

JOHNSON L, THOMPSON-JR. DL. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *J Reprod Fertil*. 1987;81, 227-32.

KEENEY DS, MENDIS-HANDAGAMA SMLC, ZIRKIN BR, EWING LL. Effect of Long Term Deprivation of Luteinizing Hormone on Leydig Cell Volume, Leydig Cell Number, and Steroidogenic Capacity of the Rat Testis. *Endocrinology*, 1988, 123, 1, Pages 2906–2915

KEENEY DS, MASON JI. Expression of testicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5----4-isomerase: regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. *Endocrinology*. 1992, 130, 4, Pages 2007–2015.

KHARROUBI AKRAM T, DARWISH HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015, 25; 6: 850-867.

LA VIGNERA, Sandro et al. Diabetes mellitus and sperm parameters. *Journal of andrology*, 2012, 33, 2, p. 145-153.

LARA NLM, AVELAR GF, COSTA GMJ, LACERDA SMSN, HESS RA, FRANÇA LR. Cell–Cell Interactions—Structural. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. vol. 1, pp. 68–75. Academic Press: Elsevier. 2018a.

LARA NLM, COSTA GMJ, AVELAR GF, LACERDA SMSN, HESS RA, DE FRANÇA LR. Testis Physiology—Overview and Histology. In M. K. Skinner (Ed.),

Encyclopedia of Reproduction. vol. 1, pp. 105–116. Academic Press: Elsevier. 2018b.

LUKYANENKO YO, CHEN JJ, HUTSON JC. Production of 25-hydroxycholesterol by testicular macrophages and its effects on Leydig cells. *Biology of reproduction*. 2001, 64, 3, p. 790-796.

MELO BP, ZACARIAS AC, OLIVEIRA JCC, DE SOUZA LMC, SABINO J, FERREIRA AVM, TONOLI C, DOS SANTOS ML, DE AVELAR GF, MEEUSEN R, HEYMAN E, SOARES DD. Thirty days of combined consumption of a high-fat diet and fructose-rich beverages promotes insulin resistance and modulates inflammatory response and histomorphometry parameters of liver, pancreas, and adipose tissue in Wistar rats. *Nutrition*. 2021, 30; 91-92:111403.

MORI H, CHRISTENSEN AKJ. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *Cell Biol*. 1980, 84:340-54.

NES W, DAVID et al. Identification of the lipophilic factor produced by macrophages that stimulates steroidogenesis. *Endocrinology*. 2000, 141, 3, p. 953-958.

OLIVEIRA CFA, LARA NLEM, CARDOSO BRL, DE FRANÇA LR, AVELAR GF. Comparative testis structure and function in three representative mice strains. *Cell Tissue Res*. 2020; 382:391-404.a

OLIVEIRA CF, LARA NL, LACERDA SM, RESENDE RR, FRANÇA LR, AVELAR GF. Foxn1 and Prkdc genes are important for testis function: evidence from nude and scid adult mice. *Cell Tissue Res*. 2020, 380, 615-625.b

OMOLAOYE TS, SKOSANA BT, DU PLESSIS SS. Diabetes mellitus-induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. *Acta histochemical*. 2018, 120, 2, 103-109.

PREGUIÇA I, ALVES A, NUNES S, GOMES P, FERNANDES R, VIANA SD, REIS F. Diet-Induced Rodent Models of Diabetic Peripheral Neuropathy, Retinopathy and Nephropathy. *Nutrients*. 2020,18;12:250.

RAMACHANDRAN A, SNEHALATHA C. Rising burden of obesity in Asia. *Journal of obesity*, 2010.



RATO, L. et al. High-energy diets: a threat for male fertility? *Obesity Reviews*. 2014, v. 15, n. 12, p. 996-1007.

ROCHIRA, Vincenzo et al. Hypothalamic–pituitary–gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. *European journal of endocrinology*. 2006, 155, 4, 513-522.

RUSSELL, LD; ETTLIN, RA; SINHA-HIKIM, AP; CLEGG, ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. 1990.

RUSSELL LD, FRANÇA LR, BRINSTER RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J Androl*. 1996; 17603-14.

SCARANO WR et al. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *International journal of andrology*. 2006, 29, 4, 482-488.

SETCHELL BP, BREED WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: *Physiology of Reproduction* (ed. Neill JD). 2006, 771-825. Elsevier.

SHECHTER R, LONDON A, Michal S. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology*. 2013, 13, 3, 206-218,

SULLIVAN R, FRENETTE G, GIROUARD J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian journal of andrology*. 2007, v. 9, n. 4, p. 483-491.

TAUBER AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003, 4, 11, p. 897-901.

VAZQUEZ G et al. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiologic reviews*. 2007, v. 29, n. 1, p. 115-128.

WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (WHO/NCD/NCS/99.2). 1999, Geneva: World Health Organization.

WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. 2010, Geneva: World Health Organization.

WHO. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy (WHO/NMH/MND/13.2). 2013, Geneva: World Health Organization.

WHO. GLOBAL REPORT ON DIABETES. 2016, Geneva: World Health Organization.

WINNALL WR, HEDGER MP. Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model. *Journal of reproductive immunology*. 2013, 97, 2, p. 147-158.

ZEGERS-HOCHSCHILD F, ADAMSON GD, DYER S, RACOWSKY C, DE MOUZON J, SOKOL R, RIENZI L, SUNDE A, SCHMIDT L, COOKE ID, SIMPSON JL, VAN DER POEL. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017S. *Fertil Steril*. 2017, 108:393-406.

ZIRKIN BR, PAPADOPOULOS V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*, 2018, 99, 101–111.