

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE E DO EXERCÍCIO AERÓBICO
SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS QUANTITATIVOS
EM CAMUNDONGOS**

MARIA BEATRIZ RAMOS

**BOTUCATU – SP
2024**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE E DO EXERCÍCIO AERÓBICO
SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS QUANTITATIVOS
EM CAMUNDONGOS**

MARIA BEATRIZ RAMOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Coorientador: Dr. Célio Junior da Costa
Fernandes

**BOTUCATU – SP
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ramos, Maria Beatriz.

Influência da obesidade e do exercício aeróbico sobre parâmetros espermáticos quantitativos em camundongos / Maria Beatriz Ramos. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Erick José Ramo da Silva

Coorientador: Célio Junior da Costa Fernandes

Capes: 20701004

1. Exercícios aeróbicos. 2. Fecundidade. 3. Homens - Infecundidade. 4. Obesidade. 5. Reprodução.

Palavras-chave: Exercício aeróbio; Fertilidade masculina; Infertilidade; Obesidade; Reprodução.

MARIA BEATRIZ RAMOS

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE E DO EXERCÍCIO AERÓBICO
SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS QUANTITATIVOS
EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 03 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva
Departamento de Biofísica e Farmacologia, IBB/UNESP

Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Departamento de Patologia, FMB/UNESP

Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio
Departamento de Patologia, FMB/UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter sido meu sustento e fonte de força ao longo da graduação, ajudando-me a superar cada adversidade e a aproveitar os momentos de alegria que esse percurso me proporcionou.

Aos meus pais, agradeço profundamente pela luta para que eu tivesse acesso a uma educação de qualidade. Em especial, à minha mãe, minha maior inspiração, por ter me acalmado em momentos de desespero e por sempre ser meu alicerce.

À minha irmã, agradeço por estar ao meu lado nos momentos difíceis, me ajudando a esporecer quando mais precisei e por cuidar com tanto carinho de Betina em minha ausência.

Agradeço aos meus familiares, pelo amor e apoio incondicionais. Serei eternamente grata por sempre me incentivarem durante a graduação e por compreenderem a minha ausência enquanto eu me dedicava aos estudos.

Ao meu querido namorado Felipe, meu melhor amigo, sou grata por sua paciência, companheirismo e por sempre me confortar e aconselhar nos momentos em que mais precisei de apoio.

Agradeço aos amigos que fiz durante esses anos de faculdade. Obrigada por todos os conselhos, companheirismo e risadas. Compartilhar essa jornada com vocês foi uma experiência incrível!

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Farmacologia da Reprodução e Andrologia pela dedicação em transmitir tantos conhecimentos. Sem dúvida, todos esses aprendizados foram essenciais para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Erick. J. R. Silva, e ao meu coorientador, Dr. Célio J. C. Fernandes, por todos ensinamentos valiosos e por toda confiança depositada em meu potencial. Sem o apoio de vocês, eu não teria alcançado essa etapa. Foi um privilégio ter tido a orientação de profissionais tão dedicados e inspiradores!

Agradeço ao Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu por todo o suporte durante a graduação, em especial ao corpo docente, servidores e funcionários.

RESUMO

A obesidade está associada ao acúmulo de tecido adiposo, além de aumento de estrogênio e à redução de testosterona, o que pode comprometer a fertilidade masculina, através da produção e qualidade de espermatozoides. Adicionalmente, o tecido adiposo libera moléculas como citocinas pró-inflamatórias e hormônios que também podem afetar a função reprodutiva, especialmente em quadros de diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. O exercício aeróbico, por sua vez, tem benefícios sistêmicos que podem reverter danos causados pela obesidade. Assim, o presente trabalho tem como objetivo, avaliar o impacto da obesidade na qualidade dos espermatozoides de camundongos e o potencial do exercício aeróbico em restaurar a função espermática. Utilizamos camundongos suíços adultos (120 dias, n=4/grupo) divididos em três grupos: Ctrl (dieta regular), ObSed (dieta rica em gordura) e ObAer (dieta rica em gordura associada com exercício). Ao final da indução de obesidade e período de treino, os animais foram eutanasiados e os testículos e epidídimos foram coletados para a determinação de parâmetros espermáticos quantitativos (contagem espermática, produção diária de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário). Os parâmetros foram avaliados por ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$ foi considerado significativo. O projeto foi submetido ao comitê de ética da UNICAMP (CEUA FCA/Unicamp nº 5981-1(A) /2023). Nossos resultados mostram aumento do peso corporal do grupo ObSed ao final do período da dieta em comparação com o grupo controle, efeito parcialmente revertido pelo exercício aeróbico ($p < 0,05$). A massa relativa do testículo e segmento inicial/cabeça/corpo do epidídimo (mg de tecido/g de peso corporal) também foi reduzida no grupo ObSed em relação grupo controle ($p < 0,05$), mas não em relação ao grupo ObAer ($p > 0,05$). Por outro lado, a massa relativa da cauda do epidídimo foi maior no grupo ObSed em relação ao controle e ao ObAer ($p < 0,05$). A contagem espermática testicular e produção diária de espermatozoides absolutas ($\times 10^6$ /testículo) não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$), mas ao serem normalizados pela massa testicular ($\times 10^6$ /g de testículo) demonstraram aumento nos grupos ObSed e ObAer em comparação ao controle ($p < 0,05$). Não observamos alterações na contagem espermática epididimária e tempo de trânsito epididimário entre os grupos ($p > 0,05$). Em conjunto, concluímos que a obesidade afetou de maneira limitada alguns dos parâmetros espermáticos avaliados e o exercício físico aeróbico não exerceu efeito significativo sobre os efeitos da obesidade na função espermática.

Palavras-chave: Obesidade, Fertilidade masculina, Reprodução, Exercício aeróbico, Infertilidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. O IMPACTO DA OBESIDADE NA FERTILIDADE MASCULINA	9
1.2. O IMPACTO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO SOBRE A OBESIDADE E FERTILIDADE MASCULINA	11
2. OBJETIVO	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	12
3.2. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	12
3.3. COMPOSIÇÃO DA HIGH-FAT DIET (HFD)	13
3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO EXERCÍCIO	13
3.5. MANUTENÇÃO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	14
3.6. HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO	15
3.7. ANÁLISE DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS	15
3.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS	17
4. RESULTADOS	17
4.1. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE PESO CORPORAL E ACÚMULO DE TECIDO ADIPOSEO	17
4.2. PARÂMETROS ESPERMÁTICOS	19
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a incidência de obesidade no mundo tem aumentado de forma constante. Desde 1985, a partir da Declaração da Conferência de Desenvolvimento de Consenso dos Institutos Nacionais de Saúde, a obesidade é reconhecida como uma doença metabólica crônica (Greenway & Smith, 2000). Calcula-se que cerca de 603,7 milhões de adultos sejam afetados, o que equivale a aproximadamente 12% da população adulta global (The GBD 2015 obesity collaborators, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade pode ser definida como o excesso de gordura corporal em quantidade suficiente para causar prejuízos à saúde e é classificada, principalmente, por um Índice de Massa Corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Caballero, 2019). Estimativas indicam que essa doença é responsável por aproximadamente 300.000 mortes a cada ano nos EUA e cerca de 7% do orçamento de saúde (Conway & Rene, 2004).

A etiologia da obesidade é complexa e multifacetada, envolvendo interações entre moléculas, genes e células, além de fatores ambientais, sociais e econômicos, o que explica a heterogeneidade de fenótipos observada em pessoas obesas (Mayoral *et al.*, 2020). Ademais, esse distúrbio também abrange um amplo conjunto de sinais e sintomas, incluindo alterações anatômicas consistentes, características estas que, em certos casos, podem incapacitar o indivíduo (Conway & Rene, 2004). Ainda assim, novos hábitos alimentares, com destaque para o aumento das dietas ricas em gorduras saturadas, com alto teor de açúcar e colesterol, concomitantemente ao estilo de vida sedentário, podem ser indicados como as principais causas do acúmulo excessivo de tecido adiposo (Khullar *et al.*, 2012;).

O atual cenário mundial aponta para um estado de alarme em função da capacidade da obesidade em impactar negativamente a fisiologia de diversos tecidos. Sabe-se que ela está relacionada à resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), desequilíbrio imunológico, inflamação de baixo e/ou alto grau, doenças cardiovasculares e até mesmo o desenvolvimento de alguns tipos de tumores (Cannarella *et al.*, 2024; Conway & Rene, 2004; Calcaterra & Zuccotti, 2022; Blüher, 2019). Dentre as consequências da obesidade, está a influência na fertilidade (feminina e masculina). Em mulheres obesas, por exemplo, observa-se distúrbios ovulatórios, tumorigênese gonadal, redução das taxas de concepção, aumento do tempo necessário para alcançar a gravidez, desenvolvimento embrionário deficiente e desfechos obstétricos adversos em caso em que ocorra gravidez (Crujeiras &

Casanueva, 2015; Best & Bhattacharya, 2015; Ameratunga *et al.*, 2023). Paralelamente, homens obesos apresentam perturbações endócrinas, parâmetros seminais comprometidos, espermatogênese prejudicada, função anormal dos espermatozoides, disfunção erétil, redução do desejo sexual e hipogonadismo (Ameratunga *et al.*, 2023; Cannarella *et al.*, 2024). De tal forma, controlar a obesidade é essencial não apenas para atenuar a tendência de crescimento contínuo dessa doença, mas também para reverter suas consequências na população.

Nesse cenário, uma ampla gama de estratégias tem sido estudada e desenvolvida para tratar e controlar a obesidade. Dentre as principais alternativas de tratamento estão as terapias farmacológicas, como agonistas do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1), e intervenções cirúrgicas, como bypass gástrico em Y de Roux (Service *et al.*, 2023; Jackson *et al.*, 2015). Embora essas abordagens apresentem benefícios significativos para a qualidade de vida de indivíduos obesos, suas repercussões sobre a saúde reprodutiva masculina são mistas, apresentando impactos positivos e negativos (Service *et al.*, 2023). Por outro lado, modificações no estilo de vida, incluindo dietas e a prática de exercícios físicos, são opções não invasivas para o controle da obesidade (Higuera-Hernández *et al.*, 2018). Assim, o exercício físico emerge como um método não farmacológico de grande relevância, não somente por promover a perda de peso/gordura a longo prazo e a minimização do ganho de peso, mas também por proporcionar alterações favoráveis no perfil metabólico, função hormonal, redução do processo inflamatório e prevenção de comorbidades relacionadas à obesidade (Jakicic & Davis, 2011; Oppert *et al.*, 2023; Higuera-Hernández *et al.*, 2018; Calcaterra & Zuccotti, 2022).

Adicionalmente, há evidências de que o exercício possa melhorar os marcadores de fertilidade masculina, ainda que o tipo e a intensidade do treinamento possam desempenhar um papel crucial nesses resultados (Service *et al.*, 2023). Sob essa perspectiva, avaliamos os efeitos da prática de exercício físico aeróbico em camundongos obesos sobre a qualidade espermática. Nossos resultados podem abrir novas perspectivas para a compreensão do impacto de atividades físicas aeróbicas na fertilidade masculina em um modelo de obesidade e servirão como base para estudos futuros.

1.1. O IMPACTO DA OBESIDADE NA FERTILIDADE MASCULINA

O aumento do IMC da população mundial tem sido acompanhado por um crescimento significativo nas taxas de infertilidade masculina (Sermondade *et al.*, 2013). Simultaneamente, entre 1981 e 2013, observou-se um declínio substancial na contagem e concentração de espermatozoides, agravando ainda mais esse panorama (Levine *et al.*, 2023). A infertilidade é definida como a ausência de concepção após um ano de relações sexuais desprotegidas (Katib, 2015). Estima-se que cerca de 30% a 40% dos casos de infertilidade estejam relacionados a fatores masculinos, sendo esta a causa principal em aproximadamente 20% dos casos (Service *et al.*, 2023). Evidências sugerem que um aumento de 10 kg no peso masculino pode reduzir a fertilidade em cerca de 10% (Sallmén *et al.*, 2006). Além disso, a obesidade está associada a uma qualidade seminal prejudicada, à redução das taxas de concepções naturais e ao menor sucesso de tecnologias de reprodução assistida (Service *et al.*, 2023).

A obesidade é uma condição patológica capaz de causar prejuízos à fertilidade masculina através de múltiplos mecanismos. Além de sua função de reservatório lipídico, os adipócitos também desempenham um papel crucial como células metabólicas e endócrinas (Conway & Rene, 2004). Quando estabelecida, a obesidade provoca o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, o que leva à ativação da síntese da proteína quimiotática de monócitos (MCP1) (Fernandes *et al.*, 2023). Essa ativação, por meio de sinalizações bioquímicas específicas, induz a polarização de macrófagos do tipo M1, os quais são responsáveis pela produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 beta (IL1B) e interleucina 6 (IL6) (Fernandes *et al.*, 2023).

Além da secreção de citocinas pró-inflamatórias, o tecido adiposo também desempenha um papel importante na liberação de leptina, adipocinas, cortisol, insulina e outros disruptores endócrinos (Service *et al.*, 2023). Além disso, o tecido adiposo tem a capacidade de metabolizar esteroides sexuais e glicocorticoides, processos que estão diretamente associados à desregulação do trato reprodutor masculino e podem impactar a produção e qualidade dos espermatozoides (Crujeiras & Casanueva, 2015). Esse ambiente de inflamação metabólica crônica de baixo grau, típico da obesidade, é frequentemente acompanhado por um aumento significativo do estresse oxidativo, caracterizado pela produção excessiva e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Crujeiras & Casanueva, 2015). Esse desequilíbrio

endócrino e oxidativo pode resultar em danos às células reprodutivas e prejudicar a função reprodutiva masculina.

Vários fatores endógenos e exógenos têm sido propostos como reguladores diretos ou indiretos do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, especialmente as variações energéticas, como ocorre na obesidade (Crujeiras & Casanueva, 2015). Nesse contexto, além de promover um estado de inflamação metabólica crônica de baixo grau, a obesidade exerce um impacto sobre esse eixo. Em homens obesos, observa-se uma redução nos níveis de testosterona total e biodisponível, além de um aumento da conversão periférica de testosterona em estrogênio, mediada pela enzima aromatase (Ameratunga *et al.*, 2023). Esse desequilíbrio nos níveis hormonais sexuais periféricos influencia os mecanismos de feedback central, afetando a regulação da fisiologia testicular (Ameratunga *et al.*, 2023). Ademais, os fatores inflamatórios secretados pelo tecido adiposo, como TNF- α e IL-6, podem desempenhar um papel inibitório no nível central do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, comprometendo ainda mais a função reprodutiva (Crujeiras & Casanueva, 2015).

Além das vias bioquímicas pelas quais a obesidade afeta a fertilidade masculina, o aumento da quantidade de tecido adiposo nas regiões do quadril, abdômen e escroto representa outro fator significativo (Service *et al.*, 2023). O acúmulo de gordura nessas áreas pode elevar a temperatura local, criando um ambiente adverso para o funcionamento testicular (Service *et al.*, 2023). Além disso, o excesso de gordura ao redor do escroto pode provocar uma inflamação crônica do epidídimo, quadro conhecido como epididimite (Katib, 2015). Esse processo inflamatório pode comprometer as funções epididimárias essenciais para a maturação dos espermatozoides, o que, por sua vez, afeta negativamente a qualidade espermática (Katib, 2015). Assim, a obesidade não apenas interfere nos mecanismos hormonais e inflamatórios sistêmicos, mas também afeta diretamente o microambiente do sistema reprodutivo masculino, contribuindo para a disfunção testicular e epididimária e a diminuição da fertilidade.

Diante deste quadro de inflamação metabólica crônica, a obesidade pode afetar diversas funções do trato reprodutor masculino. Níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias podem comprometer o epitélio seminífero e o epitélio epididimal (Liu & Ding, 2017). Um estudo conduzido por Suleiman *et al.* (2020), observou que ratos mantidos em dieta rica em gordura apresentaram menor contagem de espermatozoides no lúmen tubular, além de níveis elevados de TNF α , IL1 β e estresse

oxidativo testicular. A obesidade pode perturbar células espermatogênicas e levar a uma maior taxa de apoptose, comprometer a integridade da barreira hemato-testicular e reduzir a qualidade, concentração e motilidade espermática (Wang *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2018; Khullar *et al.*, 2012; Liu & Ding, 2017). Esses processos, em conjunto, podem comprometer os órgãos do sistema reprodutor masculino, impactando diretamente a espermatogênese e a maturação espermática pós-testicular (Fan *et al.*, 2018). Como resultado, há uma interferência negativa nos parâmetros quantitativos e qualitativos dos espermatozoides, prejudicando, assim, a fertilidade masculina.

1.2. O IMPACTO DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO SOBRE A OBESIDADE E FERTILIDADE MASCULINA

Exercícios físicos aeróbicos/aeróbios, também denominados de exercícios físicos cardiorrespiratórios, são projetados no intuito de se obter um aumento da resistência e um melhoramento na capacidade de suportar uma atividade esportiva (Martin *et al.*, 2014). Durante esse tipo de treinamento, a alta demanda energética resulta em um aumento na utilização de gordura e glicogênio necessários para processos catabólicos e de oxidação, além de otimizar o transporte e distribuição de oxigênio pelo organismo (Martin *et al.*, 2014). Exercícios aeróbicos se baseiam na utilização de uma carga relativamente baixa ao longo de um período prolongado de treino, o que provoca mudanças significativas nos praticantes, como um aumento do débito cardíaco e um maior consumo de oxigênio e biogênese mitocondrial (Hughes *et al.*, 2018). Exemplos comuns de atividades aeróbicas incluem corridas, ciclismo e natação (Martin *et al.*, 2014).

A obesidade, embora frequentemente relacionada a fatores genéticos, é uma condição que pode ser induzida por hábitos de vida e que pode ser controlada e modificada por meio de dieta e exercícios (Conway & Rene, 2004). Nesse contexto, o exercício físico aeróbico se destaca não apenas como uma ferramenta eficaz para melhorar a saúde cardiovascular e musculoesquelética, mas também por sua capacidade de promover a perda de peso e reverter os efeitos negativos da obesidade na saúde reprodutiva masculina, incluindo o aumento dos níveis de testosterona sérica (Oppert *et al.*, 2023; Ameratunga *et al.*, 2023; Hughes *et al.*, 2018). Além disso, o exercício físico aeróbico pode impactar as células adiposas, reduzindo a população de macrófagos tipo M1, o que diminui o estado pró-inflamatório crônico e melhora a eficácia dos processos de reparação tecidual e regulação metabólica do tecido

adiposo, além de aumentar o potencial reprodutivo masculino obesos (Fernandes *et al.*, 2023; Ibáñez *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Nematollahi *et al.* (2019) revelou que camundongos machos obesos, submetidos a uma dieta rica em gordura e sessões de exercício físico aeróbico em esteira, apresentaram aumento na concentração e na motilidade espermática. Ainda que os animais não tenham mostrado alterações morfológicas nos testículos, nem na morfologia ou no dano ao DNA dos espermatozoides, os resultados reforçam a hipótese de que o exercício físico aeróbico desempenha um papel crucial na atenuação dos impactos da obesidade no sistema reprodutivo, alterando parâmetros essenciais para a fertilidade masculina (Nematollahi *et al.* 2019). Dessa forma, o exercício físico aeróbico emerge como uma ferramenta promissora para controlar a obesidade e suas implicações, como a infertilidade masculina.

2. OBJETIVO

Investigar o impacto da obesidade na qualidade quantitativa dos espermatozoides de camundongos e o potencial do exercício físico aeróbico para restaurar parâmetros espermáticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O projeto resultou da colaboração do grupo de pesquisa do Laboratório Molecular do Exercício Físico (ECeBIL) da Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP-Limeira, coordenado pelo Prof. Dr. Leandro Pereira de Moura, e do Laboratório de Farmacologia da Reprodução e Andrologia (LFRA) do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu, coordenado pelo Prof. Dr. Erick J. R. Silva. Cabe destacar que a dieta rica em gorduras/hiperlipídica (do inglês, *high-fat diet* - HFD), as sessões de exercício aeróbico e a eutanásia dos animais foram etapas realizadas no ECeBIL. Os tecidos foram então coletados e trazidos refrigerados para o LFRA, local onde foram utilizados para a execução dos experimentos.

3.2. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Utilizamos camundongos (*Mus musculus*) Swiss com 120 dias de idade provenientes da Central de Animais da Unicamp (CEMIB). As amostras avaliadas foram obtidas de 12 machos, divididos em 3 grupos: controle (Ctrl), obeso sedentário

(ObSed) e obeso exercitado aerobicamente (ObAer). De cada animal, foram coletados testículos e o epidídimo segmentado em: inicial/cabeça/corpo e cauda. Os experimentos com os animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e foram aceitos pelo Comitê de Ética Animal (5981-1(A) /2023) de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP-Campinas-SP. Como não será realizado nenhum experimento com animais na UNESP, não foi necessário submetê-lo à CEUA local.

3.3. COMPOSIÇÃO DA HIGH-FAT DIET (HFD)

A dieta rica em gorduras administrada aos animais foi baseada na recomendação para roedores de laboratório do American Institute of Nutrition (AIN-93) e modificada para ser composta por 35% de gordura (Reeves *et al.*, 1993; Cintra *et al.*, 2012). Todos os ingredientes são informados: Amido de Milho (Q.S.P) 115,5g/kg; Caseína 200g/kg; Sacarose 132g/kg; Amido Dextrinizado 100g/kg; Óleo de Soja 40g/kg; Banha 312g/kg; Celulose 50g/kg; Mistura Mineral 35g/kg; Mistura Vitamínica 10g/kg; L-Cisteína 3g/kg; Colina 2,5g/kg.

3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO EXERCÍCIO

Inicialmente, os animais do grupo ObAer foram adaptados à esteira por cinco dias e depois submetidos ao teste de carga incremental. Os animais foram colocados na esteira e a cada 180 segundos houve um incremento de 3 m/min na velocidade. Quando os animais tocaram três vezes a parede da esteira, no intervalo de 1 minuto, o teste foi finalizado e a taxa de exaustão determinada. Em seguida, os animais foram submetidos a 7 sessões de exercício aeróbio. O protocolo consistiu em 1 hora de corrida a 75% da velocidade máxima. Oito horas após a última sessão de exercício, os animais passaram por eutanásias e o tecido adiposo mesentérico e epididimal foi coletado (**Fig. 1**).



Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental do exercício físico aeróbico.

Os animais passaram por período de adaptação seguido de indução à obesidade com *high-fat diet*. Em seguida foram submetidos a um período de adaptação à esteira, com posterior tempo de treino. Ao final, os testículos e epidídimos foram coletados para análises moleculares e de parâmetros espermáticos.

3.5. MANUTENÇÃO E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram alocados em ambiente com temperatura entre 23-25°C, sob ciclos alternados claro/escuro de 12h, com livre acesso à água e ração padrão para roedores do grupo Ctrl ou dieta rica em gorduras para os grupos ObSed e ObAaer. A eutanásia foi realizada por overdose de anestésico inalatório (isoflurano) seguida de deslocamento cervical. Em seguida foram coletados e dissecados os testículos, e os epidídimos que foram, ainda, seccionados em: segmento inicial (S.I) /cabeça (Cb) / corpo (Cp) e cauda (Cd) (**Fig. 2**). Os tecidos foram armazenados a -80°C até o momento das análises de contagens espermáticas.

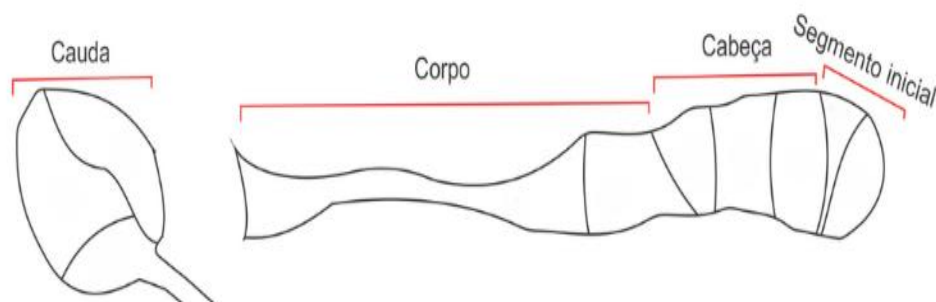


Figura 2. Esquema da segmentação realizada no epidídimo. Os três primeiros segmentos (segmento inicial, cabeça e corpo) foram mantidos juntos para uma análise conjunta, enquanto a cauda foi separada para uma avaliação individual.

3.6. HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo mesentérico foi fixado em PFA (paraformaldeído) para análise histológica. Os tecidos foram seccionados longitudinalmente (20 μ m) utilizando o criostato Leica Cryostat® (CM1850). A solução de hematoxilina foi aplicada por 10 minutos e a solução de eosina por 15 minutos, seguida de lavagem com PBS. As imagens das seções foram capturadas em microscópio (10 $\times$, 40 $\times$, 100 $\times$) e analisadas utilizando o programa ImageJ® (versão Java1.8.0).

3.7. ANÁLISE DOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Para a realização das contagens, os segmentos dos epidídimos (segmento inicial/cabeça/corpo e cauda) e os testículos foram pesados e homogeneizados em tampão STM [9 g de NaCl e 0,5 mL de Triton X-100], com o auxílio do homogeneizador de tecidos (Polytron PT 1300 D), utilizando 1ml de STM para os testículos e 400 μ l de STM para os segmentos dos epidídimos, no intuito de lisar os tecidos e liberar as espermátides e espermatozoides. Em seguida, essas amostras foram brevemente sonicadas (Ultra-Turrax TR-50) para separar cabeças das caudas, tanto das espermátides maduras resistentes à homogeneização, quanto dos espermatozoides. Após a preparação, os homogenatos foram diluídos em solução STM para obter um volume final de 200 μ l: 20 μ l do homogenato do testículo foi adicionado a 180 μ l de STM (diluição 1:10); 10 μ l do homogenato do segmento inicial/cabeça/corpo do epidídimo foram adicionados a 190 μ l de STM (diluição 1:20); e 5 μ l do homogenato da cauda do epidídimo foi adicionado a 195 μ l de STM (diluição 1:40). Por fim, 12 μ l de cada solução previamente diluída foi transferida para câmara de Neubauer e as contagens das cabeças das espermátides e dos espermatozoides foi determinada utilizando os 2 campos da câmara (Robb *et al.*, 1978; Meistrich, 1989; Turgut *et al.*, 2003; Blazak *et al.*, 1993; Ferreira, 2022). Para cada animal foi realizada a contagem em 3 câmaras.

A partir dos resultados da contagem espermática na câmara de Neubauer, foram determinados os seguintes parâmetros nos testículos: a concentração de espermatozoides a contagem absoluta de espermatozoides (CA), contagem relativa (CR), produção diária de espermatozoides (PDE) e a produção diária de espermatozoides relativa ao peso do órgão (PDEr). No que confere ao segmento inicial/cabeça/corpo e à cauda do epidídimo, também foram estipuladas a CA, a CR, além do TTE. A tabela 1 detalha as fórmulas usadas para esses cálculos. (Robb *et al.*, 1978; Meistrich, 1989; Turgut *et al.*, 2003; Blazak *et al.*, 1993; Ferreira, 2022).

Tabela 1. Parâmetros e fórmulas da contagem espermática

<i>Parâmetros</i>	<i>Legenda</i>	<i>Fórmula</i>
CA	Concentração absoluta: número médio de espermatozoides epididimários (CAe) ou testiculares (CA _t) (10 ⁶) determinados na câmara de Neubauer	$CA = \underline{x} \times 0,05 \times FD1 \times FD2$
CR	Concentração relativa: número de espermatozoides epididimários (CRe) ou testiculares (CR _t) (10 ⁶) dividido pela massa do órgão (g)	$CR = \frac{CA}{\text{massa (g)}}$
PDE	Produção Diária de Espermatozoides por testículo (10 ⁶)	$PDE = \frac{CA_t}{4,84 (*)}$
PDEr	Produção Diária de Espermatozoides por testículo (10 ⁶) dividido pela massa do órgão do animal (g).	$PDE = \frac{CR_t}{4,84 (*)}$
TTE	Tempo de Trânsito Epididimal: Tempo que o espermatozoide se desloca pelo epidídimo (dias).	$TTE = \frac{CA_t}{PDE}$

(*) 4,84 é o número de dias em que as espermátides 19 são encontradas no ciclo espermatogênico de camundongos suíços (Ferreira, 2022, p. 48). CA: contagem absoluta; CA_t: Contagem absoluta testicular; CAe: Contagem absoluta epididimária; CR: Contagem relativa; CR_t: Contagem relativa testicular; CRe: Contagem relativa epididimária; PDE: Produção diária de espermatozoides; PDEr: Produção diária de espermatozoides relativa; TTE: Tempo de trânsito epididimal; FD1: Fator de diluição 1 (peso do parênquima testicular + 1mL de STM ou peso das segmentações do epidídimo + 400µl); FD2: Fator de diluição 2 (para o testículo foi de 1:10; para o segmento inicial, cabeça e corpo do epidídimo foi de 1:20; e para a cauda do epidídimo foi de 1:40); NB: concentração na câmara de Neubauer; $\underline{x}$: média das câmaras de Neubauer. 0,05: altura da câmara de Neubauer.

3.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Aplicamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados, e o teste F para avaliar a homocedasticidade dos dados. As diferenças entre os grupos foram verificadas por análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey. Consideramos significativas as diferenças associadas à probabilidade $p < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi operacionalizado pelo programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software).

4. RESULTADOS

Este estudo investigou os efeitos do exercício físico aeróbico sobre os impactos causados pela obesidade, com foco em parâmetros espermáticos testiculares e epididimários em camundongos. Dessa forma, os resultados apresentados a seguir buscam comparar os grupos controle, obeso e obesos exercitados, destacando as variações observadas nos diferentes aspectos analisados.

4.1. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE PESO CORPORAL E ACÚMULO DE TECIDO ADIPOSEO

Nosso estudo permitiu avaliar o peso corporal final dos animais, o ganho de peso, o peso absoluto do tecido adiposo epididimal, além da histologia e macroscopia do tecido adiposo mesentérico, observando que todos apresentaram aumento nos grupos que receberam a *high-fat diet*, quando comparados ao grupo controle (Ctrl). Porém, o grupo obeso exercitado (ObAer) apresentou redução do peso final, do ganho de peso e da gordura mesentérica e epididimal em relação ao grupo obeso (**Fig. 3A-E**). Em relação aos órgãos reprodutivos, o peso relativo do testículo, assim como dos segmentos do epidídimo (S.I, Cb e Cp), foi significativamente menor nos grupos ObSed e ObAer quando comparados ao grupo Ctrl, porém sem diferença estatística entre os grupos obesos. Além disso, o peso relativo da cauda do epidídimo foi maior no grupo ObSed quando comparados aos demais grupos. Por fim, não houve diferença significativa no peso absoluto dos órgãos entre os grupos experimentais (**Tabela 2**).

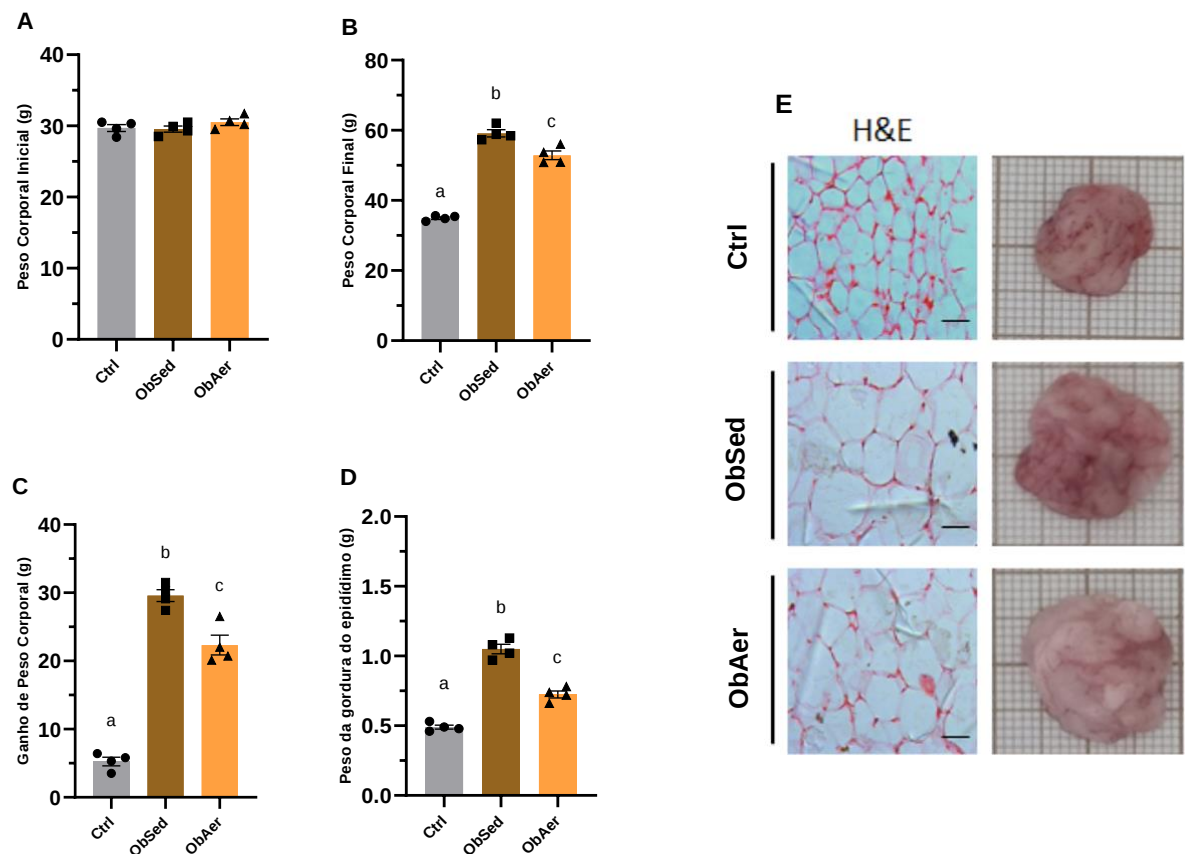


Figura 3. Alterações no peso corporal e no tecido adiposo epididimal e mesentérico ao longo do protocolo de exercício físico. (A) Peso corporal inicial dos animais, expresso em gramas (B) Peso corporal dos animais no 15º dia do protocolo de exercício físico expresso em gramas (C) Ganho de peso corporal calculado pela diferença entre o peso final e o inicial, expresso em gramas (D) Peso absoluto do tecido adiposo da região epididimária, expresso em gramas. (E) Imagem histológica do tecido adiposo mesentérico corado com hematoxilina e eosina (H&E) e macroscopia da gordura. Grupos com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Tabela 2. Alterações no peso dos órgãos ao longo do protocolo de exercício físico

Parâmetros	Grupos experimentais		
	Ctrl (n=4)	ObSed (n=4)	ObAer (n=4)
Testículo (mg)	116,38 ± 6,35 ^a	106,43 ± 7,30 ^a	98,70 ± 19,02 ^a
S.I, Cb e Cp (mg)	30,03 ± 2,70 ^a	31,92 ± 3,23 ^a	30,90 ± 3,18 ^a
Cd (mg)	17,97 ± 2,60 ^a	22,95 ± 3,88 ^a	20,57 ± 3,74 ^a

Testículo (mg/g)	$3,33 \pm 0,14^a$	$1,80 \pm 0,12^b$	$1,86 \pm 0,33^b$
S.I, Cb e Cp (mg/g)	$0,86 \pm 0,08^a$	$0,54 \pm 0,04^b$	$0,58 \pm 0,04^b$
Cauda (mg/g)	$0,51 \pm 0,08^a$	$0,78 \pm 0,13^b$	$0,39 \pm 0,06^a$

Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Valores com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), enquanto valores com letras iguais indicam semelhança estatística ($P > 0,05$). Os pesos relativos fazem referência ao peso do tecido (em miligramas) dividido pelo peso corporal final (em gramas) e foram representados por mg/g.

4.2. PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Além dos parâmetros de peso, seja dos animais ou órgãos, foram avaliadas a concentração absoluta de espermatozoides e a produção diária de espermatozoides nos testículos, que não diferiram significativamente entre os grupos Ctrl, ObSed e ObAer (**Fig. 4A**). Em contraste, tanto a concentração relativa quanto a produção diária relativa de espermatozoides foram significativamente maiores nos grupos ObSed e ObAer em comparação ao grupo Ctrl, sem diferenças estatísticas entre os grupos obeso e obeso exercitado (**Fig. 4B, D**).

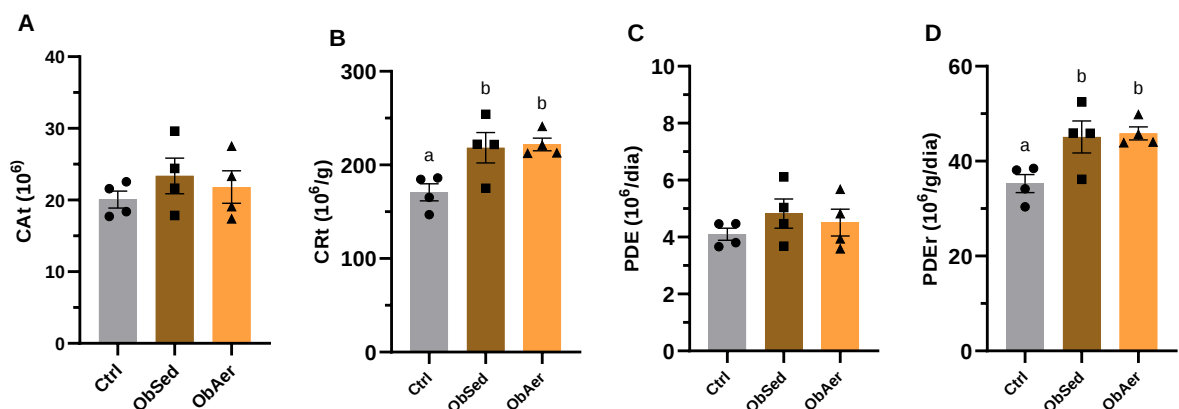


Figura 4. Parâmetros espermáticos testiculares. (A) Concentração absoluta de espermatozoides no testículo, expressa em milhões (10^6) de espermatozoides. (B) Concentração relativa de espermatozoides no testículo, expressa em milhões (10^6) de espermatozoides por grama de tecido. (C) Produção Diária de Espermatozoides, expressa em milhões (10^6) de espermatozoides por dia. (D) Produção Diária relativa de Espermatozoides, expressa em 10^6 espermatozoides por grama de tecido por dia. Grupos com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Em relação à segmentação do epidídimo, vimos que no segmento inicial, cabeça e corpo do epidídimo, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, quando considerada a concentração absoluta e relativa de espermatozoides, assim como no tempo de trânsito epididimal (**Figura 5A-C**).

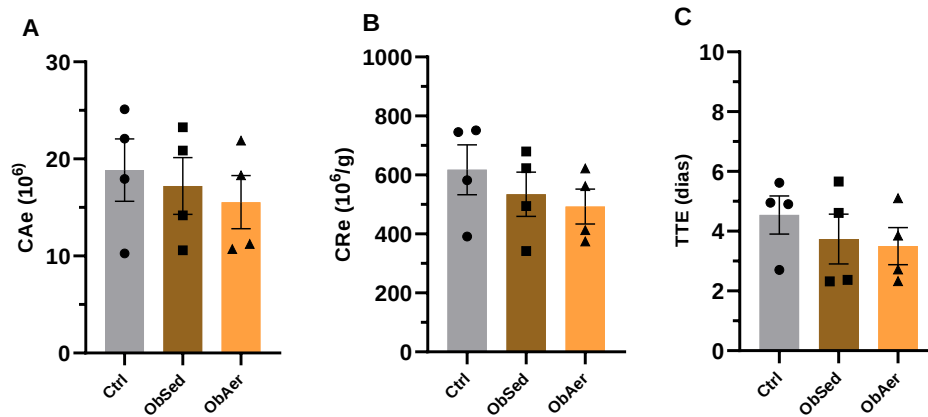


Figura 5. Parâmetros espermáticos do segmento inicial, cabeça e corpo do epidídimo. (A) Concentração absoluta de espermatozoides nesses segmentos do epidídimo, expressa em milhões (10^6) de espermatozoides. (B) Concentração relativa de espermatozoides nesses segmentos do epidídimo, expressa em milhões (10^6) de espermatozoides por grama de tecido. (C) Tempo de trânsito epididimal, expresso em dias. Grupos com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Na cauda do epidídimo, também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle, obeso e obeso exercitado em relação à concentração absoluta e relativa de espermatozoides. Quanto ao tempo de trânsito epididimal, não houve significância estatística (**Fig. 6A-C**).

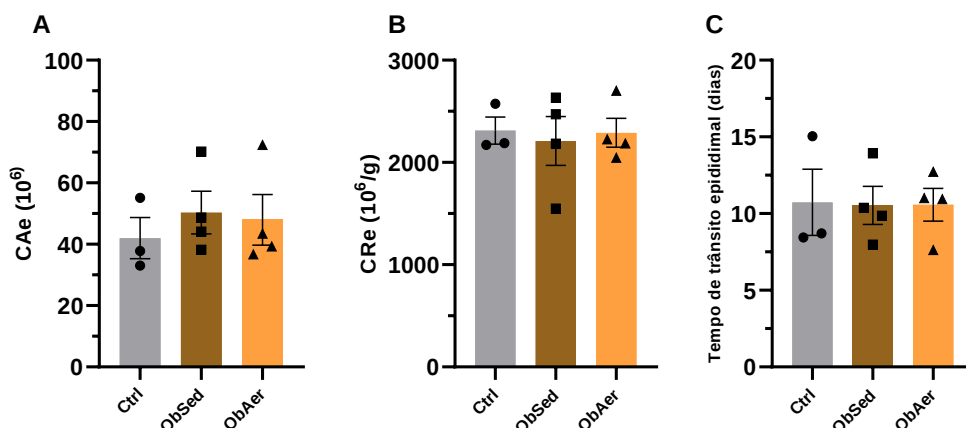


Figura 6. Parâmetros espermáticos da cauda do epidídimo. (A) Concentração absoluta de espermatozoides nesse segmento, expressa em milhões (10^6) de espermatozoides. (B) Concentração relativa de espermatozoides nesse segmento, expressa em milhões (10^6) de espermatozoides por

grama de tecido. (C) Tempo de trânsito epididimal, expresso em dias. Grupos com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A obesidade é caracterizada por inflamação sistêmica que pode afetar e prejudicar o sistema reprodutivo, masculino e feminino. No contexto do homem, esse cenário pode acarretar em alterações na morfologia espermática e qualidade seminal (Su *et al.*, 2021; Cabler *et al.*, 2010). Assim, o exercício físico surge como uma ferramenta não farmacológica capaz de barrar o aumento do peso corpóreo, e assim atenuar os danos causados pela obesidade (Rosety *et al.*, 2017). Nesse sentido, investigamos os efeitos da obesidade e do exercício aeróbico em parâmetros espermáticos de camundongos. Inicialmente, vimos que os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram aumento em determinados parâmetros espermáticos, enquanto o exercício físico aeróbico demonstrou potencial para reverter parcialmente alguns dos efeitos da obesidade nesses animais.

Especificamente, dietas ricas em gordura são amplamente reconhecidas por induzir um modelo experimental eficaz de obesidade (Buettner *et al.*, 2006). Assim como em humanos, em modelos animais a obesidade pode ser mensurada pelo aumento do peso corporal e/ou do conteúdo de gordura (Hariri & Thibault, 2010). Em um estudo conduzido por Jing *et al.*, que submeteram camundongos C57BL/6, com 4 semanas de idade, a uma HFD durante 10 semanas, foi observado aumento significativo no peso corporal e na gordura epididimária (Jing *et al.*, 2023). Nossos resultados indicaram um aumento no ganho de peso e, conseqüentemente, um maior peso corporal final nos camundongos obesos sedentários, além de um aumento no peso absoluto do tecido adiposo epididimal. Esses dados validam o protocolo com uso de HFD, sendo eficaz na indução da obesidade experimental. Ademais, não observamos diferenças no peso absoluto dos órgãos reprodutivos, corroborando com os resultados de Fernandez *et al.* (2011) que também não encontraram alterações nos pesos dos órgãos reprodutivos de ratos *Wistar* com ingesta de HFD por 15, 30 ou 45 semanas (Fernandez *et al.*, 2011). Entretanto, em nosso estudo, o grupo de camundongos obesos sedentários apresentou uma redução no peso relativo do testículo e dos segmentos epididimários. Esses dados sugerem que as diferenças nos protocolos de HFD, bem como no modelo e na idade dos animais, podem influenciar os resultados dos parâmetros espermáticos.

Em contrapartida, nossos resultados indicam que a dieta hiperlipídica (HFD) modulou positivamente alguns parâmetros espermáticos em camundongos obesos sedentários, como a concentração relativa de espermátides testiculares e a produção diária relativa de espermatozoides. Esses achados são consistentes com os de Fernandez *et al.* (2011), que também observaram que a HFD não afetou alguns parâmetros espermáticos, mas relataram um aumento no número de espermatozoides na cauda do epidídimo (Fernandez *et al.*, 2011). Esses dados reforçam nossa hipótese de que os órgãos reprodutivos podem responder de maneira diferenciada ao estado obeso. Em contraste, Fernandes *et al.* (2012) relataram que a indução da obesidade por glutamato monossódico em ratos resultou em uma redução significativa no peso absoluto e relativo dos testículos e epidídimo, além de uma diminuição na contagem testicular, produção diária de espermátides e na contagem absoluta e relativa de espermatozoides no epidídimo, bem como um tempo de trânsito epididimal acelerado (Fernandes *et al.*, 2012). No entanto, nossos resultados, embora tenha sido observada uma leve redução na concentração absoluta e relativa de espermatozoides e no tempo de trânsito epididimal nos segmentos iniciais, cabeça e corpo do epidídimo dos camundongos obesos sedentários em comparação ao grupo controle, esses resultados não apresentaram significância estatística. Essas similaridades e divergências entre nossos achados e os de outros estudos podem ser atribuídas a diferenças no tempo de duração dos protocolos de alimentação, bem como a características específicas das dietas utilizadas, como as porcentagens e fontes de gordura, composição de macronutrientes, densidade energética e propriedades orossensoriais (Hariri & Thibault, 2010).

Diante dos efeitos deletérios da obesidade sobre o sistema reprodutor masculino, o exercício físico surge como uma estratégia promissora para melhorar a fertilidade de homens obesos (Abedpoor *et al.*, 2024). A literatura revela que diferentes tipos de exercício, — variando em modalidade, duração e intensidade — geram impactos variados na capacidade reprodutiva (Abedpoor *et al.*, 2024; Martin *et al.*, 2014). Demonstramos que a prática de exercício físico aeróbico por 7 dias foi suficiente para reduzir parcialmente o ganho de peso e o tecido adiposo. Apesar disso, o exercício não influenciou o peso relativo dos testículos e segmentos do epidídimo (S.I, Cb e Cp), com exceção da cauda do epidídimo, cujo peso foi reduzido. Nenhum parâmetro espermático analisado apresentou diferença significativa em relação ao grupo obeso sedentário.

Estudos anteriores reforçam a variabilidade dos resultados sobre os efeitos do exercício. Ibáñez *et al.* (2017) demonstraram que 3 sessões semanais de exercício moderado de baixa frequência (esteira) durante 1 mês reduziram a porcentagem de espermatozoides anormais e restauraram parâmetros reprodutivos morfométricos e histopatológicos afetados pela dieta hiperlipídica (Ibáñez *et al.*, 2017). No entanto, a contagem espermática dos testículos e do epidídimo, a produção diária de espermatozoides e o tempo de transito epididimal não mostraram diferenças significativas entre os grupos sedentário e exercitado alimentados com HFD, resultado que corrobora com nossos achados. (Ibáñez *et al.*, 2017). A mesma tendência foi seguida por Palmer *et al.* (2012) que relataram que 6 semanas de natação (3 sessões de 30 minutos por semana) restauraram a motilidade e morfologia espermáticas, mas não afetaram a contagem espermática (Palmer *et al.* 2012).

Nesse cenário, o tecido adiposo, além de ser um reservatório de energia corporal, atua como um órgão endócrino que libera diversas proteínas essenciais para metabolismo, conhecidas como adipocinas (Ouchi *et al.*, 2011). Entre essas, destacam-se a leptina, adiponectina, fator D e o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) (Ouchi *et al.*, 2011). Em indivíduos obesos, a expressão dessas adipocinas geralmente está desregulada (Ouchi *et al.*, 2011), assim, o papel do exercício físico sobre os níveis hormonais tem sido amplamente estudado, com evidências de que ele pode exercer modulação sobre as adipocinas, auxiliando a restaurar os níveis alterados pela obesidade (Gonzalez-Gil & Elizondo-Montemayor, 2020).

A leptina, por exemplo, é um hormônio peptídico cuja concentração se eleva em indivíduos obesos, frequentemente acompanhada pelo desenvolvimento de resistência à leptina (Obradovic *et al.*, 2021; Cui *et al.*, 2017). Esse hormônio desempenha um papel importante na função reprodutiva, especialmente no início do desenvolvimento sexual, como evidenciado pelo aumento dos níveis de leptina durante a adrenarca, entre 8 e 10 anos de idade (Biaison- Lauber *et al.*, 2000; Obradovic *et al.*, 2021). Biaison-Lauber *et al.* (2000) demonstraram que a leptina estimula a atividade da 17,20-liase em células adrenais humanas (Biaison- Lauber *et al.*, 2000). Portanto, os achados do presente estudo, que indicam aumento em alguns parâmetros espermáticos nos obesos sedentários, podem estar relacionados ao possível aumento dos níveis de leptina neste grupo. Além disso, como não observamos diferenças significativas nesses parâmetros entre os grupos de obesos sedentários e exercitados, é provável que o efeito no grupo exercitado tenha sido

igualmente influenciado pela obesidade. Dessa forma, os resultados observados parecem refletir mais os efeitos da obesidade do que do exercício físico, uma vez que nenhum parâmetro apresentou diferenças significativas entre os grupos e o tempo de intervenção foi insuficiente para que os reais efeitos do exercício fossem detectados.

Finalmente, considerando que o ciclo da espermatogênese em murinos dura cerca de 35 dias, os parâmetros analisados ainda refletem condições de ciclos anteriores, nos quais a única intervenção era a dieta hiperlipídica (HFD). Como o protocolo de exercício teve apenas 7 dias de duração, o tempo não foi suficiente para avaliar seus efeitos completos. Assim, estudos futuros devem investigar os efeitos de um protocolo com maior tempo de exercício, realizar análises morfométricas e histopatológicas, assim como mensurar hormônios como testosterona e leptina, além da expressão de enzimas envolvidas na síntese hormonal.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que o modelo de obesidade escolhido, induzido pela dieta rica em gordura, foi eficaz em promover o quadro experimental desejado nos camundongos estudados, enquanto o exercício físico aeróbico mostrou-se capaz de reverter parcialmente o ganho de peso e o acúmulo de tecido adiposo nos animais obesos submetidos ao protocolo de exercício físico. Contudo, a dieta rica em gordura afetou de maneira limitada alguns dos parâmetros espermáticos avaliados, e o exercício físico aeróbico não exerceu impacto significativo sobre os efeitos do quadro experimental na função espermática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GREENWAY, F. L.; SMITH, S. R. The future of obesity research. **Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 976–982, out. 2000. DOI: 10.1016/s0899-9007(00)00406-8.
- THE GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **N Engl J Med**, v. 377, n. 1, p. 13–27, 6 jul. 2017. DOI: 10.1056/NEJMoa1614362.
- CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win?. **Adv Nutr**, v. 10, p. S4–S9, jan. 2019. DOI: 10.1093/advances/nmy055.
- CONWAY, B.; RENE, A. Obesity as a disease: no lightweight matter. **Obes Rev**, v. 5, n. 3, p. 145–151, ago. 2004. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2004.00144.x.

- MAYORAL, L.P-C. *et al.* Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. **Indian J Med Res**, v. 151, n. 1, p. 11-21, 2020. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_1768_17.
- KHULLAR, K.; AGARWAL, A.; PLESSIS, S. du. A hormonal, physical, and proteomic view of obesity-induced effects on male infertility and possible lifestyle modifications. **Asian Pac J Reprod**, v. 1, n. 2, p. 161-168, 2012. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60071-8](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60071-8).
- CANNARELLA, R. *et al.* Obesity and male fertility disorders. **Mol Aspects Med**, v. 97, p. 101273, jun. 2024. DOI: 10.1016/j.mam.2024.101273
- CALCATERRA, V.; ZUCCOTTI, G. Physical Exercise as a Non-Pharmacological Intervention for Attenuating Obesity-Related Complications in Children and Adolescents. **Int J Environ Res Public Health**, v. 19, n. 9, p. 5046, 21 abr. 2022. DOI: 10.3390/ijerph19095046.
- BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nat Rev Endocrinol**, v. 15, n. 5, p. 288–298, maio 2019. DOI: doi: 10.1038/s41574-019-0176-8.
- CRUJEIRAS, A. B.; CASANUEVA, F. F. Obesity and the reproductive system disorders: epigenetics as a potential bridge. **Hum Reprod Update**, v. 21, n. 2, p. 249–261, 2015. DOI: doi:10.1093/humupd/dmu060.
- BEST, D.; BHATTACHARYA, S. Obesity and fertility. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 24, n. 1, p. 5–10, 1 out. 2015. DOI: 10.1515/hmbci-2015-0023. DOI: 10.1515/hmbci-2015-0023.
- AMERATUNGA, D.; GEBEH, A.; AMOAKO, A. Obesity and male infertility. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 90, p. 102393, ago. 2023. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2023.102393.
- SERVICE, C. A. *et al.* The impact of obesity and metabolic health on male fertility: a systematic review. **Fertil Steril**, v. 120, n. 6, p. 1098–1111, dez. 2023. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2023.10.017.
- JACKSON, V. M. *et al.* Latest approaches for the treatment of obesity. **Expert Opin Drug Discov**, v. 10, n. 8, p. 825–839, 2015. DOI: 10.1517/17460441.2015.1044966.
- HIGUERA-HERNÁNDEZ, M. F. *et al.* Fighting obesity: Non-pharmacological interventions. **Clin Nutr ESPEN**, v. 25, p. 50–55, jun. 2018. DOI: 10.1016/j.clnesp.2018.04.005.
- JAKICIC, J. M.; DAVIS, K. K. Obesity and Physical Activity. **Psychiatr Clin North Am**, v. 34, n. 4, p. 829–840, dez. 2011. DOI: 10.1016/j.psc.2011.08.009.

- OPPERT, J.-M.; CIANGURA, C.; BELLICHA, A. Physical activity and exercise for weight loss and maintenance in people living with obesity. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 24, n. 5, p. 937–949, 2023. DOI: 10.1007/s11154-023-09805-5.
- SERMONDADE, N. *et al.* BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v. 19, n. 3, p. 221–231, 2013.
- LEVINE, H. *et al.* Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. **Hum Reprod Update**, v. 29, n. 2, p. 157–176, 2023. DOI: 10.1093/humupd/dmac035.
- KATIB, A. Mechanisms linking obesity with male infertility. **Cent European J Urol**, v. 68, p. 79-85, 2015. DOI: 10.5173/ceju.2015.01.435.
- SALLMÉN, M. *et al.* Reduced Fertility Among Overweight and Obese Men. **Epidemiology**, v. 17, n. 5, p. 520–523, set. 2006. DOI: 10.1097/01.ede.0000229953.76862.e5
- FERNANDES, C. J. C. *et al.* Short-term strength exercise reduces the macrophage M1/M2 ratio in white adipose tissue of obese animals. **Life Sci**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121916>.
- LIU, Y.; DING, Z. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. **Reproduction**, v. 154, n. 4, p. R123–R131, out. 2017. DOI: 10.1530/REP-17-0161.
- SULEIMAN, J. B. *et al.* Obesity-induced testicular oxidative stress, inflammation and apoptosis: Protective and therapeutic effects of orlistat. **Reprod Toxicol**, v. 95, p. 113–122, ago. 2020. DOI: 10.1016/j.reprotox.2020.05.009.
- WANG, H. *et al.* Fish Oil Ameliorates High-Fat Diet Induced Male Mouse Reproductive Dysfunction via Modifying the Rhythmic Expression of Testosterone Synthesis Related Genes. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 5, p. 1325, 29 abr. 2018. DOI: 10.3390/ijms19051325.
- FAN, W. *et al.* Obesity or Overweight, a Chronic Inflammatory Status in Male Reproductive System, Leads to Mice and Human Subfertility. **Front Physiol.**, n. 1117, v. 8, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2017.01117.
- MARTIN, D. M. V. *et al.* The Impact of Physical Exercise on Male Fertility. In: DU PLESSIS, S. S.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. S. (Ed.). **Male Infertility**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 47–60. DOI: 10.1007/978-1-4939-1040-3_4.
- HUGHES, D. C.; ELLEFSEN, S.; BAAR, K. Adaptations to Endurance and Strength Training. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 8, n. 6, jun. 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a029769.

- IBÁÑEZ, C. A. *et al.* A High Fat Diet during Adolescence in Male Rats Negatively Programs Reproductive and Metabolic Function Which Is Partially Ameliorated by Exercise. **Front Physiol**, v. 8, p. 807, 2 nov. 2017. DOI: 10.3389/fphys.2017.00807.
- NEMATOLLAHI, A. *et al.* Effect of aerobic exercise, low-fat and high-fat diet on the testis tissue and sperm parameters in obese and nonobese mice model. *Andrologia*, v. 51, n. 6, p. e13273, 2019. DOI: 10.1111/and.13273.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, nov. 1993. DOI: 10.1093/jn/123.11.1939.
- CINTRA, D. E. *et al.* Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30571, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0030571.
- ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **J Reprod Fertil**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1 set. 1978. DOI: 10.1530/jrf.0.0540103.
- MEISTRICH, M. L. Evaluation of Reproductive Toxicity by Testicular Sperm Head Counts. **J Am Coll Toxicol**, v. 8, n. 3, p. 551–567, maio 1989.
- TURGUT, G. *et al.* Effect of Overdose Zinc on Mouse Testis and Its Relation with Sperm Count and Motility. **Biol Trace Elem Res**, v. 96, n. 1–3, p. 271–279, 12 jun. 2003. DOI: 10.1385/BTER:96:1-3:271.
- BLAZAK, W.F.; TREINEN, K.A.; JUNIEWICZ, P.E. Application of testicular sperm head counts in the assessment of male reproductive toxicity. In: Chapin, R.E.; Heindel, J.J (ed.). **Methods in Toxicology: Male Reproductive Toxicology**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 86-94.
- FERREIRA, G. H. **Efeitos do estresse térmico na espermatogênese de camundongos: aspectos celulares e epigenéticos**. 2022. Dissertação (Mestrado em Biologia Química) - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2022.
- SU, Y. *et al.* Obesity Causes Abrupt Changes in the Testicular Microbiota and Sperm Motility of Zebrafish. **Front Immunol**, v. 12, p. 639239, 25 jun. 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.639239.
- CABLER, S. *et al.* Obesity: modern man's fertility nemesis. **Asian J Androl**, v. 12, n. 4, p. 480–489, jul. 2010. DOI: 10.1038/aja.2010.38.

- ROSETY, M. Á. *et al.* Exercise improved semen quality and reproductive hormone levels in sedentary obese adults. **Nutr Hosp**, v. 34, n. 3, p. 603-607, jun. 2017. DOI: 10.20960/nh.549.
- BUETTNER, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v. 36, n. 3, p. 485–501, jun. 2006. DOI: 10.1677/jme.1.01909. PMID: 16720718.
- HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutr Res Rev**, v. 23, n. 2, p. 270–299, dez. 2010. DOI: 10.1017/S0954422410000168.
- JING, J. *et al.* Obesity- induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction negatively affect sperm quality. **FEBS Open Bio**, v. 13, n. 4, p. 763–778, mar. 2023. DOI: 10.1002/2211-5463.13589.
- FERNANDEZ, C. D. *et al.* Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, n. 1, p. 32, 2011. DOI: 10.1186/1477-7827-9-32.
- FERNANDES, G. S. *et al.* Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 10, n. 1, p. 105, dez. 2012. DOI: 10.1186/1477-7827-10-105.
- ABEDPOOR, N.; TAGHIAN, F.; HAJIBABAIE, F. Exploring the dynamics of exercise intensity on male fertility and reproductive health: advancements and implications for fertility research. **Front Reprod Health**, v. 6, p. 1423916, 18 jul. 2024. DOI: 10.3389/frph.2024.1423916.
- PALMER, N. O. *et al.* Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 7, p. E768–E780, 2012. DOI:10.1152/ajpendo.00401.2011.0193-1849/12.
- OUCHI, N. *et al.* Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85–97, fev. 2011. DOI: 10.1038/nri2921.
- GONZALEZ-GIL, A. M.; ELIZONDO-MONTEMAYOR, L. The Role of Exercise in the Interplay between Myokines, Hepatokines, Osteokines, Adipokines, and Modulation of Inflammation for Energy Substrate Redistribution and Fat Mass Loss: A Review. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1899, 26 jun. 2020. DOI: 10.3390/nu12061899. PMID: 32604889.
- OBRADOVIC, M. *et al.* Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. **Front Endocrinol**, v. 12, p. 585887, 18 maio 2021. DOI: doi: 10.3389/fendo.2021.585887.

CUI, H.; LÓPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 6, p. 338–351, jun. 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2016.222.

BIASON- LAUBER, A.; ZACHMANN, M.; SCHOENLE, E. J. Effect of Leptin on CYP17 Enzymatic Activities in Human Adrenal Cells: New Insight in the Onset of Adrenarche. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1446–1454, 1 abr. 2000. DOI: 10.1210/endo.141.4.7402.