



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

VANESSA REAME

**“EFEITOS DO EXCESSO DE LIPÍDIOS SATURADOS E DA
CURCUMINA NA DIETA MATERNA SOBRE OS PARÂMETROS
REPRODUTIVOS DE RATOS MACHOS ADULTOS”**

CAMPINAS

2020

VANESSA REAME

**“EFEITOS DO EXCESSO DE LIPÍDIOS SATURADOS E DA
CURCUMINA NA DIETA MATERNA SOBRE OS PARÂMETROS
REPRODUTIVOS DE RATOS MACHOS ADULTOS”**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do Título
de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na
área de Biologia Celular.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. REJANE MAIRA GÓES

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA VANESSA REAME E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. REJANE MAIRA GÓES.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R23e Reame, Vanessa, 1988-
Efeitos do excesso de lipídios saturados e da curcumina na dieta materna sobre os parâmetros reprodutivos de ratos machos adultos / Vanessa Reame.
– Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Rejane Maira Góes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dieta hiperlipídica. 2. Polifenóis. 3. Motilidade espermática. 4. Rato - Reprodução. 5. Suplementação alimentar. 6. Óleo de milho. I. Góes, Rejane Maira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of the maternal diet enriched with saturated lipid and curcumin on reproductive parameters of adult male rats

Palavras-chave em inglês:

Diet, High-fat

Polyphenols

Sperm motility

Rats - Reproduction

Supplementary feeding

Corn oil

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Rejane Maira Góes [Orientador]

Raquel Vaz Hara Jardim

Caroline Maria Christante

Celina de Almeida Lamas

Ellen Cristina Rivas Leonel

Data de defesa: 31-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9587-002X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4057780556319271>

Campinas, 31 de janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Profa. Dra. Raquel Vaz Hara Jardim

Profa. Dra. Caroline Maria Christante

Profa. Dra. Celina de Almeida Lamas

Profa. Dra. Ellen Cristina Rivas Leonel

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Rejane Maira Góes, pela oportunidade, pela confiança, pelo apoio e por todos os ensinamentos a mim transmitidos que permitiram a conclusão deste trabalho. Obrigada por ter contribuído com o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Ao querido Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pelo espaço cedido em seu laboratório e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni e Profa. Dra. Caroline Maria Christante pela disponibilidade e contribuições valiosas.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Raquel Vaz Hara, Profa. Dra. Caroline Maria Christante, Profa. Dra. Celina de Almeida Lamas, Profa. Dra. Ellen Rivas Leonel, Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Livia Cuquetto Leite e Profa. Dra. Mariana Marcielo de Jesus pela disponibilidade, pela atenção dispensada e pelas contribuições para o aprimoramento e a finalização deste trabalho.

À UNICAMP e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp e todos os docentes por me acolherem e contribuírem com minha formação. Meu agradecimento especial à Lílíam Alvez Senne Panagio, secretária do Programa quando eu ingressei no Doutorado, por todo profissionalismo e eficiência e principalmente pelo carinho, mesmo a longas distâncias.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro a mim concedido (Processo nº 2015/15709-0).

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE-UNESP, por me acolher nos últimos 10 anos e por ter disponibilizado o espaço físico para a realização deste trabalho.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM), Luiz Roberto Falleiros Junior, pela amizade, pela ajuda prestada e por trazer alegria e leveza ao ambiente de trabalho.

A todos do Laboratório de Histofisiologia da Reprodução e Desregulação Endócrina (HRDE): Tatiane, Gustavo, Guilherme, Alana, Carol Negrin, Mari Marcielo, Carol C, Joyce. Obrigada pela companhia, convivência, colaboração e apoio em todos os momentos. Agradeço por proporcionarem um ambiente de trabalho tranquilo e acolhedor, sempre com muita alegria. Com certeza todos fazem parte deste trabalho de alguma forma.

A todos do Laboratório de Microscopia e Microanálises (LMM): Prof. Dr. Sebastião Taboga, Profa. Dra. Patrícia Vilamaior, Luiz Roberto, Simone, Ellen, Camila, Luiz Henrique, Nayara, Fernanda, Carol Bedolo, Mariele e Juliana. Obrigada pela companhia, convivência,

incentivo, espírito colaborativo e por proporcionarem um ambiente de trabalho confortável e divertido.

Agradecimentos especiais

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades concebidas, por guiar e iluminar meus passos nesse caminho. Por ser meu protetor e me dar forças em todos os momentos.

Aos meus pais, Cleiner e Gislaine, pelo amor incondicional, por todo o apoio, suporte, paciência, dedicação e amizade, sem vocês não teria sido possível. Obrigada por permitirem que esse sonho se tornasse realidade, por todo o amor e cuidado com meu filho para que eu pudesse concluir o meu trabalho. Obrigada por serem tão maravilhosos e acreditarem em mim sempre. Obrigada por me acalmarem nos momentos de desespero e serem minha base sólida. Vocês são meu porto seguro, meus exemplos de vida. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu marido Túlio, por ser meu companheiro em todos os momentos. Obrigada por estar sempre tão presente. Obrigada por toda a compreensão e pelo cuidado e amor ao nosso filho nos momentos de correria. Obrigada por tornar isto possível, pela dedicação, amor, carinho. Obrigada por não me deixar desistir e ser meu suporte. Seu amor é fundamental na minha vida. Te amo!

Ao meu filho, Murillo, que nasceu praticamente junto com o início do doutorado e me deu forças para lutar e não desistir. Obrigada filho, por me motivar a ser uma pessoa melhor e mais madura. Obrigada por esse amor incondicional e por fazer me sentir a pessoa mais incrível do mundo, com sua alegria, carinho e sorrisos que sempre me amparam e me fortalecem. Por você e nossa família busco sempre por um futuro melhor. Amo infinito!

Aos meus irmãos, Priscila e Cleiner Neto, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e tornando a vida mais prazerosa, é muito bom ter irmãos para compartilhar a vida.

À minha amada sogra, Tânia, por todo o esforço em viajar de Monte Aprazível até Rio Preto para cuidar do meu filho e me ajudar com todo o amor e carinho, a conclusão desse trabalho não teria sido possível sem sua ajuda e compreensão.

Às minhas amigas de laboratório, graduação, pós-graduação e da vida, Júlia e Simone, por todos os momentos de alegria e desespero compartilhados, pelo carinho e compreensão que me ampararam sempre que precisei. Sou eternamente grata a Deus por ter colocado vocês em meu caminho. Amo muito vocês!

Às minhas amigas de laboratório que ficaram para a vida toda, Carol Negrin, Maê e Mari Marcielo, por todo o carinho, companheirismo e pela amizade. Amo vocês!

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa importante jornada, em especial à minha família.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.
John F. Kennedy

RESUMO

Distúrbios no ambiente intrauterino afetam o metabolismo fetal e a vida subsequente da prole. Estudos mostram que dietas ricas em gordura podem ter impacto negativo sobre os parâmetros reprodutivos masculinos, enquanto que o consumo da curcumina, que é um polifenol com potencial indutor de mudanças epigenéticas e múltiplas atividades funcionais, pode ter um impacto positivo na saúde. Assim, este estudo avaliou se o consumo materno de dieta rica em banha leva a alterações reprodutivas e metabólicas na prole masculina de ratas e se a curcumina interfere nessa programação do desenvolvimento. Foram utilizados ratos machos Wistar (12 semanas de idade) divididos, segundo o regime e suplementação alimentar das mães, nos grupos: C (controle) – dieta padrão para roedores; L - dieta rica em banha de porco (31% de banha); O - dieta padrão e suplementação com óleo de milho (0,1ml/100 g de peso corporal – veículo de diluição); Cm - dieta padrão e suplementação com óleo de milho contendo 100mg/kg de curcumina; LCm - dieta rica em banha e suplementação com óleo de milho/curcumina. O regime alimentar das mães iniciou-se na 8ª semana de vida, prosseguiu até a 12ª, quando foram acasaladas com ratos machos alimentados com dieta padrão, e prosseguiu até o desmame dos filhotes (21 dias de idade). O óleo de milho contendo ou não a curcumina foi administrado via gavagem dia sim, dia não por todo esse período. Foram avaliados os parâmetros biométricos e metabólicos das mães, ao desmame, e da prole. Para a prole foram realizadas contagens espermáticas, análise da motilidade espermática e de marcadores de estresse oxidativo do testículo. Os dados obtidos permitem concluir que o excesso de lipídios saturados na dieta materna durante a gestação/lactação não altera a produção e reserva espermática, nem causa prejuízos metabólicos na prole, mas prejudica a motilidade espermática. A suplementação alimentar das mães com pequenas doses de óleo de milho, durante esse período, foi ainda mais prejudicial para a motilidade de espermatozoides da prole. A curcumina evita os prejuízos da motilidade espermática causados na prole pelo consumo de dieta rica em banha e pela suplementação com óleo de milho e este fato pode estar relacionado à preservação do metabolismo lipídico e da defesa antioxidante testicular. Adicionalmente, analisamos se houve alterações na glândula adrenal nos grupos C, L e O. O peso absoluto das adrenais foi maior no grupo em que as mães ingeriram a dieta rica em banha, do que em C e O. Houve aumento no comprimento de área das três zonas da adrenal no grupo L, quando comparados aos grupos C e O, enquanto que o grupo O teve aumento da zona glomerular e diminuição da zona reticular, em relação a C e L. Como não houve variação do nível sérico de corticosterona entre os grupos, serão necessárias novas análises para concluir sobre os efeitos da dieta materna rica em banha ou da suplementação com óleo de milho, durante a gestação e lactação, na adrenal da prole masculina.

ABSTRACT

Disturbances in the intrauterine environment affect fetal metabolism and subsequent offspring's life. Studies show that diets high in fat can have a negative impact on male reproductive parameters, while consumption of curcumin, which is a polyphenol with the potential to induce epigenetic changes and multiple functional activities, can have a positive impact on health. So, this study evaluated whether the maternal consumption of consumption of a lard enriched diet leads to reproductive and metabolic changes in male rat offspring and whether curcumin interferes with this developmental programming. Male Wistar rats (12 weeks of age) were divided according to the mothers' diet and supplementation (gestation and lactation) in C — balanced diet for rodents (standard diet); L — lard enriched diet (31% of lard); O — standard diet supplemented with corn oil as dilution vehicle (0.1ml/100g body weight, every other day); Cm — standard diet supplemented with corn oil containing curcumin (100mg / kg body weight every other day); and LCm — lard-enriched diet supplemented with corn oil/curcumin. Mothers' diet began at week 8, continued until week 12, when they were mated with standard-fed male rats, and continued until weaning (21 days old). Corn oil containing or not curcumin was administered via gavage every other day. Biometric and metabolic parameters of mothers, at weaning, and of offspring were evaluated. For the offspring, in addition to the testicular and epididymal weight, sperm counts, analysis of sperm motility and testicular oxidative stress markers were performed. Data obtained led us to conclude that excessive saturated lipids in the maternal diet during gestation/lactation does not alter sperm production and reserve, nor cause metabolic damage to the offspring, yet impair sperm motility. Dietary supplementation of mothers with small doses of corn oil, during this period, was even more detrimental to the sperm motility of the offspring. Curcumin prevents damage to sperm motility caused on offspring by maternal intake of a lard enriched diet and supplementation with corn oil and this fact may be related to the preservation of lipid metabolism and testicular antioxidant defense. Additionally, we analyzed whether there were changes in the adrenal gland in groups C, L and O. The absolute weight of the adrenals was higher in the group in which the mothers were subjected to the high fat diet, than in C and O groups. There was an increase in the length of area of the three adrenal zones in group L when compared to C and O groups, while O group had increased glomerular zone and decreased reticular zone, in relation to C and L. As there was no variation in the serum level of corticosterone among groups, new analyzes will be necessary to conclude on the effects of the maternal lard enriched diet or the supplementation with corn oil, during pregnancy and lactation, on the adrenal of the male offspring.

Sumário

I. INTRODUÇÃO	12
Espermatogênese e programação do desenvolvimento	12
Dieta rica em lipídios e seus efeitos	14
Curcumina e suas propriedades	15
II. OBJETIVO	17
III. RESULTADOS	17
III.1. MANUSCRITO.....	18
RESUMO	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1. Animais e delineamento experimental	22
2. Parâmetros biométricos e metabólicos	24
3. Processamento dos testículos	25
4. Avaliação histológica	26
5. Parâmetros espermáticos	26
6. Estresse Oxidativo.....	27
7. Análises estatísticas.....	28
RESULTADOS	29
1. Efeitos metabólicos sobre as mães	29
2. Efeitos metabólicos sobre a prole.....	29
3. Efeitos reprodutivos	29
DISCUSSÃO	30
1. Efeitos metabólicos	31
2. Efeitos reprodutivos	33
CONCLUSÃO.....	36
TABELA	37
FIGURAS	38
REFERÊNCIAS	46
III.2. OUTROS RESULTADOS	54
III.2.1. INTRODUÇÃO.....	54
III.2.2. OBJETIVO	54
III.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
Animais e delineamento experimental	54
Parâmetros biométricos e metabólicos	55
Processamento das adrenais e análises morfológicas.....	56

Análises estatísticas	56
III.2.4. RESULTADOS	57
Efeitos nos parâmetros biométricos da glândula adrenal e na dosagem de corticosterona sérica.....	57
Efeitos na morfometria do córtex da glândula adrenal.....	57
III.2.5. DISCUSSÃO	58
TABELA	59
FIGURAS	60
IV. REFERÊNCIAS	64
V. ANEXOS	69
V.1. CERTIFICADO DO CEUA	69
V.2. DECLARAÇÃO DOS DIREITOS AUTORAIS	70

I. INTRODUÇÃO

Espermatogênese e programação do desenvolvimento

O desenvolvimento testicular requer a proliferação e a diferenciação das células de Sertoli, das células de Leydig e das células germinativas (Orth, 1982; Boulogne et al., 1999; Mendi-Handagama e Ariyaratne, 2001). As células de Sertoli estão localizadas no interior dos túbulos seminíferos e apresentam estrutura complexa, onde há uma íntima associação entre seu citoplasma e os diversos tipos de células germinativas do epitélio seminífero (Russel, 1993). Esta associação entre célula germinativa-célula de Sertoli constitui o que denominamos de ciclo do epitélio seminífero, que possui divisão em estádios, cuja quantidade varia entre as espécies e são definidos pelas características morfológicas das espermatídes presente em cada um (Leblond e Clermont, 1952). O ciclo do epitélio seminífero do camundongo possui 12 estádios, o do rato 14 e o do humano 6 (Russel et al., 1990). As células de Sertoli maduras são terminalmente diferenciadas e perdem a capacidade proliferativa (Solari e Fritz, 1978; Sharpe et al., 2003). Na maioria das espécies, essas células passam por duas etapas de proliferação, uma no período fetal ou neonatal e outra na puberdade, mas em roedores estes períodos se sobrepõem, e assim toda a proliferação ocorre no período fetal e neonatal (Sharpe et al., 2003). O número de células germinativas que cada célula de Sertoli suporta é fixo para a espécie, assim, a quantidade de células de Sertoli no testículo determinará o número de espermatozoides produzidos na vida adulta (Orth et al., 1988; Russell et al., 1990; Sharpe et al., 2003). As células de Leydig estão envolvidas na secreção de androgênios, principalmente a testosterona, e se encontram localizadas no tecido intersticial, que também contém vasos sanguíneos e linfáticos, essenciais para o transporte de hormônios e nutrientes dentro e fora do testículo (Christensen, 1975). Sabe-se que a diferenciação da população de células de Leydig adulta inicia-se durante o período pré-puberal, sendo regulada por diversos fatores ao longo do seu desenvolvimento, os quais são susceptíveis às perturbações no eixo hipotálamo-hipófise-gônada e na sinalização parácrina (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007).

A espermatogênese é um processo complexo e bem organizado de diferenciação celular responsável pela formação dos espermatozoides a partir de células germinativas primordiais, as espermatogônias, que permanecem quiescentes nos túbulos seminíferos até a puberdade (Guraya, 1987). A diferenciação testicular e eventos como a proliferação das

células de Sertoli e proliferação e diferenciação das células germinativas fetais ocorrem durante o período fetal e são de suma importância para que haja sucesso na espermatogênese, a qual se inicia a partir da puberdade (Sharpe et al., 2010). Perturbações, como o impacto ambiental e os fatores do estilo de vida materno, durante o período fetal, podem afetar a qualidade da espermatogênese na vida adulta da prole (Fig. 1) (Sharpe et al., 2010).

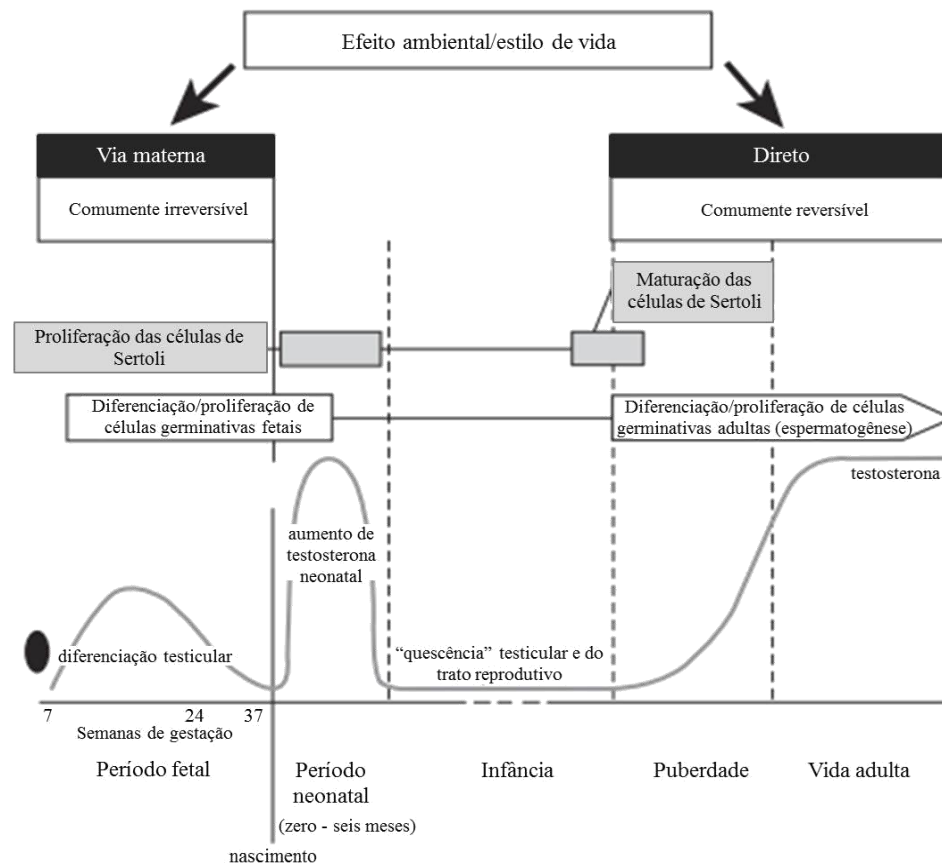


Fig 1. Fases do desenvolvimento e função dos testículos nos quais fatores ambientais / estilo de vida podem causar um impacto negativo na espermatogênese e na contagem de espermatozoides em homens. Figura retirada e modificada de Sharpe et al. (2010).

Existem evidências crescentes de que distúrbios no metabolismo materno e no ambiente intrauterino afetam o metabolismo fetal e a vida subsequente da prole. Vários estudos indicam que os efeitos epigenéticos induzidos durante o período perinatal produzem adaptações persistentes na estrutura, fisiologia e metabolismo de diversos órgãos (Armitage et al., 2005; Symonds, 2007; White et al., 2009). Esse processo, segundo o qual um estímulo agudo ou crônico durante a gestação ou no período perinatal estabelece uma resposta permanente que pode prejudicar o funcionamento de certos sistemas, é conhecido como programação do desenvolvimento (Symonds e Budge, 2009).

Um aspecto importante que atinge a programação do desenvolvimento é o estado nutricional da mãe e engloba fatores como o consumo alimentar materno, o fluxo sanguíneo para a placenta e útero, assim como a expressão dos genes fetais (Kwon e Kim, 2017). Para entender os mecanismos subjacentes à programação do desenvolvimento, vários modelos animais em que o ambiente hormonal e metabólico pré ou peri-natal é alterado por meio de mudanças no estado nutricional materno vêm sendo utilizados (Armitage et al., 2005; Férézou-Viala et al., 2007; Tamashiro et al., 2009; White et al., 2009). Estudos clínicos também sugerem que a obesidade materna e o diabetes gestacional podem predispor o feto a desenvolver síndrome metabólica ao longo da vida (Ramsay et al., 2002; Gluckman e Hanson, 2004). As evidências acumuladas até o momento indicam que os hormônios perinatais, particularmente insulina e leptina, representam sinais-chaves que programam o desenvolvimento e a função do hipotálamo e exercem efeitos duradouros sobre a regulação do peso corporal e da homeostase da glicose (Bouret, 2009). A exposição fetal aos níveis de ácidos graxos livres da mãe pode induzir estresse no retículo endoplasmático e inflamação, com um aumento subsequente das citocinas locais no hipotálamo (Mighiu et al., 2012; Thaler et al., 2012; Milanski et al., 2012).

Dieta rica em lipídios e seus efeitos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 39% dos adultos de todo o mundo (maiores de 18 anos) estavam acima do peso e 18% das crianças e adolescentes (de 5 a 19 anos) estavam com sobrepeso ou obesas em 2016 (WHO, 2019). Além de a obesidade estar intimamente ligada a doenças como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer (Guh, 2009), também há vários relatos sobre seus efeitos negativos na função reprodutiva (Hajer et al., 2008; Hammoud et al., 2008; Kasturi et al., 2008). Os níveis lipídicos maternos podem influenciar no desenvolvimento do tecido adiposo (Amri et al., 1994; Taylor e Poston, 2007). Em um estudo com humanos, verificou-se que mães com sobrepeso e obesidade e mães com níveis de ácidos graxos livres pronunciados durante o início da gravidez foram mais propensas a ter filhos com excesso de peso ou obesidade na idade de 5-6 anos (Gademan, 2014). Assim, as perturbações na diferenciação dos adipócitos podem ter consequências ao longo da vida sobre a adiposidade da prole e sobre alguns órgãos.

A obesidade masculina em humanos na idade adulta pode causar alterações nos parâmetros seminais, especialmente na concentração e na contagem total de espermatozoides, na morfologia espermática e na fragmentação do DNA (Kort et al., 2006; MacDonald et al., 2010), e pode levar ao aumento nas taxas de infertilidade (Guzick et al., 2001; Kort et al.,

2006). Tais efeitos adversos são direcionados por vários mecanismos, mas geralmente envolvem alterações do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Pasquali et al., 2007; Hammoud et al., 2008; Kasturi et al., 2008). Homens obesos apresentam um perfil hormonal específico caracterizado por hipogonadotrofia, hipotestosteronemia e hiperestrogenemia, devido à diminuição dos níveis de gonadotrofinas, das proteínas de ligação dos hormônios sexuais (SHBG- “sexual hormone binding globulins”) e consequente redução da síntese e secreção de testosterona, além do aumento dos níveis de estrógeno (Stellato et al., 2000). Um estudo baseado em um modelo experimental com indução de obesidade por dieta hiperlipídica mostrou que esse distúrbio pode afetar a qualidade dos espermatozoides de ratos machos, reduzindo a motilidade dos mesmos, sem afetar outros parâmetros (Fernandez et al., 2011). Nesse caso, a baixa qualidade dos espermatozoides causou uma pequena redução no potencial de fertilidade, mostrando que a obesidade pode levar à diminuição na fertilidade masculina (Fernandez et al., 2011). Em outro trabalho com ratos machos induzidos à obesidade por glutamato no período neonatal houve diminuição da produção de espermatozoides e da reserva espermática na idade adulta, além de ter causado uma aceleração do tempo de trânsito dos espermatozoides, o que pode ter implicações para a qualidade do sêmen (Fernandes et al., 2012). Reame et al (2014) constataram a redução do número de espermátides por testículo, da produção diária de espermatozoides (DSP) e da reserva espermática em ratos adultos, filhos de mães obesas que foram alimentadas com dieta rica em lipídios insaturados, durante a gestação e a lactação, além de reduzir o nível sérico de testosterona e aumentar o nível sérico de leptina nos mesmos.

Curcumina e suas propriedades

Os componentes da dieta também podem ter um impacto positivo na saúde, como é o caso de alimentos implicados na redução dos níveis de colesterol. Um desses produtos alimentares cujas propriedades terapêuticas vêm sendo crescentemente investigadas é a curcumina, um tempero indiano usado como conservante, corante alimentar e em fitoterapia (Maheshwari et al., 2006). A curcumina é obtida a partir do rizoma da *Curcuma longa*, também conhecido como açafrão-da-Índia (Ammon e Wahl, 1991). A curcumina tem atividade antioxidante e anti-inflamatória, melhora a cicatrização de feridas, modula a angiogênese, tem efeitos anti-câncer (Maheshwari et al., 2006) e ação hipocolesterolêmica (Maithilikarpagaselvi et al., 2016a). A curcumina pode atuar como um inibidor das ciclo-oxigenases e lipoxigenases (Huang et al., 1997; Joe e Lokesh, 1997). As enzimas lipoxigenases catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos polinsaturados

(Axelrod et al., 1981) e a produção de leucotrienos e lipoxinas, que medeiam respostas alérgicas e inflamatórias (Samuelsson et al., 1987). Há indícios de que a curcumina, ou um produto de degradação da própria, pode ligar-se à cavidade central do sítio ativo de lipoxigenases, atuando como um inibidor competitivo (Began et al., 1998) ou como um substrato (Skrzypczak- Jankun et al., 2000), porém os mecanismos moleculares para a sua inibição não são bem compreendidos.

O tratamento com curcumina em ratos Wistar com hiperlipidemia e esteatose hepática, induzidas por dieta rica em frutose, melhorou o metabolismo lipídico e reduziu a esteatose hepática e a obesidade, devido à redução da expressão de enzimas lipogênicas ATP citrato-liase (ACLY), acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS) e da modulação de fatores de transcrição do receptor α do fígado tipo α (LXR- α) e proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1c) (Maithilikarpagaselvi et al., 2016a). Estes mesmos autores, utilizando esse mesmo modelo experimental, verificaram que a curcumina atenua a intolerância à glicose e a resistência à insulina, devido aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Maithilikarpagaselvi et al., 2016b). Ainda como exemplos de atividade antioxidante, foi verificado em ratos Wistar que a ingestão de kolaviron (um biflavonoide das sementes de *Garcinia kola*) e curcumina protegem contra danos oxidativos testiculares induzidos pelo di-n-butil ftalato (Farombi et al., 2007). A curcumina atenuou os danos teciduais, a morte apoptótica de células germinativas e o estresse oxidativo causado no testículo de ratos pelo diabetes induzido por estreptozotocina (Kanter et al., 2013).

Embora dados da literatura indiquem um papel positivo da curcumina, ainda existem muitas discrepâncias na indicação do seu uso com relação a dose e efeitos (Glombik et al., 2014), pois é uma substância pleiotrópica, com a capacidade de interagir com vários alvos e exercer seus efeitos através de vários mecanismos de ação (Segovia et al., 2014). A curcumina tem pouca biodisponibilidade (Segovia et al., 2014) e uma das dosagens comumente utilizadas em estudos é de 100mg/kg do peso corporal (Sharma e Singh, 2010; Kanter et al., 2013; Lonare et al., 2015). Devido à sua natureza lipofílica, geralmente é administrada em veículos oleosos (Segovia et al., 2014). Um dos principais veículos diluidores de substâncias lipofílicas a serem administradas em modelos animais é o óleo de milho (Lonare et al., 2015; Negrin et al., 2018). Contudo, os componentes desses veículos também podem interferir nos tratamentos utilizados (Negrin et al., 2018), assim, essa interferência no metabolismo/ação da curcumina também merece ser investigada.

II. OBJETIVO

O presente estudo avaliou se o consumo materno de dieta rica em banha leva a alterações reprodutivas e metabólicas na prole masculina de ratas e se a curcumina interfere nessa programação do desenvolvimento.

III. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho originaram um manuscrito que foi submetido à revista “Nutrition” e futuramente iremos elaborar outro manuscrito baseado nos achados sobre a glândula adrenal.

III.1. MANUSCRITO

Effects of the maternal diet enriched with saturated lipid and curcumin on reproductive parameters of adult male rats

Vanessa Reame¹; Tatiane Pereira Scarpelli², Joyce Teixeira Correia², Gustavo Matheus Amaro², Ana Carolina Negrin¹, Maria Etelvina Pinto-Fochi³, Sebastião Roberto Taboga^{1,2}, Rejane Maira Góes^{1,2*}

¹Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP).

²Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP).

³União das Faculdades dos Grandes Lagos, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil (UNILAGO).

*Corresponding author at: Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. Telephone: +55 17 32212391, fax +55 1732212390.

Fontes de financiamento: Processo Fapesp 2015/15709-0.

Palavras-chave: programação do desenvolvimento testicular, motilidade espermática, polifenol, dieta rica em banha, suplementação com óleo de milho.

RESUMO

Distúrbios no ambiente intrauterino afetam o metabolismo fetal e a vida subsequente da prole. Dados recentes mostraram que a obesidade associada ao excesso de lipídios insaturados na dieta materna durante a gestação e lactação reduz a produção espermática da prole de ratos na idade adulta, sendo assim se torna relevante investigar a ação de lipídios saturados na dieta materna durante os mesmos períodos. A curcumina é um polifenol com reconhecido potencial indutor de mudanças epigenéticas e múltiplas atividades funcionais, incluindo a modulação do metabolismo lipídico. Este estudo avaliou se o consumo materno de dieta rica em banha leva a alterações reprodutivas e metabólicas na prole masculina de ratas e se a curcumina interfere nessa programação do desenvolvimento. Foram utilizados ratos machos Wistar (12 semanas de idade) divididos, segundo o regime e suplementação alimentar das mães (gestação e lactação), nos grupos: C – alimentadas com dieta padrão para roedores; L - alimentadas com dieta rica em banha de porco (31% de banha de porco); O - alimentadas com dieta padrão e suplementadas com óleo de milho via gavagem (0,1ml/100 g de peso corporal); Cm - alimentadas com dieta padrão e suplementadas com óleo de milho contendo 100mg/kg de curcumina; L_{Cm} - alimentadas com dieta rica em banha e suplementadas com óleo de milho/curcumina. Os dados obtidos permitem concluir que o excesso de lipídios saturados na dieta materna durante a gestação/lactação não altera a produção e reserva espermática, nem causa prejuízos metabólicos na prole, mas prejudica a motilidade espermática. A suplementação alimentar das mães com óleo de milho, foi ainda mais prejudicial para o testículo e para a motilidade de espermatozoides da prole do que o consumo materno de banha. A curcumina evita os prejuízos da motilidade espermática causados na prole pelo consumo de dieta rica em banha e pela suplementação com óleo de milho e esta melhora está relacionada à preservação do metabolismo lipídico e da defesa antioxidante testicular.

INTRODUÇÃO

A nutrição materna pode produzir adaptações persistentes na estrutura, fisiologia e metabolismo de diversos órgãos, um processo conhecido como programação do desenvolvimento [1–3]. A dieta materna rica em gordura durante a gestação pode levar a mudanças estruturais do hipotálamo, prejudicar a sinalização de insulina e leptina [4] e levar à obesidade e prejuízos na homeostase de glicose [5]. A obesidade materna e o diabetes gestacional também podem predispor o feto a síndrome metabólica e obesidade ao longo da vida [6–9]. Além disso, a exposição fetal a altos níveis de ácidos graxos livres da mãe pode induzir estresse no retículo endoplasmático e inflamação, com um aumento subsequente das citocinas locais no hipotálamo [10–12]. Portanto, existe um interesse crescente na “developmental origins of health and disease” e os mecanismos epigenéticos pelos quais a nutrição materna as propicia, em especial no que se refere à programação da adiposidade e do metabolismo lipídico [13–15]. Em contraste, as informações sobre os efeitos da dieta materna sobre a programação dos órgãos reprodutivos da prole são mais restritas.

O consumo de lipídios é responsável em grande parte pelo aumento da obesidade e de outros distúrbios metabólicos existentes no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 39% dos adultos de todo o mundo (maiores de 18 anos) estavam acima do peso e 18% das crianças e adolescentes (de 5 a 19 anos) estavam com sobrepeso ou obesas em 2016 [16]. Vários estudos indicam os efeitos negativos da obesidade sobre a função reprodutiva masculina [17–21]. Os estudos epidemiológicos com humanos são limitados quanto à capacidade de avaliar a contribuição da obesidade materna para o fenótipo da prole, pois é difícil separar os efeitos da exposição pré-natal daqueles resultantes do período pós-natal onde são compartilhados os fatores ambientais e genéticos. Além disso, conforme destacado por Drake et al. [22] é difícil, em estudos clínicos diferenciar quais efeitos são consequência da obesidade materna e quais são da super-nutrição materna ou dos componentes lipídicos específicos.

Recentemente, temos focado nos efeitos da obesidade materna, associada ao consumo de dieta rica em lipídios insaturados, em diferentes fases do desenvolvimento sobre a função testicular de ratos Wistar [23,24]. Os dados indicaram que o prejuízo para a produção espermática é mais grave quanto maior o grau de comprometimento metabólico secundário à obesidade e quanto menor a síntese de testosterona [23,24]. Assim, observou-se uma redução de ~30% na produção espermática quando a exposição ocorre desde a gestação até a vida

adulta. Notadamente, esses dados mostraram que a exposição durante a gestação e lactação reduz em ~17% a produção espermática desses roedores, indicando que a obesidade materna e o excesso de lipídios na gestação/lactação são tão prejudiciais para a eficiência espermática na idade adulta quanto a exposição ao ambiente nutricional lipídico por períodos prolongados, em fases posteriores do desenvolvimento. O desenvolvimento testicular durante o período fetal e perinatal é fundamental para o estabelecimento das bases da espermatogênese e da fertilidade na idade adulta, visto que é nessa fase que ocorre a proliferação das células de Sertoli e a diferenciação das células germinativas masculinas [25]. Neste sentido, também verificamos que o ambiente nutricional lipídico altera diferencialmente o ambiente parácrino testicular dependendo da fase de exposição, podendo alterar a dinâmica de reestruturação da barreira hematotesticular e junções entre células de Sertoli e células germinativas devido a alterações na expressão de citocinas, fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 e da conexina 43[26]. Neste contexto se torna relevante avaliar se os lipídios saturados de origem animal, como os da banha de porco, resultariam em prejuízos semelhantes para a função testicular.

Todavia, a alimentação também pode ter efeitos benéficos, como é o caso da curcumina (diferuloylmethane [1,7-bis(4-hydroxy 3-methoxy phenyl)-1,6- heptadiene-3,5-dione]) que é o principal pigmento polifenólico extraído da cúrcuma [27–29]. Esse composto tem um amplo espectro funcional, pois age em múltiplos alvos moleculares que modulam a atividade proliferativa, anticancerígena, morte celular, mecanismos anti-inflamatórios e o estresse oxidativo [30–32]. Também tem comprovada ação benéfica sobre o metabolismo lipídico [31]. O tratamento de ratos Wistar portadores de hiperlipidemia e esteatose hepática induzidas por uma dieta rica em frutose com curcumina melhorou o metabolismo lipídico, a esteatose hepática e a obesidade, devido à redução da expressão de enzimas lipogênicas ACLY (ATP citrato-liase), ACC (acetil-CoA carboxilase) e FAS (ácido graxo sintase) e da modulação de fatores de transcrição no fígado LXR- α (receptor α do fígado) e SREBP-1c (proteína 1C ligadora do elemento regulatório de esterol) [33]. Este mesmo autor, utilizando esse mesmo modelo experimental, verificou que a curcumina atenua a intolerância à glicose e a resistência à insulina, devido aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios [34]. Sabendo da ação antioxidante, anti-inflamatória e anticolesterolêmica da curcumina é importante avaliar sua interferência na metabolização de lipídios saturados consumidos pela mãe, durante a gestação e lactação, bem como os efeitos por si só na prole. Também vale ressaltar que devido ao seu amplo espectro funcional a curcumina pode ser considerada um modulador epigenético e várias evidências desta ação já foram comprovadas [13,35].

Nesse estudo nós investigamos se o consumo materno de dieta rica em banha leva a alterações reprodutivas e metabólicas na prole masculina de ratas e se a curcumina interfere nessa programação do desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e delineamento experimental

Ratos Wistar (25 machos e 25 fêmeas), com seis semanas de idade, foram obtidos da empresa Anilab - Animais de Laboratório e Comércio em Paulínia (SP) e mantidos no biotério do Centro de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, São José do Rio Preto (SP). Todos os procedimentos de manuseio e experimentação animal foram efetuados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (BDCA) – CONCEA e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP (CEUA Protocolo nº. 140/2016). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com substrato de maravalha em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C.

Os machos foram alimentados com ração padrão para roedores “*ad libitum*”, enquanto as fêmeas receberam dieta padrão até 8 semanas de idade e a partir de então foram divididas aleatoriamente para formar os cinco diferentes grupos. Os casais foram colocados para acasalar com 12 semanas de idade. O dia zero da gestação foi determinado a partir de esfregaço vaginal para constatação da presença de espermatozoides, realizado na manhã seguinte ao acasalamento. Durante a gestação e amamentação as fêmeas foram mantidas em caixas individuais e o regime alimentar e/ou suplementação com óleo/curcumina continuou na gestação e persistiu até o desmame dos filhotes (21 dias de idade). No dia do nascimento, o tamanho da ninhada foi reduzido para seis filhotes em todas as famílias, sendo utilizados de 2 a 3 filhotes de cada família. Portanto, neste estudo foram utilizados os filhos adultos (n=12 por grupo) cujas mães foram submetidas no período gestacional e lactacional a: **C** - dieta balanceada para roedores; **L**- dieta enriquecida com banha de porco, **O**- dieta balanceada e suplementação com veículo de diluição da curcumina, o óleo de milho (0,1ml/100g de peso corporal em dias alternados, via gavagem); **Cm** - dieta balanceada e suplementação com óleo

de milho contendo curcumina (100mg/kg de peso corporal, em dias alternados, via gavagem) e **LCm** - dieta enriquecida com banha de porco e suplementação com óleo de milho/curcumina.

A dieta padrão utilizada foi a AIN 93 (Instituto Americano de Nutrição) e a dieta hiperlipídica foi enriquecida com 31% de banha de porco (Prag Soluções Biotecnológicas, Jaú-SP) (Tab. 1). Esta última foi confeccionada com base na dieta AIN 93 e padronizada por Reeves [36] e vem sendo utilizada em outros estudos [37,38]. O óleo de milho (Copyright © Bunge, São Paulo –SP, Brasil) foi administrado via gavagem, dia sim dia não, na proporção de 0,1ml/100g do peso corporal do animal e sua composição encontra-se na Tabela 2. A curcumina (#C1386, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo-SP) foi administrada diluída na concentração 100mg/kg de peso corporal em 0,1ml de óleo de milho, dia sim dia não, à fim de não estressar os animais, no mesmo horário, às 12h.

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados por supra-dosagem de anestésico/analgésico (ketamina 180mg/kg e xilazina 25 mg/kg, em solução fisiológica via intra-peritoneal), seguida de decapitação para coleta de sangue e, então, submetidos à dissecação para retirada dos depósitos de gorduras, testículos e epidídimos.

Tabela 1. Composição das dietas padrão e hiperlipídica utilizadas. Valores referentes a 1 Kg de ração.

Ingredientes	Dieta Padrão (g)	Dieta Hiperlipídica (g)
Caseína	202	200
Sacarose	100	100
Amido de milho	397	115,5
Amido de milho dextrinizado	130,5	132
Banha de porco	-	312
Óleo de soja	70	40
Fibras	50	50
Mix de minerais AIN-93	35	35
Mix de vitaminas AIN-93	10	10
L-Cistina	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5

AIN, Instituto Americano de Nutrição.

Tabela 2. Tabela contendo a composição do óleo de milho utilizado no delineamento experimental.

Componentes	Porção 13 ml	VD*(%)
Carboidratos	0g	0
Proteínas	0g	0
Gorduras Totais	12g	22
Gorduras Saturadas	1,8g	8
Gorduras Trans	Não contém	**
Gorduras Monoinsaturadas	4,4g	**
Gorduras Poliinsaturadas	5,8g	**
Ômega 6 (ácido linoleico)	5,7g	**
Colesterol	0g	**
Fibra Alimentar	0g	0
Sódio	0mg	0
Vitamina E	4,3g	43
Valor Energético	108 kcal = 454kJ	5

Observação: * % Valores Diários (VD) de referências com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. ** VD não estabelecidos.

2. Parâmetros biométricos e metabólicos

Nesse estudo as ratas, mães, foram pesadas com 8 semanas de idade (início do tratamento) e periodicamente até o dia do desmame, no qual foram eutanasiadas. No dia da eutanásia, além do peso corporal, foi medida a circunferência abdominal, para a verificação da inferência de deposição de gordura no abdômen. A dosagem da glicemia foi realizada de manhã e em jejum pelo sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Chek Active” (Roche Diagnostics), a partir de gotas de sangue retiradas da região cervical. Para o cálculo do índice de adiposidade as gorduras retroperitoneal e visceral foram isoladas e pesadas de acordo com os procedimentos usados para o camundongo [39] e o rato [40]. Assim, o índice de adiposidade foi expresso em porcentagem e estimado a partir da fórmula: [(soma do peso das gorduras retroperitoneal e visceral) / peso corporal x 100]. O perfil lipídico foi dosado a partir de amostras de soro sanguíneo para avaliação dos níveis de colesterol total, HDL, não-HDL e triglicerídeos através de testes enzimáticos (In vitro Diagnóstica Ltda, Itabira, MG, Brasil), no qual foram utilizadas ao menos quatro ratas de cada grupo e cada amostra foi analisada em triplicata em Espectro Thermo Scientific Evolution 300. Com isso, a razão

triglicérides/HDLcolesterol (TC/HDL colesterol) foi calculada como prenunciador da resistência à insulina [41].

Os ratos machos tiveram seu peso corporal e circunferência abdominal verificados ao desmame e no dia da eutanásia, com 12 semanas de vida. O peso úmido do testículo e do epidídimo foram determinados após a dissecação dos mesmos. A glicemia foi dosada pela manhã em jejum, do mesmo modo como descrito para as fêmeas. O índice de adiposidade também foi verificado para os machos, através da soma das pesagens isoladas das gorduras retroperitoneal, visceral e epididimal dividido pelo peso corporal x 100, para expressão em porcentagem [39, 40]. Além disso, o índice gonadossomático (IGS) foi calculado com base na massa corporal e testicular, a partir da seguinte fórmula: $IGS = [(Peso\ testicular / Peso\ corporal) \times 100]$. Para a dosagem hormonal amostras de sangue, coletadas no momento da decapitação, foram centrifugadas e estocadas a -80°C para posterior análise. Os níveis sorológicos de testosterona foram quantificados por ELISA (R&D Systems – #KGE010 Minneapolis, MN, EUA) onde cada amostra foi analisada em duplicata e as leituras foram realizadas em leitor Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek Instruments, Inc.). As dosagens séricas de estradiol foram realizadas pelo método de quimioluminescência no Laboratório CIAPAV (Centro de Análises e Patologia Veterinária) de São José do Rio Preto-SP, sob a responsabilidade do médico veterinário Me. Rodrigo Storti Pereira. O perfil lipídico dos ratos também foi analisado como descrito para as fêmeas, sendo utilizado 10 animais de cada grupo.

3. Processamento dos testículos

Ratos foram anestesiados com Ketamina (800µl/kg) e Xilasina (200µl/kg), os testículos e os epidídimos direitos foram removidos e congelados. Em seguida, os testículos esquerdos foram removidos e fixados por imersão em fixador Bouin [42] durante 12 horas, fragmentados e lavados por vários dias em álcool 70% para remoção do excesso de ácido pícrico. Foram, então, processados para inclusão em Paraplast (Merck, Darmstadt, Alemanha) em processador TP1020 (Leica Microsystems Brasil, Shanghai, China). Os cortes histológicos em parafina (4µm de espessura) foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para estudos morfológicos gerais.

4. Avaliação histológica

O descolamento de células do epitélio seminífero (n=6 por grupo) foi analisado em um corte histológico de testículo para cada animal. A seção histológica inteira foi examinada e o número de túbulos seminíferos contendo despreendimentos de células em seu lúmen foram contados e expressos como porcentagem do número total de túbulos seminíferos da seção. As lâminas histológicas foram analisadas em câmera BX61VS (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) acoplada ao scanner de lâminas V5110-SH5, do mesmo fabricante, e as imagens foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss-Jenaval, acoplado com câmera digital CCD e Sistema de aquisição e de Imagens.

Através de métodos morfométricos (n=4 por grupo) foram examinados os diâmetros dos túbulos seminíferos dos testículos de rato. Para isso, foram medidos 20 túbulos em corte transversal por animal utilizando-se o aumento de 100x. As lâminas histológicas foram analisadas em câmera BX61VS (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) acoplada ao scanner de lâminas V5110-SH5, do mesmo fabricante, e as imagens foram obtidas por meio do software Olyvia 2.4.

5. Parâmetros espermáticos

a) Produção diária de espermatozoides e tempo de trânsito no epidídimo

Foram feitas estimativas da produção testicular diária de espermatozoides, da eficiência espermática e do tempo de trânsito dos espermatozoides nas regiões da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo. Para as contagens espermáticas no testículo e no epidídimo, as espermátides testiculares resistentes à homogeneização e os espermatozoides da cabeça/corpo e da cauda do epidídimo foram quantificados como descrito anteriormente [43], com as adaptações de Kempinas e cols. [44]. Assim, o testículo direito sem a túnica albugínea foi pesado logo após a coleta e congelado. Posteriormente, foi homogeneizado em 5mL de NaCl 0,9% contendo TritonX100 0,5%, seguido por sonicação por 30 s. As amostras obtidas foram diluídas 10 vezes e transferidas para câmaras de Neubauer. Foram contadas as espermátides maduras no estágio 19 da espermiogênese, e as análises foram realizadas em quadruplicata, por animal. A produção testicular diária de espermatozoide (DSP) foi determinada pela divisão do número total de espermátides por testículo pelo número de dias

do ciclo do epitélio seminífero do rato em que as mesmas estão presentes (6,1 dias). Para determinar a eficiência do processo foi calculada a DSP por grama de testículo [45,46].

O epidídimo direito dos animais foi dividido em dois fragmentos um contendo a cabeça e o corpo e o outro a cauda. Esses fragmentos foram homogeneizados, diluídos 20 vezes e a contagem de espermatozoides realizada conforme descrito para o testículo. O tempo de trânsito dos espermatozoides através da cabeça/corpo ou da cauda do epidídimo foi calculado pela divisão do número total de espermatozoides em cada região pela DSP.

b) Motilidade dos espermatozoides

Os efeitos sobre a motilidade dos espermatozoides foram avaliados segundo procedimentos de Fernandez e cols. [40]. Imediatamente após a morte dos animais, ainda durante o sacrifício, as caudas dos epidídimos esquerdos dos animais foram coletadas. Os espermatozoides foram obtidos através de perfurações feitas com o auxílio de uma agulha em 1,0mL de Fluido Tubal Humano (IrvineScientific) a 34°C. Desse material uma pequena alíquota de solução espermática (10µL) foi depositada em uma câmara de Makler (Sefi-Medical, Haifa, Israel) aquecida a 34°C. Assim, a motilidade foi avaliada por estimativa visual, 100 espermatozoides por animal, em duplicata, em Microscópio de Contraste de Fase (Olympus BX60), em aumento de 200x. Os espermatozoides foram assim classificados: imóveis, móveis sem progressão do movimento e móveis com progressão do movimento.

6. Estresse Oxidativo

A atividade das enzimas catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) foi determinada em amostras do testículo. Para isso, fragmentos testiculares foram pesados e armazenados em -80°C. Posteriormente, foram homogeneizados em 1:4 peso/volume de tampão TRIS-HCl (0,2mM, pH 7,5) contendo EDTA 1mM, DTT 1mM, sacarose 0,5M e KCl 0,15M, e centrifugados a 10.000 g por 20 minutos a 3°C. O sobrenadante foi então centrifugado a 50.000 g por mais 60 minutos à 1°C. A nova fração sobrenadante foi coletada e usada para a mensuração da atividade enzimática.

A atividade da CAT foi quantificada a 240 nm pela decomposição de H₂O₂, de acordo com o método de Beutler [47]. A atividade de GPx foi avaliada pela oxidação de NADPH, associada com a redução de glutathiona dissulfeto (GSSG) pelo excesso de glutathiona redutase, a 340 nm, como descrito por Sies et al. [48]. A constante de extinção molar (ϵ) foi usada para calcular os níveis de atividade de enzimas em U/mg de proteína ($\epsilon = 0,071$ para CAT and $\epsilon =$

9,6 para GPx). A atividade de SOD foi mensurada a 450 nm pelo kit da Sigma-Aldrich (No. 19160, MO, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O conteúdo total de proteínas nas amostras foi determinado pelo método de Bradford [49].

Como marcador de oxidação, em amostras de plasma sanguíneo e em fragmentos de testículos, foram mensurados os níveis de adutos coloridos produzidos pela reação de biomoléculas oxidadas com ácido tiobarbitúrico (TBA) [50].

Amostras de plasma foram obtidas após centrifugação do hemolisado (850 g, 10 min). Os fragmentos testiculares foram pesados e homogeneizados em tampão TRIS-HCL (0,1M; pH8) (volume 1:3). Em seguida, 300µL de 0,2M HCL contendo 0,4% de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) foi adicionada às amostras homogeneizadas e estas foram incubadas por 40 minutos em 90 °C. Após esse tempo foram incubadas no gelo para interromper a reação. Sequencialmente, o produto colorido originado da ligação MDA-TBA foi extraído com 600uL de n-butanol, seguida por centrifugação a 2500 g à 20°C por 5 minutos e quantificação a 532 nm. O sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação de biomoléculas oxidadas. Os produtos foram detectados por espectrofotometria (leitor de microplaca SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, CA, EUA), de acordo com Uchiyama e Mihara [51]. Os dados foram expressos em concentração de pmol TBARs/g de tecido e pmol TBARs/mL de plasma.

7. Análises estatísticas

Os dados foram testados considerando os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, de acordo com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente, no software GraphPad Prism 6.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Os grupos que assumiram esses pressupostos (dados paramétricos) foram comparados aplicando one-way ANOVA seguido de Tukey (post hoc). Os dados que não se enquadraram nesses pressupostos (dados não paramétricos) foram comparados aplicando o teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (post hoc). Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

1. Efeitos metabólicos sobre as mães

O consumo da dieta rica em banha de porco (grupo L) não afetou o peso corporal, circunferência abdominal ou depósitos de gordura das mães (Fig.1), mas aumentou o índice de adiposidade em 80%, a glicemia em cerca de 93% e os níveis séricos de triglicerídeos em aproximadamente 49% em comparação a C (Fig. 2). A suplementação alimentar com o óleo de milho contendo curcumina (Cm) apresentou um aumento do peso corporal em relação a L e O, e dos depósitos de gordura retroperitoneal em relação a todos os outros grupos (Fig. 1C). A suplementação com óleo de milho/Curcumina, quando acompanhada da dieta rica em banha de porco (LCm), aumentou o índice de adiposidade (~118%), mas evitou o aumento da glicemia e dos triglicerídeos ocasionado pela dieta rica em banha de porco (Fig. 1A, Fig. 2 A e C).

2. Efeitos metabólicos sobre a prole

O consumo materno de dieta rica em banha (grupo L) não afetou os parâmetros biométricos, metabólicos e o perfil lipídico da prole adulta (Fig. 3 e Fig. 4). Por outro lado, a suplementação com óleo de milho/curcumina, seja com a dieta normal (Cm) ou com a dieta rica em banha (LCm) levou ao aumento do peso corporal da prole, quando comparado a C (Fig. 3A). Para o grupo LCm, tal alteração foi acompanhada de aumento no peso dos depósitos de gordura visceral e epididimal e do índice de adiposidade (Fig. 3B e D). O grupo LCm também apresentou aumento (~94%) nos níveis séricos de triglicerídeos e redução (~20%) nos de colesterol total em comparação com C (Fig. 4C). A suplementação materna apenas com óleo de milho (O) não levou a alterações nos parâmetros biométricos, porém levou a um aumento (~83%) nos níveis séricos de triglicerídeos comparado com C (Fig. 4C).

3. Efeitos reprodutivos

O peso testicular foi menor no grupo O em comparação a todos os outros grupos, enquanto que em LCm foi maior do que em C (Fig. 5A). O peso epididimal não sofreu alteração em nenhum grupo quando comparado ao controle, apenas houve uma diminuição em O, em relação a L, Cm e LCm (Fig. 5C).

Os níveis séricos de testosterona e de estradiol, a contagem espermática testicular ou DSP e a reserva espermática não foram alterados em nenhum grupo aqui estudado (Tab. 3). O

número total de espermatozoides na cabeça/corpo do epidídimo foi maior (~41%) no grupo em que houve suplementação materna com curcumina (Cm) do que em C, mas esse aumento não se manteve quando essa quantidade foi expressa por grama do órgão (Tab. 3). Enquanto que o grupo com suplementação materna apenas com óleo de milho (O) apresentou menor quantidade de número de espermatozoides por grama da cauda do epidídimo em comparação com C (~58%), Cm (~59%) e LCm (~56%), e ainda, menor número de reserva espermática em relação a Cm (~59%) e LCm (~51%) (Tab. 3), destacando a melhora no número de espermatozoides nesse órgão pela curcumina.

O consumo materno de dieta rica em banha prejudicou a motilidade dos espermatozoides, pois reduziu a taxa de espermatozoides com movimento progressivo (~23%) e aumentou a dos com movimento não progressivo (~67%), em relação a C (Fig. 6). Esse prejuízo foi ainda maior para o grupo da suplementação materna com óleo de milho (O: ~43% e ~118%, respectivamente), que além disso, teve aumento da taxa de espermatozoides imóveis (~32%) (Fig. 6). Entretanto, o acréscimo da curcumina tanto na suplementação das mães que consumiram dieta controle (Cm), quanto das mães que consumiram dieta rica em banha (LCm) manteve a taxa de espermatozoides com movimento progressivo normal, indicando o efeito positivo da curcumina na motilidade dos espermatozoides (Fig. 6).

A análise histológica do testículo apresentou o descolamento precoce das células germinativas em direção ao lúmen do túbulo seminífero, porém não houve diferença estatística entre os grupos (Fig. 7B-G). Além disso, constatou-se um discreto aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos do testículo no grupo LCm, em relação a todos os outros grupos (Fig. 7A).

A análise dos marcadores de estresse oxidativo no testículo apontou aumento da atividade enzimática da SOD no grupo LCm em comparação a C e L e da GPx nos grupos O e LCm em relação aos grupos C e L (Fig 8B e C). Os níveis de peroxidação lipídica, estimado pelo método de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), não foram afetados no testículo (Fig. 8D), nem no plasma sanguíneo (não mostrado).

DISCUSSÃO

Considerando relatos anteriores em nosso laboratório nos quais o consumo materno de dietas hiperlipídicas durante a gestação e lactação, levou à programação do desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos da prole e prejudicou os parâmetros espermáticos

[23,24,52], nos propusemos a investigar se isso se aplicaria também às dietas ricas em lipídios saturados da banha de porco e se essa resposta poderia ser influenciada pela curcumina, conhecidamente um modulador do metabolismo lipídico. Sendo assim, nossos dados mostram que o consumo materno de dieta rica em banha não afeta os parâmetros metabólicos da prole de ratos Wistar na idade adulta, nem vários parâmetros reprodutivos, tais como a produção e a reserva espermática e os níveis de esteroides sexuais, mas prejudica a motilidade espermática. Supreendentemente, também constatamos que o óleo de milho, o veículo usado para diluição da curcumina e amplamente usado na literatura [53,54], também afeta negativamente a motilidade espermática. A suplementação alimentar com curcumina/óleo de milho ameniza o prejuízo para a motilidade espermática causado pelo consumo materno de banha ou pela suplementação apenas com o óleo de milho, pois preserva as taxas de espermatozoides com movimento progressivo. Ao que sabemos, esse é o primeiro relato indicando que biocompostos como a curcumina podem interferir nos efeitos negativos causados pelo excesso de lipídios da dieta materna sobre a motilidade espermática da prole.

1. Efeitos metabólicos

Inúmeras evidências indicam que os mecanismos de controle do metabolismo são programados no início da vida [1,55,56], mas pouco se sabe sobre a ação de diferentes componentes lipídicos da dieta. Aqui constatamos que o consumo de dieta materna contendo 31% de banha de porco teve ação obesogênica nas mães, que exibiram no desmame um aumento do índice de adiposidade em relação ao controle, o que foi acompanhado de um aumento nos níveis de triglicerídeos e de glicemia. Os ácidos graxos da circulação materna passam para a circulação fetal pela placenta e podem ser capturados pelo fígado do feto, esterificados e liberados como triglicerídeos na circulação [57]. Entretanto, apesar do consumo de banha ter acarretado distúrbios metabólicos nas mães e os filhos provavelmente terem sido expostos a um ambiente hiperglicêmico e com altas taxas de triglicerídeos na gestação e lactação, não foram observadas alterações nos parâmetros metabólicos da prole masculina aqui investigados. Em estudos anteriores investigamos as consequências metabólicas e reprodutivas para a prole de ratos Wistar, do consumo materno por 15 semanas de dieta hiperlipídica, um modelo de indução de obesidade visando estabelecer correlações com as alterações nos parâmetros espermáticos [23], síntese de esteroides sexuais [24] e histofisiologia prostática [52]. Naqueles estudos, quando comparamos o impacto à exposição em diferentes períodos da vida, verificamos que o grupo exposto na gestação/lactação apresentou aumento do peso corporal sem alteração no índice de adiposidade e na glicemia

[23,52]. Em recente artigo de revisão, Ribaroff e colaboradores [56] analisaram 82 estudos sobre os efeitos da ingestão de dieta materna rica em lipídios na homeostase da glicose na prole masculina e, concluíram que não houve efeito significativo no índice glicêmico. Adicionalmente, estudo recente mostrou que o consumo materno de dieta de cafeteria (composta por guloseimas como gomas, bolachas maisena, biscoito wafer de chocolate, bolo de chocolate, marshmallow, salame, linguiça defumada, presunto, pão, coca-cola) na gestação e lactação acarretou aumento no peso corporal e na glicemia, bem como nos níveis de triglicérides e de colesterol [58]. Sendo assim, nossos dados indicam que para o rato, o consumo materno de uma dieta rica em banha de porco é menos agressivo em relação ao perfil metabólico da prole, quando comparado ao consumo materno rico em dieta de cafeteria.

Um dos achados desse estudo que merece ser destacado é que o óleo de milho no período que incluiu a gestação/lactação não afetou parâmetros metabólicos das mães, mas afetou o metabolismo lipídico da prole adulta, aumentando os níveis séricos de triglicerídeos. O óleo de milho contém mais de 80% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (52% ácido linoleico, 31% ácido oleico e 1% ácido linolênico), além de 16% de ácidos graxos saturados (13% ácido palmítico e 3% ácido esteárico) [59]. Esse óleo vegetal exerce papel na regulação dos níveis séricos de colesterol [60]. Vários trabalhos com seres humanos mostraram que o consumo direto do óleo de milho pode ter efeito benéfico no perfil lipídico, diminuindo os níveis de triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL [61–63]. Aqui nós constatamos que por via materna durante a gestação/lactação o óleo de milho tem um efeito oposto ao descrito na literatura. Considerando que as mães foram tratadas em dias alternados com 100 ul de óleo de milho/100g de peso corporal, o que correspondeu em média cerca de 300 ul por animal, e ainda, que o volume de óleo administrado e a porcentagem de óleo na ração padrão (7% de óleo de soja), assumimos que os efeitos sobre o metabolismo lipídico não são resultantes de alterações na proporção de PUFAs ingeridos. Por outro lado, o óleo de milho é rico em fitoesteroides que correspondem a 0,77% do seu peso, sendo os mais abundantes o sitosterol (0,59% do peso) e o campesterol (0,15% do peso) [64]. Segundo as especificações dos produtores, o óleo aqui utilizado contém 0,83mg de fitoesteroides/100ul de óleo. Portanto, as fêmeas receberam cerca de 2,5 mg desses esteroides, dia sim, dia não. Sabe-se que os fitoesteroides diminuem os níveis séricos de colesterol, pois reduzem absorção desses lipídios [62,64], entretanto os efeitos de uma geração para outra são desconhecidos. Portanto, é possível que os fitoesteroides desse óleo possam ter levado à programação do metabolismo lipídico da prole, em particular no fígado. De fato, esse não é um achado ocasional, pois outros estudos do nosso laboratório mostraram que a suplementação diária de gerbilos do 8º

ao 23º dia gestacional com óleo de milho também afetou o metabolismo lipídico da prole [65]. Essa programação do desenvolvimento pelos fitoesteroides do óleo de milho pode ter ocorrido via modulação da expressão de receptores nucleares envolvidos com o metabolismo lipídico e que são ligantes de esteroides, como os LXR_s [66]. Outra possibilidade é que esses fitoesteroides atuaram via modulação da expressão das enzimas hepáticas envolvidas com a síntese de triglicerídeos, como a estearoil CoA dessaturase ou fatores de transcrição que a regulam, como o “sterol regulatory element-binding protein” SREBP1c [67].

No nosso experimento podemos verificar que o consumo direto da suplementação com curcumina/óleo de milho evitou o aumento na glicemia e nos níveis de triglicerídeos das mães induzidos pelo consumo de dieta rica em banha. Já na prole, o consumo via gestação/lactação de curcumina/óleo de milho evitou o aumento dos níveis de triglicerídeos induzidos pelo veículo diluidor, mas não quando somada ao consumo materno de dieta rica em banha. Assim, podemos concluir que as doses de curcumina aqui utilizadas protegem contra a dislipidemia causada pelo consumo de banha (nas mães) e causada pelo consumo de óleo de milho (na prole), entretanto, na prole não foi capaz de diminuir o nível de triglicerídeos no grupo em que as mães receberam a dieta rica em banha. Portanto, nossos dados corroboram estudos que demonstram a ação hipocolesterolêmica da curcumina [7,33,68–70].

2. Efeitos reprodutivos

Sabe-se que a função reprodutiva da prole pode ser modulada pelo ambiente nutricional materno e os lipídios assumem importante papel nesse cenário [23,24,52,71]. O presente estudo traz novos elementos para esse tema ao demonstrar que o consumo materno de ração rica em banha na gestação/lactação compromete a motilidade espermática mesmo sem afetar outros parâmetros reprodutivos como a produção e a reserva espermática e os níveis de esteroides sexuais circulantes. Anteriormente nós comparamos os efeitos testiculares do consumo materno de dieta rica em lipídios insaturados/obesidade em seis diferentes períodos da vida de ratos, a saber, gestação, gestação/lactação, do desmame à idade adulta, da lactação até a idade adulta, da gestação à maturidade sexual e após a maturação sexual [23]. Verificamos redução nas contagens espermáticas no testículo e cabeça do epidídimo no grupo exposto na gestação/lactação, que também apresentou resistência à insulina e obesidade [23]. Verificamos, ainda, que o prejuízo para produção espermática e desregulação de esteroides sexuais foi mais grave quanto maior o comprometimento metabólico [23,24]. Portanto, é possível que a programação testicular pelos lipídios da dieta materna que resultem em

quantitativo para a produção espermática, requeira também outras programações metabólicas da prole, as quais o consumo de banha aqui usado não acarretou.

Perturbações no estilo de vida materno, durante as fases iniciais do desenvolvimento, podem afetar a qualidade da espermatogênese na vida adulta da prole [71,72]. O prejuízo para a motilidade espermática da prole causado pelo consumo materno de dieta rica em banha não foi relacionado à desregulação nos esteroides sexuais ou a modificações no metabolismo lipídico, que não ocorreram para esse grupo. Entretanto, as mães desses animais, tratadas com a dieta rica em lipídios saturados, demonstraram um aumento do índice de adiposidade, do índice glicêmico e do nível sérico de triglicerídeos, os quais podem ter afetado a diferenciação testicular e epididimal no período fetal e em especial a expressão de genes chaves para a espermatogênese e maturação espermática. Embora também é possível que a função do epidídimo tenha sido afetada pelo consumo materno de banha e interferido na maturação espermática e conseqüentemente na motilidade.

A suplementação materna com óleo de milho foi a que levou aos piores efeitos reprodutivos para prole, com prejuízos mais graves para a motilidade e parâmetros espermáticos. Assim, apesar de não afetar a DSP, o óleo de milho ingerido pela mãe reduziu o peso testicular e as contagens espermáticas na cauda do epidídimo. Sabe-se que o estado metabólico masculino e parâmetros como os níveis de ácidos graxos e colesterol, de glicose e a ação de insulina, estão intimamente associados com a funcionalidade do espermatozoide podendo elevar níveis de ROS (*reactive oxygen species*) e levar a danos no DNA, na morfologia e na motilidade dos espermatozoides [73]. Segundo Palmer e cols. [73] esses danos podem ser revertidos através de modulação da dieta e/ou exercício. A exposição ao aumento de níveis de colesterol e ácidos graxos livres em espermatozoides humanos e de outros animais reduz a motilidade e a capacitação de espermatozoides e a capacidade de fertilização [74,75]. Em particular, os níveis de colesterol no espermatozoide são muito importantes para a fluidez da membrana plasmática e seu aumento na bicamada lipídica tem efeito negativo na integridade da membrana do espermatozoide [76]. Em um estudo no qual camundongos receberam dieta hiperlipídica por 10 semanas e depois sofreram intervenção de dieta controlada e exercícios por 8 semanas, o colesterol circulante se mostrou correlacionado negativamente com a motilidade espermática, mas positivamente com danos no DNA dos espermatozoides, enquanto que os níveis de triglicérides se correlacionaram positivamente com a porcentagem de espermatozoides com morfologia anormal na cabeça [73]. Assim, alterações nos níveis de colesterol, triglicérides e abundância de ácidos graxos livres *in vivo* estão associadas com mudanças na dinâmica da membrana e alterações na motilidade e

morfologia espermática e suscetibilidade a danos no DNA dos espermatozoides [73]. Camundongos alimentados por nove semanas com dieta rica em lipídios apresentaram níveis mais elevados de colesterol e triglicérides, os quais poderiam estar relacionados ao aumento de danos no DNA dos espermatozoides e da sua capacidade de ligação ao ovócito, já que também apresentaram redução da motilidade espermática, sem alteração estatística dos níveis séricos de testosterona[77]. Portanto, os efeitos deletérios sobre a motilidade espermática da suplementação materna com óleo de milho aqui descritos podem ser resultado indireto da dislipidemia e aumento dos triglicerídeos circulantes, que podem ter prejudicado tanto a morfologia espermática ou outros mecanismos envolvidos com a motilidade destas células. Conforme citado anteriormente, o óleo de milho na dieta materna também alterou o metabolismo lipídico e reduziu a reserva espermática dos gerbilos da Mongólia e prejudicou a quantidade e a qualidade dos espermatozoides da prole adulta [65]. Então, os prejuízos reprodutivos da suplementação materna com óleo de milho na gestação/lactação parecem ser comuns aos roedores, embora no gerbilo reduzindo reserva espermática e no rato afetando a motilidade. Nossos dados também levantam duas hipóteses a serem testadas futuramente: 1) que os fitoesteroides possam ter levado a programação do desenvolvimento epididimal, afetando a expressão de genes relevantes para a motilidade espermática e 2) que possam ter funcionado como agonistas dos receptores de estrógeno e assim afetado enzimas, como a aromatase.

Entre as análises de sêmen, a motilidade espermática pode ser considerada um dos principais parâmetros, pois é um indicador da viabilidade dos espermatozoides, diretamente correlacionado com a capacidade de fertilização para muitas espécies. Quando focamos nos efeitos da curcumina sobre a taxa de espermatozoides com movimentos progressivos, que são efetivamente os que possuem potencial de fertilização, podemos considerar que ela reduz os prejuízos causados pelo óleo de milho e também pelo consumo materno de banha. Os efeitos da curcumina sobre a motilidade espermática têm sido examinados em experimentos *in vivo* [78,79] e *in vitro* [78]. Um trabalho verificou que a curcumina melhorou a motilidade de espermatozoides de ratos Wistar que sofreram indução de danos testiculares por doxorubicina [79]. Um outro estudo avaliou os efeitos da curcumina tanto *in vivo*, quanto *in vitro* e constatou que em baixas concentrações a curcumina tem um efeito protetor sobre a motilidade espermática de ratos contra os danos induzidos pelo di (2-etilhexil) ftalato, mas quando usada *in vitro* em altas concentrações ela diminuiu a motilidade e a viabilidade espermática [78]. Do melhor do nosso conhecimento, esse é o primeiro relato que esse curcuminóide via dieta materna pode melhorar a motilidade espermática da prole e proteger

contra os danos causados pelos lipídios da dieta. Os dados obtidos mostram que no grupo curcumina/óleo de milho (Cm) não houve aumento dos triglicerídeos séricos como verificado para o grupo O, o que reforça a relação causal desses lipídios e do metabolismo lipídico com o prejuízo na motilidade espermática.

Outro achado a ser considerado diz respeito ao estresse oxidativo. Sabe-se que o estresse oxidativo regula a vitalidade e a funcionalidade dos espermatozoides mamíferos *in vitro* [80]. A membrana plasmática dos espermatozoides é altamente suscetível ao ataque das ROS e, conseqüentemente, à peroxidação das bicamadas lipídicas [81]. Os danos oxidativos levam a hidrólise de DNA, modificação de proteína e peroxidação de lipídios que podem afetar tanto a formação como a motilidade espermática [82,83]. Com relação a isso, foi observado que a atividade das enzimas antioxidantes testiculares, em especial a de SOD e de GPx foi mais elevada no grupo LCM, em comparação com o C ou com o grupo L. Desse modo, a preservação da motilidade espermática pela suplementação com curcumina frente a dieta rica em banha pode ser decorrente da melhora do sistema antioxidante do testículo. Isso é reforçado pelo fato que não observamos aumento dos níveis de peroxidação lipídica tanto no testículo quanto no plasma sanguíneo dos grupos avaliados. Frente a esses achados é possível que as dietas maternas e/ou suplementação com curcumina/óleo de milho tenham alterado a expressão destas enzimas antioxidantes nos testículos da prole, por mecanismos epigenéticos.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o excesso de lipídios saturados na dieta materna durante a gestação/lactação não altera a produção e reserva espermática, nem causa prejuízos metabólicos na prole, mas prejudica a motilidade espermática. A suplementação alimentar das mães com pequenas doses de óleo de milho, durante a gestação e lactação, foi ainda mais prejudicial para o testículo e para a motilidade de espermatozoides da prole do que o consumo materno de banha. A curcumina evita os prejuízos na motilidade espermática da prole causados pelo consumo de dieta rica em banha e pela suplementação com óleo de milho e esta melhora está relacionada à preservação do metabolismo lipídico e da defesa antioxidante testicular.

TABELA

Tabela 3. Parâmetros espermáticos dos grupos C, L, O, Cm e LCm.

n=10	Experimental groups				
	C	L	O	Cm	LCm
Sperm number in the testis ($\times 10^6$)	109 $\pm$ 4,30	122,6 $\pm$ 9,38	103,6 $\pm$ 11,13	120,9 $\pm$ 8,11	137,1 $\pm$ 10,12
Sperm number per gram of testis (10^6)	75,22 $\pm$ 3,64	80,21 $\pm$ 6,28	74,17 $\pm$ 9,67	77,72 $\pm$ 5,76	83,45 $\pm$ 6,03
DSP ($\times 10^6$)	17,87 $\pm$ 0,70	20,11 $\pm$ 1,54	16,99 $\pm$ 1,82	19,81 $\pm$ 1,33	22,47 $\pm$ 1,66
DSP per gram ($\times 10^6$) ^A	12,33 $\pm$ 0,60	13,15 $\pm$ 1,03	12,16 $\pm$ 1,59	12,74 $\pm$ 0,94	13,68 $\pm$ 1,00
Sperm number in the caput/corpus of the epididymis ($\times 10^6$)	94,41 $\pm$ 5,85	112,8 $\pm$ 9,68 ^c	68,94 $\pm$ 12,66 ^{b,d,e}	133,4 $\pm$ 7,93 ^{a,c}	117,4 $\pm$ 9,12 ^c
Sperm number per gram of caput/corpus of the epididymis ($\times 10^6$)	315 $\pm$ 21,67	323,8 $\pm$ 22,80	220,9 $\pm$ 23,63 ^{d,e}	389,9 $\pm$ 24,04 ^c	329,6 $\pm$ 24,07 ^c
Sperm number in the cauda of the epididymis ($\times 10^6$)	160,6 $\pm$ 17,50	135,5 $\pm$ 9,04	102,7 $\pm$ 24,22 ^{d,e}	174,1 $\pm$ 10,21 ^c	200,1 $\pm$ 16,62 ^c
Sperm number per gram of cauda of the epididymis ($\times 10^6$)	793,8 $\pm$ 90,40	667,3 $\pm$ 51,84	457,3 $\pm$ 94,08 ^{a,d,e}	773,8 $\pm$ 52,22 ^c	808,0 $\pm$ 61,10 ^c
Sperm reserve in the epididymis ($\times 10^6$) ^B	321,1 $\pm$ 35,00	271,1 $\pm$ 18,09	205,3 $\pm$ 48,45	348,1 $\pm$ 20,41	400,1 $\pm$ 33,25
Sperm transit time in the epididymis (days)					
Caput/corpus	5,30 $\pm$ 0,28	5,76 $\pm$ 0,48	4,57 $\pm$ 1,00	7,02 $\pm$ 0,66	5,41 $\pm$ 0,54
Cauda	9,16 $\pm$ 1,10	6,99 $\pm$ 0,56	6,24 $\pm$ 1,53	9,10 $\pm$ 0,79	9,24 $\pm$ 1,01
Total	15,50 $\pm$ 1,27	12,28 $\pm$ 0,91	11,61 $\pm$ 2,13	15,16 $\pm$ 1,05	15,85 $\pm$ 1,55
Testosterone serum levels (ng/dl)	35,61 $\pm$ 5,53	34,78 $\pm$ 6,02	34,47 $\pm$ 4,7	26,49 $\pm$ 3,62	31,66 $\pm$ 2,98
Estradiol serum levels (pg/ml)	5,29 $\pm$ 0,63	5,12 $\pm$ 0,87	6,01 $\pm$ 0,76	4,44 $\pm$ 0,49	5,77 $\pm$ 0,75

Values expressed as mean $\pm$ SEM.

The superscripts a, b, c, d, e indicate statistical difference among the groups: a p<0.05 versus C; b p<0.05 versus L; c p<0.05 versus O; d p<0.05 versus Cm; e p<0.05 versus LCm.

^A Spermatogenic efficiency.^B Value per cauda of the epididymis multiplied by 2.

FIGURAS

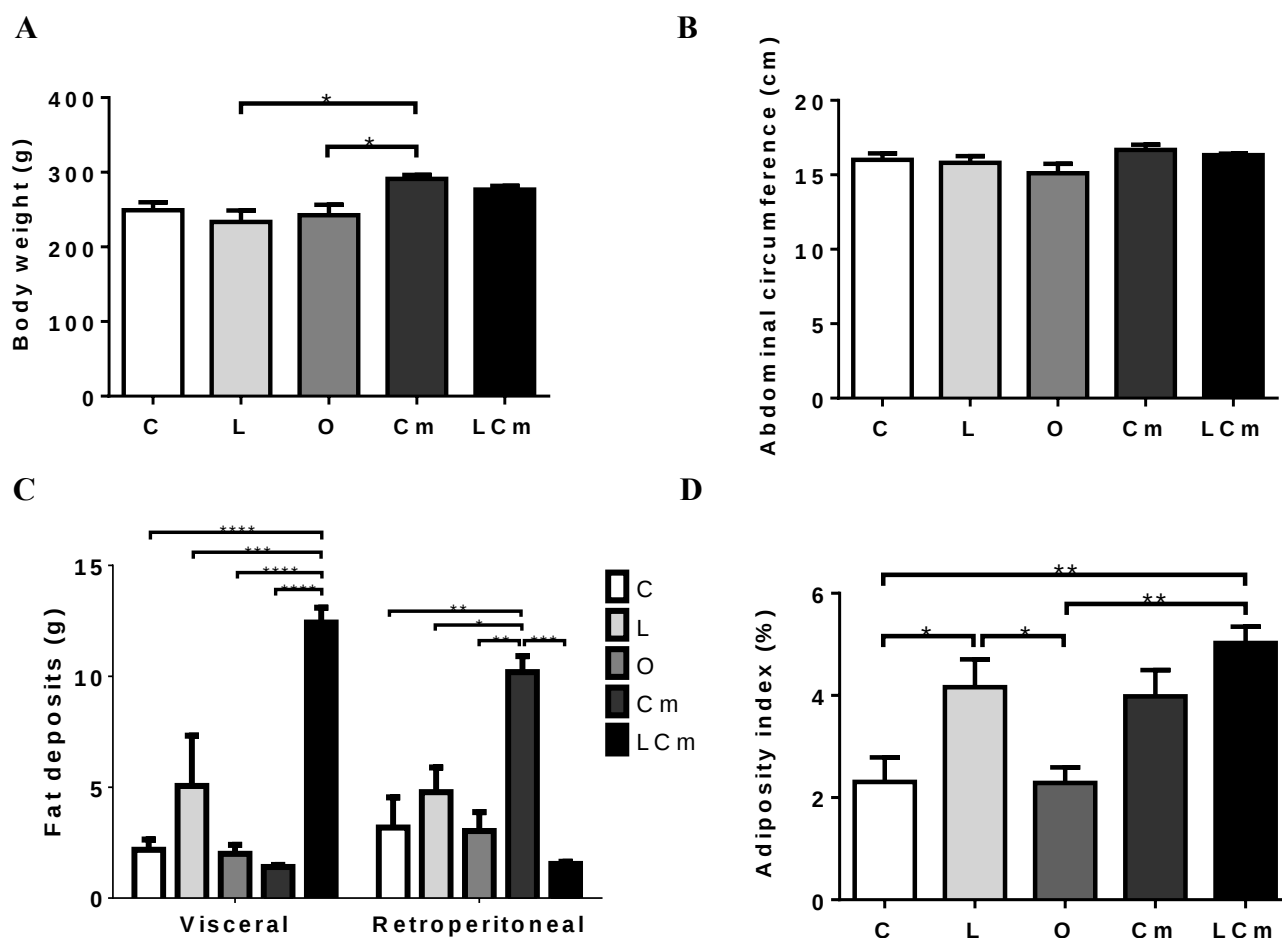


Figura 1. Perfil biométrico das mães (n=5) tratadas com dieta padrão (C), com dieta padrão e com óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e com curcumina (LCm). **A.** Peso corporal das mães. **B.** Circunferência abdominal. **C.** Peso dos depósitos de gordura visceral e retroperitoneal. **D.** Índice de Adiposidade. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

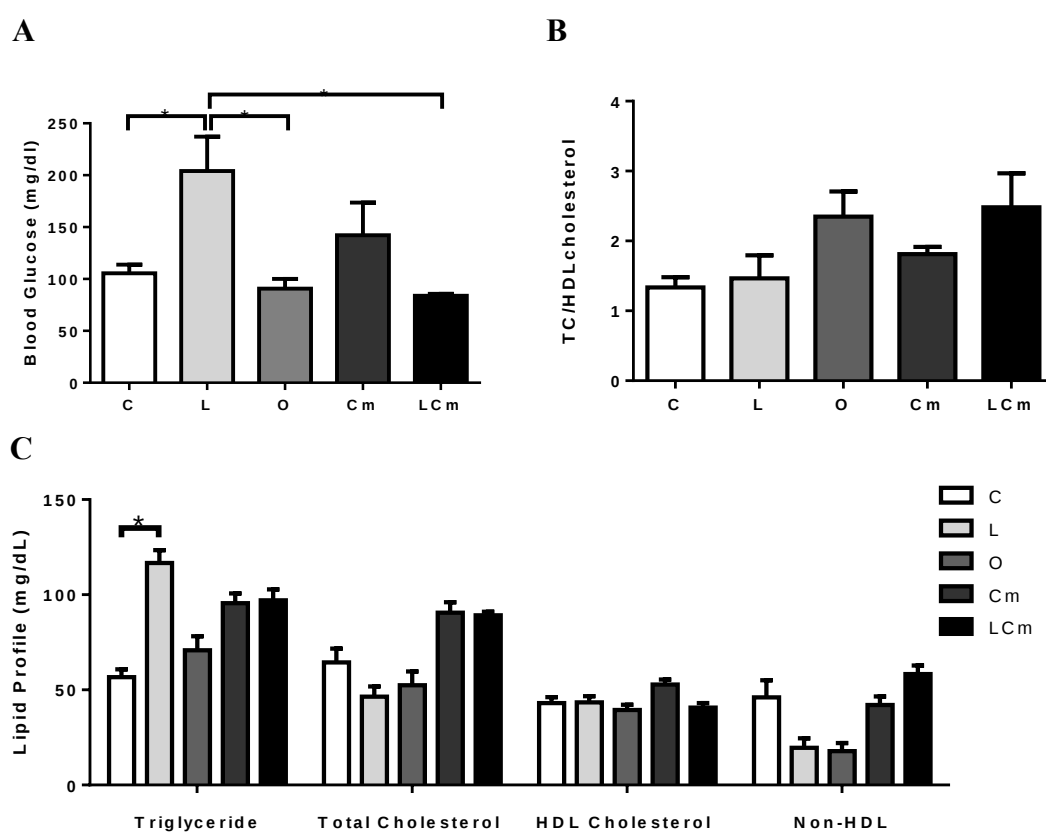


Figura 2. Perfil Lipídico e Metabólico das mães tratadas, durante a gestação e lactação, com dieta padrão (C), com dieta padrão e óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e curcumina (LCm). **A.** Índice glicêmico. **B.** Razão TG/HDL colesterol. **C.** Perfil Lipídico. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$).

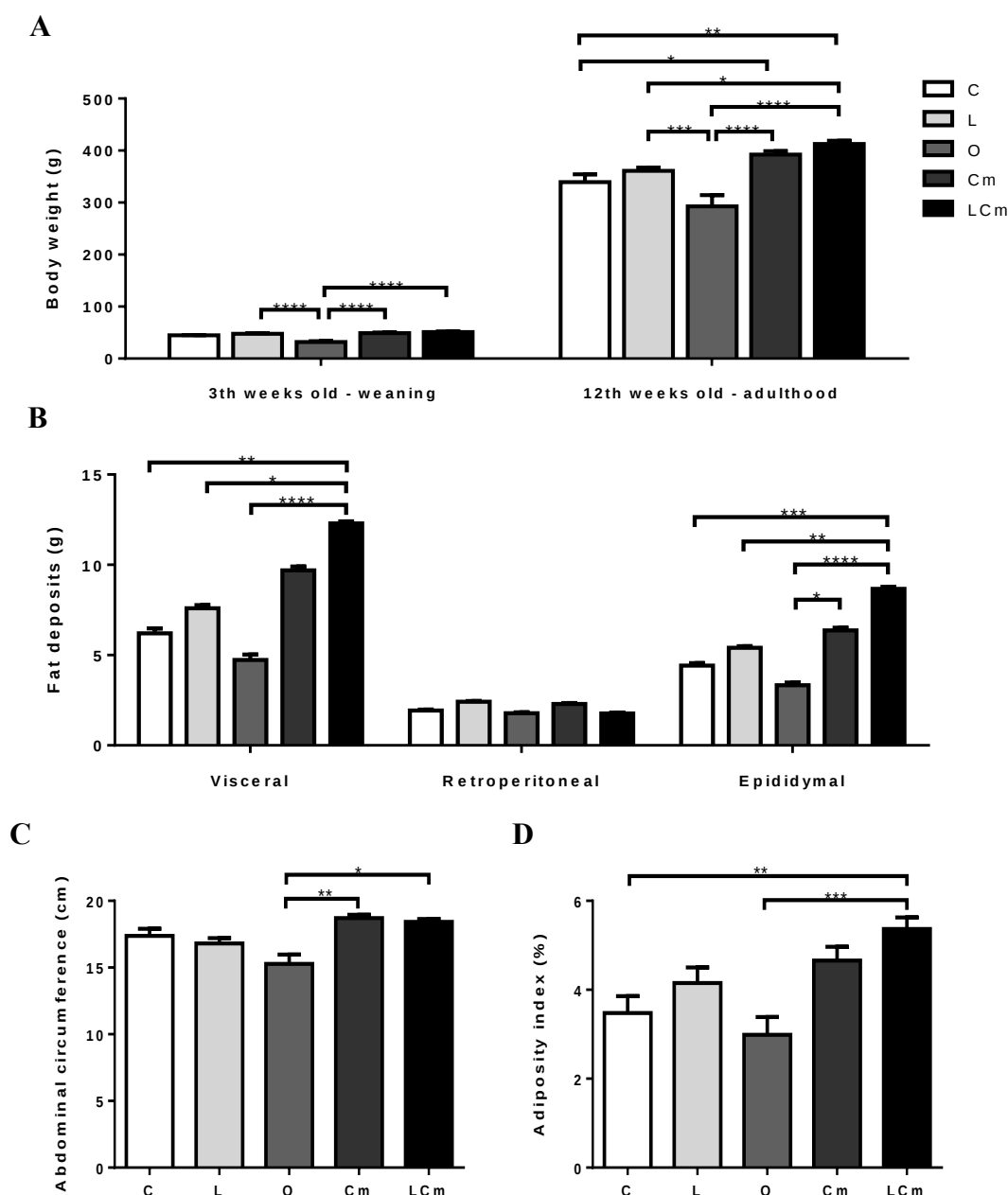


Figura 3. Dados biométricos e metabólicos dos ratos adultos, filhos de mães tratadas, durante a gestação e lactação, com dieta padrão (C), com dieta padrão e com óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e com curcumina (LCm). **A.** Peso corporal ao desmame (3 semanas) e peso corporal ao final do experimento (12 semanas). **B.** Peso dos depósitos de gorduras visceral, retroperitoneal e epididimal. **C.** Circunferência abdominal. **D.** Índice de adiposidade. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

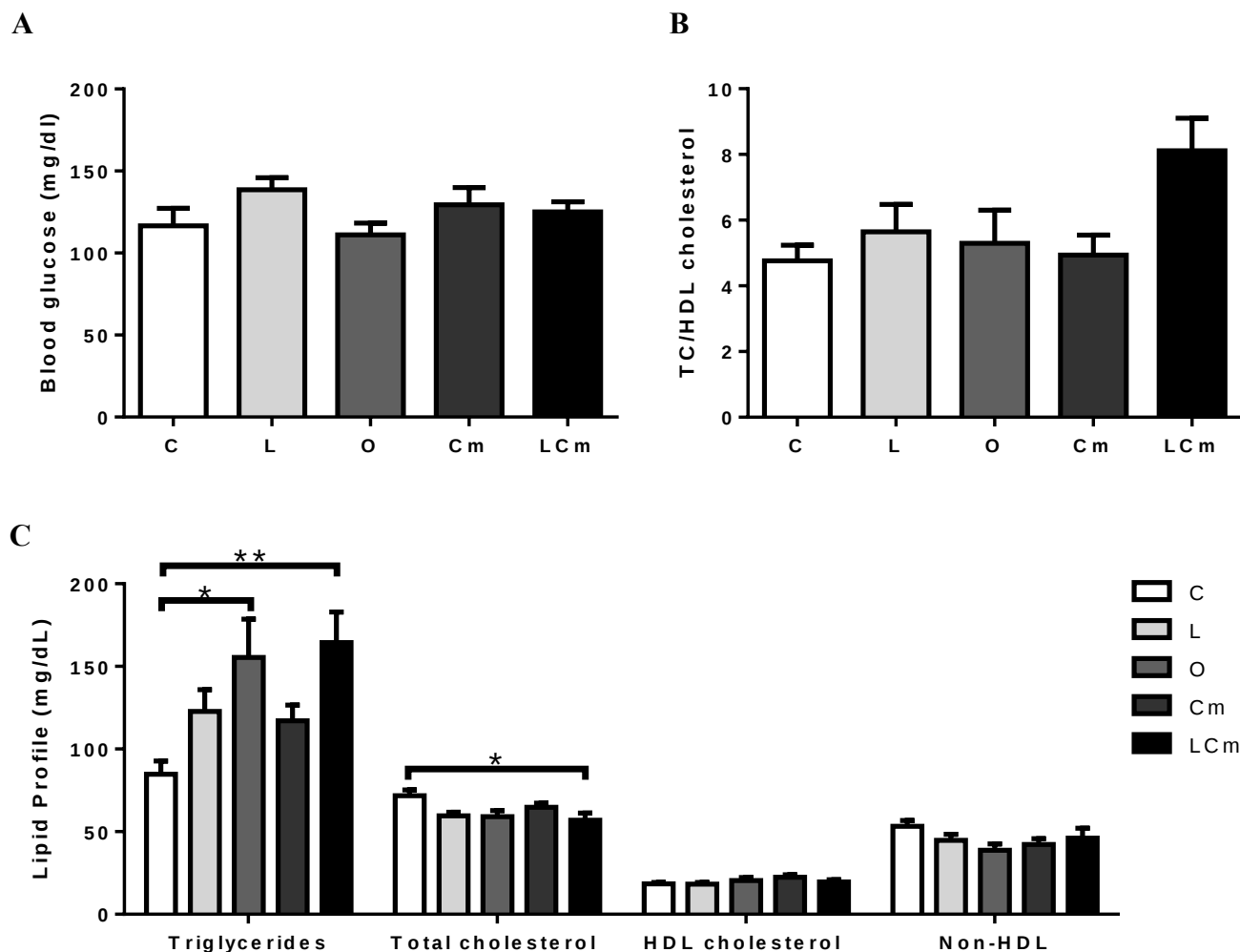


Figura 4. Perfil Metabólico e Lipídico dos ratos adultos, filhos de mães tratadas, durante a gestação e lactação, com dieta padrão (C), com dieta padrão e óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e curcumina (LCm). **A.** Índice Glicêmico. **B.** Razão Triglicerídeos/HDL colesterol (Resistência à insulina). **C.** Perfil Lipídico. Valores expressos como média ± erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$).

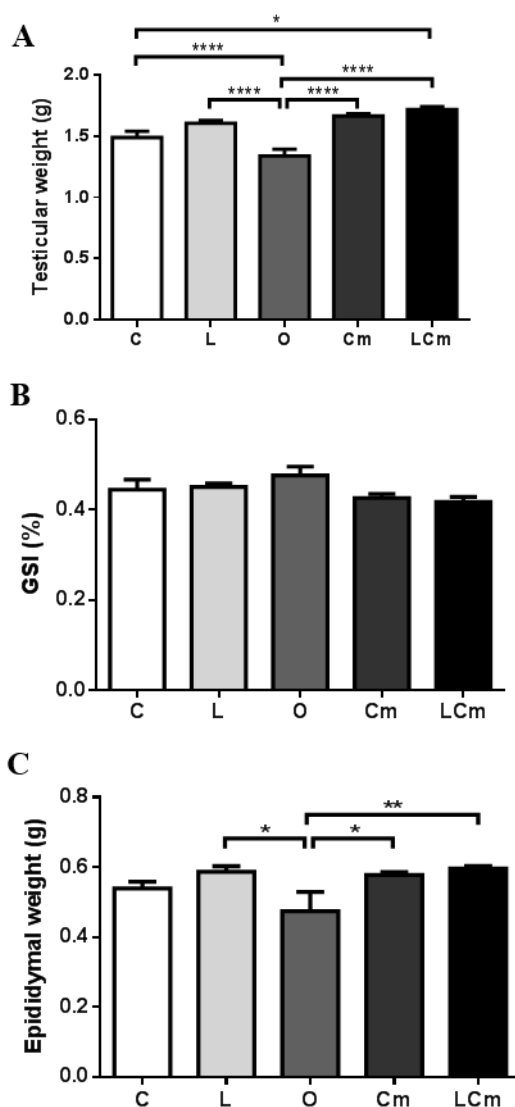


Figura 5. Dados dos órgãos reprodutivos dos ratos adultos, filhos de mães tratadas, durante a gestação e lactação, com dieta padrão (C), com dieta padrão e com óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e com curcumina (LCm). **A.** Peso testicular. **B.** Índice gonadosomático (GSI). **C.** Peso epididimal. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

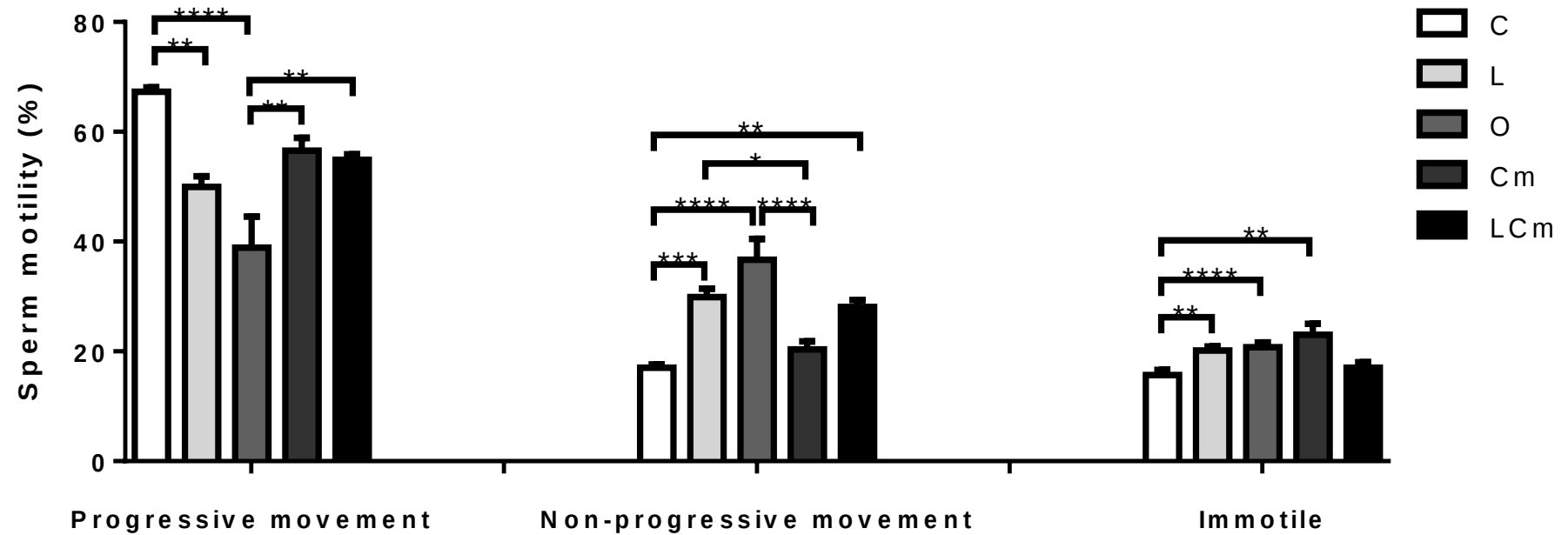


Figura 6. Motilidade dos espermatozoides de ratos adultos, filhos de mães tratadas, durante a gestação e lactação, com dieta padrão (C), com dieta padrão e com óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e com curcumina (LCm). Os espermatozoides foram avaliados de acordo com o tipo de movimento apresentado: móveis com progressão do movimento, móveis sem progressão do movimento e imóveis. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

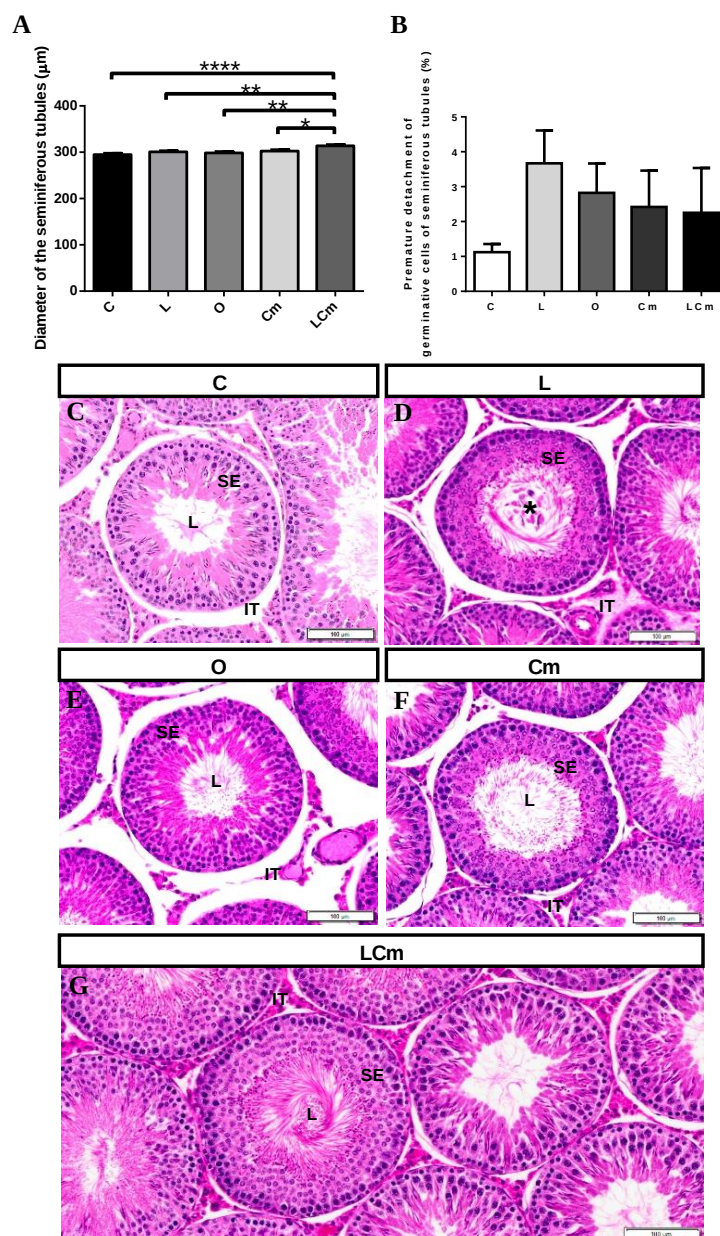


Figura 7. Gráficos que representam **A.** O diâmetro dos túbulos seminíferos dos testículos de ratos Wistar (μm). **B.** O descolamento de células germinativas do epitélio seminífero no lúmen tubular (%). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$). **C a G.** Seções histológicas de testículos de ratos Wistar, filhos de mães tratadas, com dieta padrão (C), com dieta padrão e com óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e com curcumina (LCm). Aumento de 100x. In: interstício; TI: tecido intersticial; L: lúmen; * lúmen de túbulos seminíferos com descolamento de células germinativas. Coloração: H&E.

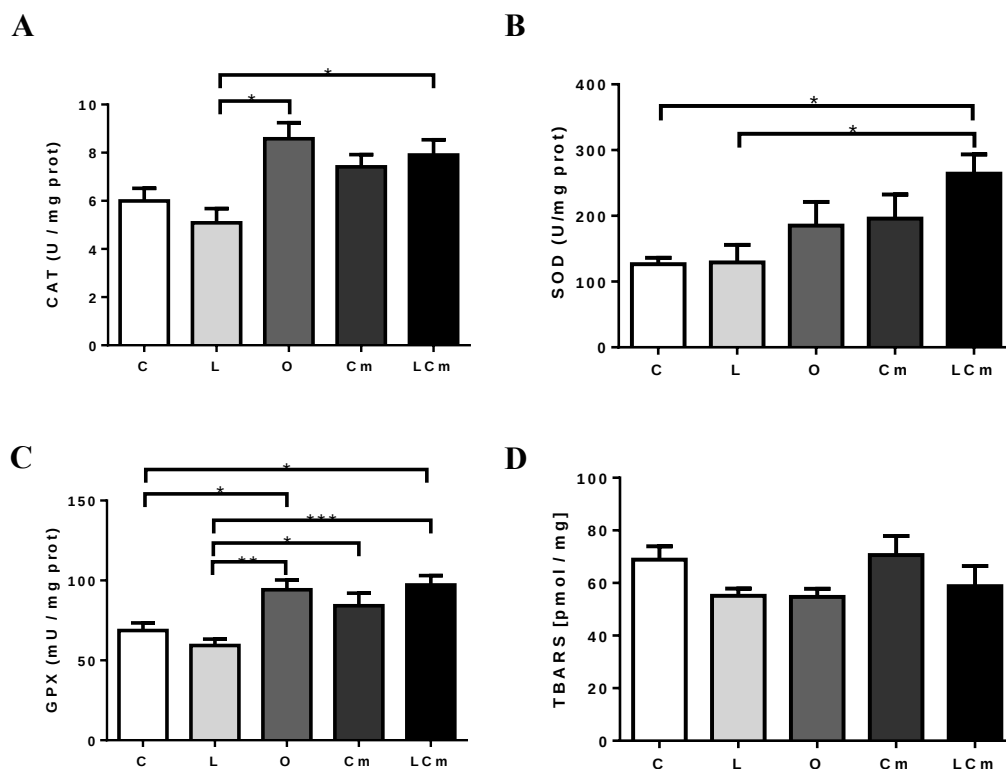


Figura 8. Análise de estresse oxidativo no testículo de ratos adultos filhos de mães tratadas, durante a gestação e lactação, com dieta padrão (C), com dieta padrão e óleo de milho (O), com dieta padrão e com curcumina (Cm), com dieta enriquecida com banha de porco (L), com dieta enriquecida com banha de porco e curcumina (LCm). Atividade das enzimas antioxidantes **A.** Catalase (CAT); **B.** Superóxido dismutase (SOD); **C.** Glutathione peroxidase (GPx) e **D.** Determinação dos níveis de biomoléculas oxidadas pelo método de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

REFERÊNCIAS

- [1] Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: Consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 2005;565:3–8. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079756>.
- [2] Symonds ME, Stephenson T, Gardner DS, Budge H. Long-term effects of nutritional programming of the embryo and fetus: Mechanisms and critical windows. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:53–63. <https://doi.org/10.1071/RD06130>.
- [3] White CL, Purpera MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:1464–72. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.91015.2008>.
- [4] Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 2009;52:1133–42. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1316-9>.
- [5] Bouret SG. Early life origins of obesity: Role of hypothalamic programming. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181977375>.
- [6] Amri EZ, Ailhaud G, Grimaldi PA. Fatty acids as signal transducing molecules: Involvement in the differentiation of preadipose to adipose cells. *J Lipid Res* 1994;35:930–7.
- [7] Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Michael Wallace A, Greer IA, Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4231–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020311>.
- [8] Gluckman PD, Hanson MA. *Gluckman Hanson Science* 2004 2004;305:1733–6.
- [9] Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 2007;92:287–98. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.032854>.
- [10] Mighiu PI, Filippi BM, Lam TKT. Linking inflammation to the brain-liver axis. *Diabetes* 2012;61:1350–2. <https://doi.org/10.2337/db12-0330>.
- [11] Thaler JP, Tschöp MH, Michael W, Thaler JP, Yi C, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans Find the latest version : Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 2012;122:153–62. <https://doi.org/10.1172/JCI59660.adjacent>.
- [12] Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA, et al. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the

- liver. *Diabetes* 2012;61:1455–62. <https://doi.org/10.2337/db11-0390>.
- [13] Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2008;294:528–38. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00316.2007>.
- [14] Chango A, Pogribny IP. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. *Nutrients* 2015;7:2748–70. <https://doi.org/10.3390/nu7042748>.
- [15] Lee HS. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients* 2015;7:9492–507. <https://doi.org/10.3390/nu7115467>.
- [16] WHO, 2019. Organização Mundial de Saúde. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/. Acessado em 10 de dezembro de 2019.
- [17] Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl* 2006;27:450–2. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05124>.
- [18] Hager GR, Van Haeften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008;29:2959–71. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn387>.
- [19] Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 2008;90:897–904. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.026>.
- [20] Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 2008;29:251–9. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003731>.
- [21] MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: A systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009;16:293–311. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp047>.
- [22] Drake AJ, Reynolds RM. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. *Reproduction* 2010;140:387–98. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0077>.
- [23] Reame V, Pytlowanciv EZ, Ribeiro DL, Pissolato TF, Taboga SR, Góes RM, et al. Obesogenic Environment by Excess of Dietary Fats in Different Phases of Development Reduces Spermatogenic Efficiency of Wistar Rats at Adulthood: Correlations

- with Metabolic Status1. Biol Reprod 2014;91:1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121962>.
- [24] Pinto-Fochi ME, Pytlowanciv EZ, Reame V, Rafacho A, Ribeiro DL, Taboga SR, et al. A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. *Reproduction* 2016;152:795–808. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0072>.
- [25] Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003;125:769–84. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>.
- [26] Reame V. 2015. Repercussões da obesidade materna e/ou pós-natal sobre as células de Sertoli e a expressão de fatores parácrinos intratesticulares. Unicamp, 69 páginas.
- [27] Ammon HPT, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med* 1991;57:1–7. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960004>.
- [28] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci* 2006;78:2081–7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>.
- [29] Sinha D, Biswas J, Sung B, B. Aggarwal B, Bishayee A. Chemopreventive and Chemotherapeutic Potential of Curcumin in Breast Cancer. *Curr Drug Targets* 2012;13:1799–819. <https://doi.org/10.2174/138945012804545632>.
- [30] Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. *AAPS J* 2013;15:195–218. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9432-8>.
- [31] Hewlings S, Kalman D. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods* 2017;6:92. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>.
- [32] Salehi B, Stojanović-Radić Z, Matejić J, Sharifi-Rad M, Anil Kumar N V., Martins N, et al. The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. *Eur J Med Chem* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.016>.
- [33] Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R, Badhe B. Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. *Pharm Biol* 2016;54:2857–63. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1187179>.
- [34] Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Zachariah B. Curcumin prevents inflammatory response, oxidative stress and insulin resistance in high fructose fed male Wistar rats: Potential role of serine kinases. *Chem Biol Interact* 2016;244:187–94. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.012>.

- [35] Boyanapalli SSS, Kong ANT. “Curcumin, the King of Spices”: Epigenetic Regulatory Mechanisms in the Prevention of Cancer, Neurological, and Inflammatory Diseases. *Curr Pharmacol Reports* 2015;1:129–39. <https://doi.org/10.1007/s40495-015-0018-x>.
- [36] Reeves PG, Suppl M. Symposium : Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet 1 , 2 1997:838–41.
- [37] Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol* 2008;586:659–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.142414>.
- [38] Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJS, De Pinho RA, Velloso LA, et al. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1 α pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol* 2009;587:2069–76. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.164202>.
- [39] Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 1996;34:389–98. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0302>.
- [40] Fernandez CDB, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:32. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-32>.
- [41] Fan X, Liu EY, Hoffman VP, Potts AJ, Sharma B, Henderson DC. 2011. Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio: a surrogate to predict insulin resistance and low-density lipoprotein cholesterol particle size in nondiabetic patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. Jun;72(6):806-12.
- [42] Sprando RL. 1977. Perfusion rat testis through the heart using heparin. In: Russel LD, Ettlin APS, Cleeg ED (eds.), *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. p 277-288.
- [43] Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 1978;54:103–7. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>.
- [44] Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl* 2006;29:482–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00682.x>.

- [45] Berndtson WE. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 1977;44:818–33. <https://doi.org/10.2527/jas1977.445818x>.
- [46] Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:471–80. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00108-1).
- [47] Beutler E. 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Yale Journal of Biology and Medicine, Grune and Straton; New York.
- [48] Sies, H.; R. Kock, O; Martino, E.; Boveris a. in the Catalytic Assay Using Yeast Glutathione Reductase. *Febs Lett* 1979;103:287–90.
- [49] Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [50] Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, et al. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med* 2015;78:233–5. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504>.
- [51] Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978;86:271–8. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1).
- [52] Pytlowanciv EZ, Pinto-Fochi ME, Reame V, Gobbo MG, Ribeiro DL, Taboga SR, et al. Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood. *Prostate* 2016;76:662–78. <https://doi.org/10.1002/pros.23158>.
- [53] Mylchreest E. Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats Exposed to Di(n-butyl) Phthalate during Late Gestation. *Toxicol Sci* 2000;55:143–51. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.1.143>.
- [54] Giribabu N, Reddy PS. Protection of male reproductive toxicity in rats exposed to di-n-butyl phthalate during embryonic development by testosterone. *Biomed Pharmacother* 2017;87:355–65. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.106>.
- [55] BARKER DJP. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 1998;95:115. <https://doi.org/10.1042/cs19980019>.
- [56] Ribaroff GA, Wastnedge E, Drake AJ, Sharpe RM, Chambers TJG. Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis 2017;673–86. <https://doi.org/10.1111/obr.12524>.

- [57] Schaiff WT, Knapp FF, Barak Y, Biron-Shental T, Nelson DM, Sadovsky Y. Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor γ alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice. *Endocrinology* 2007;148:3625–34. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0211>.
- [58] Santos CDS, Balbo SL, Guimarães ANATB. Life-long Maternal Cafeteria Diet Promotes Tissue-Specific Morphological Changes in Male Offspring Adult Rats 2017;89:2887–900.
- [59] Wamser CC. Typical fatty-acid compositions of some common fats. 2012. Disponível em: <<http://web.pdx.edu/~wamserc/C336S12/fat.pdf>> acessado em 10 de dezembro de 2019.
- [60] Ramjiganesh T, Roy S, Freake HC, McIntyre JC, Fernandez ML. Corn Fiber Oil Lowers Plasma Cholesterol by Altering Hepatic Cholesterol Metabolism and Up-Regulating LDL Receptors in Guinea Pigs. *J Nutr* 2002;132:335–40. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.335>.
- [61] Lichtenstein AH, Ausman LM, Carrasco W, Jenner JL, Gualtieri LJ, Goldin BR, et al. Effects of canola, corn, and olive oils on fasting and postprandial plasma lipoproteins in humans as part of a national cholesterol education program step 2 diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993;13:1533–42. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.13.10.1533>.
- [62] Howell TJ, MacDougall DE, Jones PJH. Phytosterols partially explain differences in cholesterol metabolism caused by corn or olive oil feeding. *J Lipid Res* 1998;39:892–900.
- [63] Maki KC, Lawless AL, Kelley KM, Kaden VN, Geiger CJ, Dicklin MR. Corn oil improves the plasma lipoprotein lipid profile compared with extra-virgin olive oil consumption in men and women with elevated cholesterol: Results from a randomized controlled feeding trial. *J Clin Lipidol* 2015;9:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2014.10.006>.
- [64] Ostlund RE, Racette SB, Okeke A, Stenson WF. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 2002;75:1000–4. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.6.1000>.
- [65] Negrin AC, de Jesus MM, Christante CM, da Silva DGH, Taboga SR, Pinto-Fochi ME, et al. Maternal supplementation with corn oil associated or not with di-n-butyl phthalate increases circulating estradiol levels of gerbil offspring and impairs sperm reserve. *Reprod Toxicol* 2018;81:168–79. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.08.011>.

- [66] Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan Nuclear Receptors as eLiXiRs and FiXeRs of Sterol Metabolism. *J Biol Chem* 2001;276:37735–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100035200>.
- [67] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol* 2004;10:3081–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i21.3081>.
- [68] Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R. Preventive effect of curcumin on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in high-fat fed obese rats. *J Complement Integr Med* 2016;13:137–43. <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0070>.
- [69] Suresh Babu P, Srinivasan K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1997;166:169–75. <https://doi.org/10.1023/A:1006819605211>.
- [70] Pan Y, Zhao D, Yu N, An T, Miao J, Mo F, et al. Curcumin improves glycolipid metabolism through regulating peroxisome proliferator activated receptor γ signalling pathway in high-fat diet-induced obese mice and 3t3-l1 adipocytes. *R Soc Open Sci* 2017;4. <https://doi.org/10.1098/rsos.170917>.
- [71] Galarza RA, Rhon-Calderón EA, Bizzozero M, Meneghini MA, Cortez AE, Lux-Lantos VA, et al. Impact of maternal overweight on the sexual maturity of male offspring in rats. *J Nutr Biochem* 2019;71:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.014>.
- [72] Sharpe RM. Environmental / lifestyle effects on spermatogenesis 2010:1697–712. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0206>.
- [73] Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. 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* 2012;302:768–80. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00401.2011>.
- [74] Saz Lancellotti TE, Boarelli P V., Monclus MA, Cabrillana ME, Clementi MA, Espínola LS, et al. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS One* 2010;5:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013457>.
- [75] Saez F, Ouvrier A, Drevet JR. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl* 2011;13:11–7. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.64>.
- [76] Dufourc EJ. Sterols and membrane dynamics. *J Chem Biol* 2008;1:63–77. <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6>.

- [77] Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model 2010;402–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01092.x>.
- [78] Glombik K, Basta-Kaim A, Sikora-Polaczek M, Kubera M, Starowicz G, Styrna J. Curcumin influences semen quality parameters and reverses the di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced testicular damage in mice. *Pharmacol Reports* 2014;66:782–7. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.04.010>.
- [79] Aksu EH, Kandemir FM, Yıldırım S, Küçükler S, Dörtbudak MB, Çağlayan C, et al. Palliative effect of curcumin on doxorubicin-induced testicular damage in male rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2019;33:1–8. <https://doi.org/10.1002/jbt.22384>.
- [80] Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants Redox Signal* 2011;14:367–81. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3186>.
- [81] Zhou D, Wang H, Zhang J, Gao X, Zhao W, Zheng Y. Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative damage in testes of adult rats. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56:413–9. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.509902>.
- [82] Abdulwahid Arif I, Ahmad Khan H. Environmental toxins and Parkinson's disease: Putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicol Ind Health* 2010;26:121–8. <https://doi.org/10.1177/0748233710362382>.
- [83] Aly HAA, Domènech Ò, Abdel-Naim AB. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1733–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.019>.

III.2. OUTROS RESULTADOS

III.2.1. INTRODUÇÃO

As glândulas adrenais são endócrinas e possuem formato triangular e achatado, localizadas na região superior de cada rim (Kronenberg et al., 2016). Elas são recobertas por uma cápsula conjuntiva e divididas em duas seções principais: medula (porção central) e córtex (porção periférica), as quais possuem origem embrionária distintas, sendo a medula originada da crista neural (neuroectodérmica), enquanto o córtex tem origem mesodérmica (Junqueira e Carneiro, 2013). As células da medula secretam catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina, enquanto as células do córtex secretam hormônios corticosteroides, mineralocorticoides e esteroides (Kronenberg et al., 2016).

O córtex é subdividido em três zonas que são diferenciadas entre si pelo tipo de secreção e pela morfologia: Zona Glomerulosa, Zona Fasciculada e Zona Reticular. Quanto à secreção, a Zona Glomerulosa secreta mineralocorticoides, principalmente, aldosterona, que atua na reabsorção de sódio; enquanto a Zona Fasciculada secreta glicocorticoides como cortisol, cortisona e corticosterona, que são importantes no metabolismo de glicose e de ácidos graxos, na homeostase e na adaptação ao estresse crônico; e a Zona Reticular que secreta, principalmente, hormônios andrógenos: Dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de Dehidroepiandrosterona (SDHEA) e androstenediona, mas também pode secretar glicocorticoides (Gallo-payet e Battista, 2014; Junqueira e Carneiro, 2013; Kronenberg et al., 2016).

III.2.2. OBJETIVO

O trabalho avaliou se o consumo materno de dieta rica em banha de porco ou de dieta padrão suplementada com óleo de milho alteraram a histologia da glândula adrenal.

III.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Ratos Wistar machos (n=10) e fêmeas (n=10), com seis semanas de idade, foram obtidos da empresa Anilab - Animais de Laboratório e Comércio em Paulínia (SP), totalizando 30 animais, sendo n=4 famílias para cada grupo. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do Centro de Microscopia e Microanálise do Instituto

de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP), em caixas de polietileno, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 23°C, alimentados com ração “*ad libitum*” e água filtrada. Todos os procedimentos de manuseio e experimentação animal foram efetuados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (BDCA) – CONCEA, e esse projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP (CEUA Protocolo nº. 140/2016).

Os machos foram alimentados com ração padrão para roedores até 12 semanas de idade. As fêmeas, ao atingirem 8 semanas de idade, foram subdivididas em três grupos segundo o regime alimentar e a suplementação com o óleo de milho. Esse regime e/ou a suplementação continuou por 4 semanas e, ao atingirem 12 semanas de idade, cada fêmea foi acasalada com ratos alimentados normalmente, seguindo o mesmo regime e/ou a suplementação durante a gestação (21 dias), até o desmame dos filhotes (21 dias de idade). O dia zero da gestação foi determinado a partir de esfregaço vaginal para constatação da presença de espermatozoides, realizado na manhã seguinte ao acasalamento. Durante a gestação e amamentação as fêmeas foram mantidas em caixas individuais. O tamanho da ninhada foi reduzido para oito filhotes em todas as famílias no dia do nascimento.

Assim, nesse estudo foram utilizados os seguintes grupos de ratos machos adultos (12 semanas de idade; n= 10 por grupo):

- 1) **C-** Grupo Controle: filhos de mães tratadas com dieta balanceada para roedores;
- 2) **L-** Grupo Lipídio: filhos de mães tratadas com dieta rica em lipídios saturados;
- 3) **O-** Grupo Óleo de Milho: filhos de mães tratadas com dieta balanceada para roedores e suplementação com óleo de milho;

A dieta rica em lipídios continha banha de porco, ou seja, era enriquecida com 31% de ácidos graxos saturados (Prag Soluções Biociências, Jaú-SP). Tal dieta (AIN, Instituto Americano de Nutrição) foi padronizada por Reeves (1997) e vem sendo utilizada em outros estudos (Pauli et al., 2008; Ropelle et al., 2009). O óleo de milho foi administrado na proporção de 0,1ml/100g do peso do animal, no grupo O.

Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados por supra-dosagem de anestésico/analgésico (ketamina 180mg/kg e xilazina 25 mg/kg, em solução fisiológica via intra-peritoneal), seguido de decapitação para coleta de sangue e, então, submetidos à dissecação para retirada das glândulas adrenais.

Parâmetros biométricos e metabólicos

O peso corporal dos animais foram obtidos após o desmame e no dia da eutanásia. O peso úmido das glândulas adrenais foi determinado após a dissecação das mesmas. Além disso, foi determinado o peso relativo das adrenais pela fórmula: (peso das adrenais/ peso corporal) x 100.

As amostras de sangue, coletadas no momento da decapitação, foram centrifugadas e estocadas a -80°C para posterior análise. Os níveis sorológicos de corticosterona foram quantificados por ELISA (IBL – Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA- REF: RE 52211). Cada amostra foi analisada em duplicata e as leituras foram realizadas em leitor Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek Instruments, Inc.).

Processamento das adrenais e análises morfológicas

As glândulas adrenais esquerda e direita foram removidas e fixadas por imersão em fixador Bouin (Sprando, 1977) durante 12 horas, então, foram lavadas por vários dias em álcool 70% para remoção do excesso de ácido pícrico. Os órgãos fixados passaram pelas etapas de desidratação em série alcóolica, clarificação em xilol e infiltração e emblocamento em parafina (*Paraplast Sigma*) no processador TP1020 (Leica Microsystems Brasil, Shanghai, China). Foram realizados cortes seriados a 4µm de espessura e os cortes medianos foram submetidos às colorações pelo Tricômico de Gömöri, para análise da morfologia geral e identificação das zonas corticais.

As análises morfológicas foram realizadas por meio de imagens capturadas pelo sistema analisador de imagens e as medidas (200 medidas de cada uma das três zonas do córtex da adrenal/grupo – totalizando 600 medidas por grupo) foram analisadas e contabilizadas por meio do software Image-Pro Plus®.

Análises estatísticas

Os dados foram testados considerando os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, de acordo com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente, no software GraphPad Prism 6.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Os grupos que assumiram esses pressupostos (dados paramétricos) foram comparados aplicando one-way ANOVA seguido de Tukey (post hoc). Os dados que não se enquadraram nesses pressupostos (dados não paramétricos) foram comparados aplicando o teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn (post hoc). Os dados foram expressos em média ± erro padrão e $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

III.2.4. RESULTADOS

Efeitos nos parâmetros biométricos da glândula adrenal e na dosagem de corticosterona sérica

O peso corporal de ratos adultos submetidos a dieta rica em banha de porco durante os períodos de gestação e lactação (L) aumentou quando comparado aos grupos C e O; enquanto que em ratos adultos submetidos a dieta padrão suplementada com óleo de milho, nos mesmos períodos (O) esse valor diminuiu em relação ao grupo C e L (Tab. 1).

O peso absoluto das adrenais foi maior no grupo L em comparação com os grupos C e O, entretanto o peso relativo dessas glândulas não apresentou diferença significativa (Tab. 1).

Os níveis séricos de corticosterona não variaram entre os grupos tratados (Fig. 1).

Efeitos na morfometria do córtex da glândula adrenal

Nas figuras 2 e 3 nota-se as três zonas histológicas do córtex da adrenal de ratos adultos submetidos a dieta rica em banha de porco (L) ou submetidos a dieta padrão suplementada com óleo de milho (O) durante os períodos de gestação e lactação, comparadas ao grupo controle. De acordo com as figuras podemos notar uma hipertrofia da glândula adrenal no grupo L, observada pela maior quantidade de conteúdo lipídico na zona fascicular.

Na análise morfométrica observou-se um aumento no comprimento de área das 3 zonas (glomerulosa, fasciculada e reticulada) do córtex da adrenal no grupo L, quando comparado ao grupo C (Fig. 4). As adrenais do grupo L apresentaram, ainda, maior comprimento de área da zona fasciculada e reticulada, e menor zona glomerulosa do que o grupo O (Fig. 4).

Nos ratos adultos submetidos a dieta padrão suplementada com óleo de milho durante os períodos de gestação e lactação (O) a zona glomerulosa foi maior do que em C e em L; a zona fasciculada não diferenciou do controle, mas foi menor do que em L e a zona reticulada diminuiu em relação a C e L (Fig. 4).

A zona fasciculada em ratos mostrou-se maior do que as outras zonas do córtex da adrenal (Fig. 4).

III.2.5. DISCUSSÃO

Até o momento podemos observar que a dieta materna rica em banha, nos períodos de gestação e lactação, pode causar uma hipertrofia da glândula adrenal da prole masculina, sem alterar os níveis séricos de corticosterona. A adrenal é um órgão que sintetiza esteroides e, conseqüentemente, acumula lipídios (Ajdžanović et al., 2016). Essa hipertrofia se deve ao aumento de conteúdo lipídico na zona fasciculada da adrenal, facilmente observada na análise morfológica e histológica e confirmado pelo aumento de peso do órgão. Um estudo demonstrou hiperplasia e hipertrofia das células da zona fasciculada do córtex da adrenal de camundongos tratados com dieta hiperlipídica, o que corrobora com nossos dados (Swierczynska1 et al., 2015). Neste mesmo estudo, o nível de corticosterona foi aumentado, o que não ocorreu em nosso trabalho, porém no primeiro os animais foram alimentados com a dieta hiperlipídica diretamente e no segundo foram as mães que receberam essa alimentação (Swierczynska1 et al., 2015).

Para podermos concluir mais a respeito dos efeitos da dieta materna rica em banha ou suplementada com óleo de milho sobre a adrenal da prole masculina, novas análises precisam ser feitas, como a análise de proliferação celular, por exemplo.

TABELA

Tabela 1. Parâmetros biométricos de peso corporal e da adrenal dos grupos C, L e O.

n=10	Grupos experimentais		
	C	L	O
Peso corporal (g)	293,3 ± 10,38	344,0 ± 10,93 ^{a,c}	232,0 ± 10,82 ^{a,b}
Peso absoluto das adrenais (g)	0,0405 ± 0,0022	0,0523 ± 0,0044 ^{a,c}	0,0355 ± 0,0020 ^b
Peso relativo das adrenais (%)	0,01376 ± 0,000402	0,01516 ± 0,01045	0,01530 ± 0,0004804

Valores expressos em média ± SEM.

Os sobrescritos a, b, c indicam a diferença estatística entre os grupos: a $p < 0.05$ versus C; b $p < 0.05$ versus L e c $p < 0.05$ versus O.

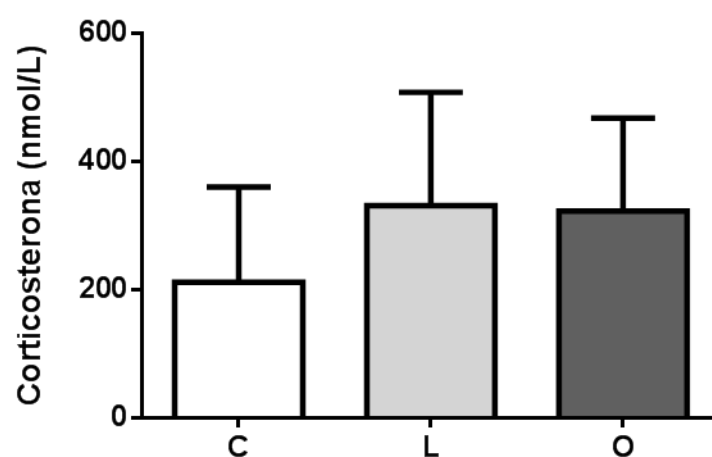
FIGURAS

Figura 1. Dosagem hormonal dos níveis séricos de corticosterona dos ratos adultos, filhos de mães tratadas durante a gestação e lactação com dieta controle (C), com dieta rica em banha de porco (L) e com dieta controle e suplementação com o óleo de milho (O). Valores expressos como média $\pm$ EP.

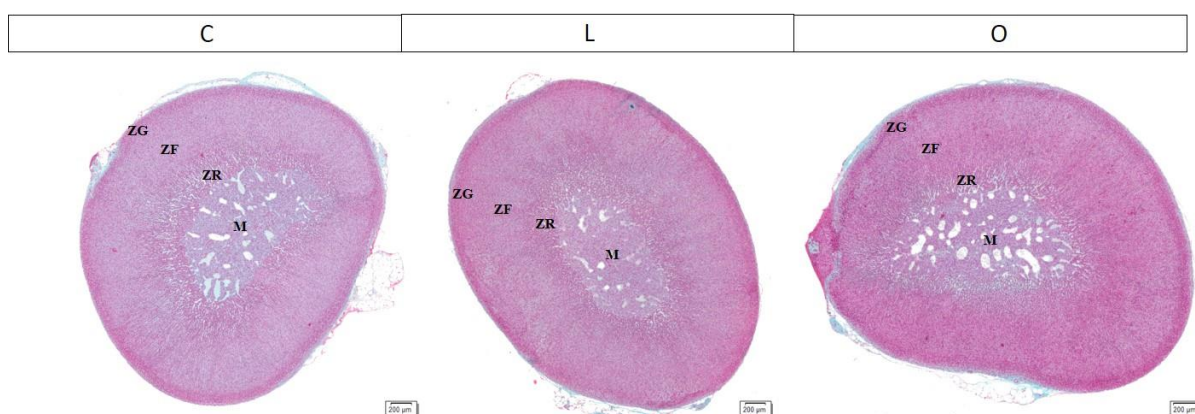


Figura 2. Fotomicrografia do corte transversal da glândula adrenal de ratos adultos, filhos de mães tratadas durante a gestação e lactação com dieta controle (C), com dieta rica em banha de porco (L) ou com dieta controle e suplementação com o óleo de milho (O). Coloração: Tricômico de Gömori. Aumento de 10x. ZR: Zona Reticular; ZF: Zona Fasciculada; ZG: Zona Glomerulosa; M: Medula.

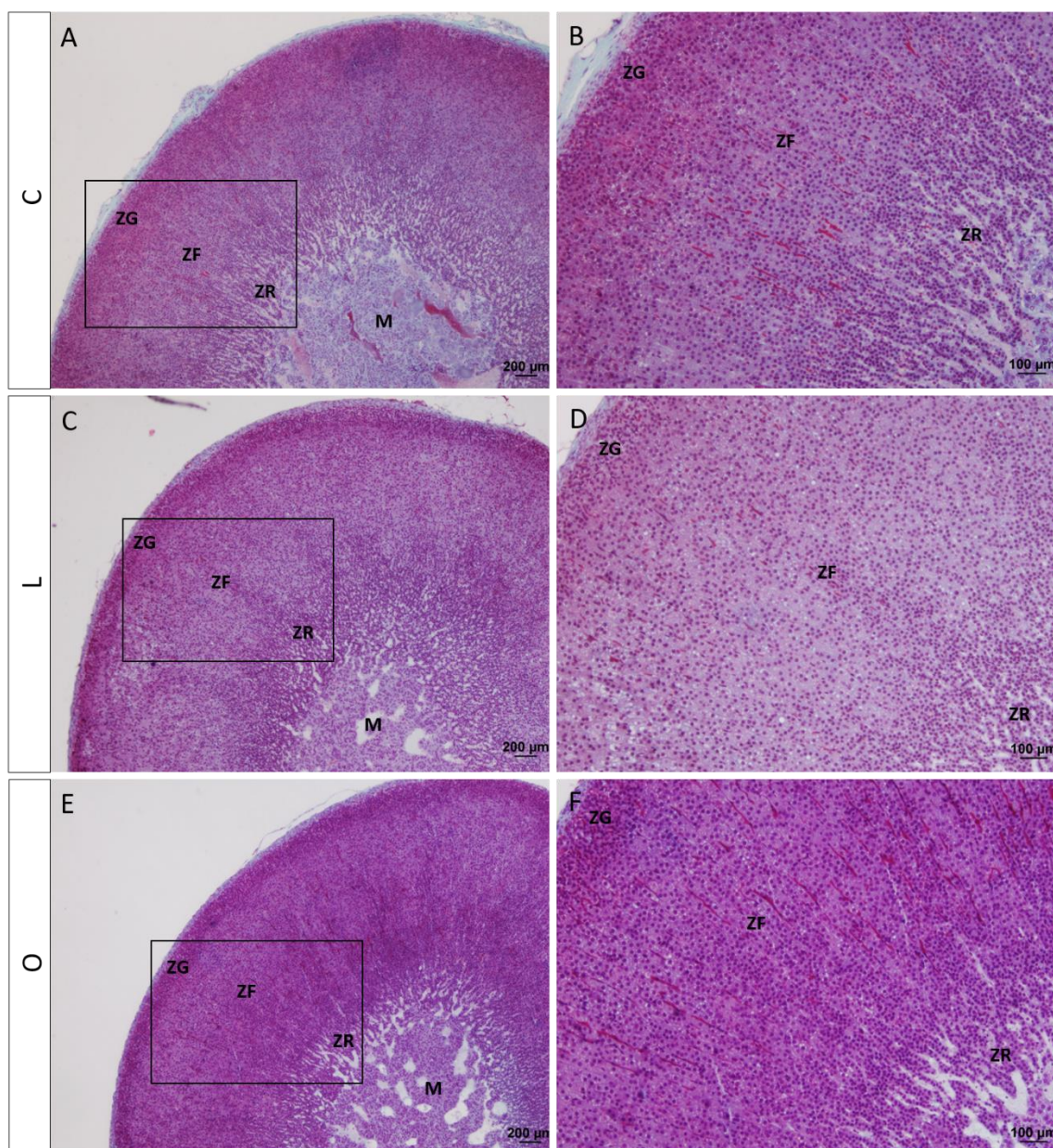


Figura 3. Fotomicrografia do córtex da adrenal, corada em Tricômico de Gömori, de ratos adultos, filhos de mães tratadas durante a gestação e lactação com dieta controle (C), com dieta rica em banha de porco (L) ou com dieta controle e suplementação com o óleo de milho (O). **(A, C, E):** Aumento de 40x; **(B, D, F):** Aumento de 100x referente à área demarcada por um retângulo em A, C, E, respectivamente. ZG: Zona Glomerulosa, ZF: Zona Fasciculada, ZR: Zona Reticulada, M: Medula da Adrenal.

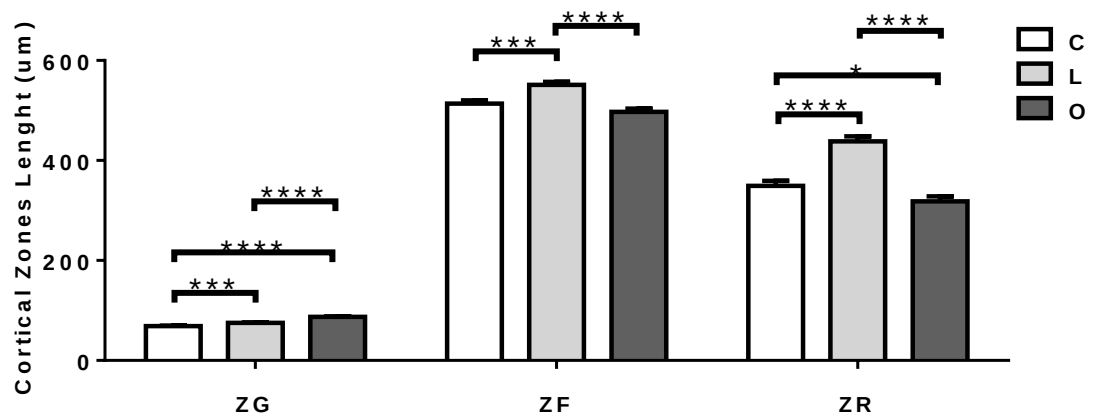


Figura 4. Espessuras das zonas corticais da glândula adrenal de ratos adultos, filhos de mães tratadas durante a gestação e lactação com dieta controle (C), com dieta rica em banha de porco (L) ou com dieta controle e suplementação com o óleo de milho (O). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. * representa a diferença estatística entre os grupos (* $p \leq 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

IV. REFERÊNCIAS

- Ajdžanović, VZ et al. Histological parameters of the adrenal cortex after testosterone application in a rat model of the andropause. *Histology and Histopathology*, v. 31, n. 11, p. 1209–1220, 2016.
- Ammon HP, Wahl MA. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* 57 (1), 1–7.
- Amri EZ, Ailhaud G, Grimaldi PA. 1994. Fatty acids as signal transducing molecules: involvement in the differentiation of pre adipose to adipose cells. *J Lipid Res* 35: 930–937.
- Armitage JA, Taylor PD, Poston L. 2005. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy-rich diet during development. *J Physiol* 565:3–8.
- Axelrod V, Cheesbrough TM, Laasko S. 1981. Lipoxigenase from soybeans. *Methods In Enzymology*, New York, v.71, p.441- 451.
- Began G, Sudharshan E, Appu Rao AG. 1998. Inhibition of lipoxigenase 1 by phosphatidylcholine micelles-bound curcumin. *Lipids*, 33:1223– 1228.
- Boulogne B, Olaso R, Levacher C, Durand P, Habert R. 1999. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. *Int J Androl* 22: 356- 365.
- Bouret SG. 2009. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 48 Suppl 1:S31-8.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Christensen AK. 1975. *Leydig cells*. In: Greep RO, Astwood EB (eds) *Handbook of Physiology*. American Physiological Society, Washington DC, 5(7): 57–94.
- Férézou-Viala J, Roy AF, Sérougne C, Grippo D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Djiane J, Riottot M, Taouis M. 2007. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(3):R1056-62.
- Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WD. 2011. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol.*; 9.
- Gademan MG, Vermeulen M, Oostvogels AJ, Roseboom TJ, Visscher TL, van Eijnden M, Twickler MT, Vrijkotte TG. 2014. Maternal prepregnancy BMI and lipid profile during early pregnancy are independently associated with offspring's body composition at age 5-6 years: the ABCD study. *PLoS One.*; 9(4):e94594.

Gallo-payet N, Battista M. Steroidogenesis — Adrenal Cell Signal Transduction. v. 4, n. July, 2014.

Gluckman PD, Hanson MA. 2004. Living the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305:1733–1736.

Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. 2009. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*.; 9:88.

Guraya SS. 1987. Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals. Berlin: Springer-Verlag.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL. 2001. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 345:1388-1393.

Haider SG. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology* 233:181–241.

Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 29(24):2959-71.

Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. 2008. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 90:897-904.

Huang MT, Newmark HL, and Frenkel K. 1997. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 27:26–34.

Joe B and Lokesh BR 1997. Effect of curcumin and capsaicin on arachidonic acid metabolism and lysosomal enzyme secretion by rat peritoneal macrophages. *Lipids*, 32:1173–1180.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica - texto e atlas*. [s.l: s.n.].

Kanter M, Aktas C, Erboga M. 2013. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res*.;57(9):1578-1585.

Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. 2008. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl* 29:251-259.

Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. 2006. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*.; 27: 450–452. 12.

Kronenberg HM, et al. Williams - Tratado de Endocrinologia 11ªed.pdf, 2016.

Kwon EJ, Kim YJ. 2017. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci* Nov;60(6):506-519.

- Leblond CP, Clermont Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfuric acid' technique. *Am J Anat* 90: 167–206.
- Lonare M, Kumar M, Raut S, More A, Doltade S, Badgujar P, Telang A. 2015. Evaluation of ameliorative effect of curcumin on imidacloprid-induced male reproductive toxicity in wistar rats. *Environ Toxicol*. 31(10):1250-63.
- MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. 2010. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update*.; 16: 293–311.
- Maheshwari RK, Singh KA, Gaddipati J, Srimal CR. 2006. Multiple biological activity of curcumin: A short review. *Life Sci* 78:2081–2087.
- Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R, Badhe B. 2016a. Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. *Pharm Biol*. 30:1-7.
- Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Zachariah B. 2016b. Curcumin prevents inflammatory response, oxidative stress and insulin resistance in high fructose fed male Wistar rats: Potential role of serine kinases. *Chem Biol Interact*. 244:187-94.
- Mendi-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65: 660–671.
- Mighiu PI, Filippi BM, Lam TK. 2012. Linking inflammation to the brain-liver axis. *Diabetes* 61: 1350–1352.
- Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, et al. 2012. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* 61: 1455-1462.
- Negrin AC, de Jesus MM, Christante CM, da Silva DGH, Taboga SR, Pinto-Fochi ME, Góes RM. 2018. Maternal supplementation with corn oil associated or not with di-n-butyl phthalate increases circulating estradiol levels of gerbil offspring and impairs sperm reserve. *Reprod Toxicol*. 81:168-179.
- Orth JM. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203: 485–492.
- Orth JM, Gunsalus GL and Lamperti AA. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122, 787–794. (doi:10.1210/endo-122-3-787).
- Pasquali R, Patton L, Gambineri A. 2007. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:482-487.
- Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. 2002. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4231–4237.

Reame V, Pytlowanciv EZ, Ribeiro DL, Pissolato TF, Taboga SR, Góes RM, Pinto-Fochi ME. 2014. Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatogenic efficiency of wistar rats at adulthood: correlations with metabolic status. *Biol Reprod.*; 91(6):151.

Reeves PG. 1997. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.*;127(5 Suppl):838S-841S.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *J Androl* 16(1): 83.

Russell LD. 1993. *Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells*. In: Russell LD, Griswold MD. (eds) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL, pp 1–38.

Samuelsson, B., Dahlen, S.-E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., and Serhan, C. (1987) Leucotrienes and Lipoxins: Structures, Biosynthesis and Biological Effects, *Science* 237, 1171–1176.

Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *Biomed Res Int.* 2014;2014:418975. doi: 10.1155/2014/418975. Epub 2014 May 20.

Sharma P, Singh R. 2010. Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol.*;84(4):378-384.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. 2003. Proliferations and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125: 769-784.

Sharpe, RM. 2010. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365: 1697–1712.

Skrzypczak-Jankun E, McCabe NP, Selman SH, Jankun J. 2000. Curcumin inhibits lipoxygenase by binding to its central cavity: Theoretical and X-ray evidence. *Int. J. Mol. Med.*, 6:521–526.

Solari AJ e Fritz IB. 1978. The ultrastructure of immature Sertoli cells. Maturation-like changes during culture and the maintenance of mitotic potentiality. *Biol. Reprod.* 18(3), 329–345.

Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O, Horton ES, McKinlay JB. 2000. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Diabetes Care* 23:490-494.

Swierczynska MM, Mateska I, Peitzsch M, Bornstein SR, Chavakis T, Eisenhofer G, Lamounier-Zepter V, Eaton S. 2015. Changes in morphology and function of adrenal cortex in mice fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)*.

Symonds ME, Budge H. 2009. Nutritional models of the developmental programming of adult health and disease. *Proc Nutr Soc* 68: 173-178.

Symonds ME. 2007. Integration of physiological and molecular mechanisms of the developmental origins of adult disease: new concepts and insights. *Proc Nutr Soc* 66: 442-450.

Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JJ, Moran TH. 2009. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58(5):1116-25.

Taylor PD, Poston L. 2007. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 92: 287-298.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, et al. 2012. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 122:153-162.

White CL, Purpera MN, Morrison CD. 2009. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5):R1464-72.

WHO, 2019. Organização Mundial de Saúde. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/. Acessado em 10 de dezembro de 2019.

Wu X, Wan S, Lee MM. 2007. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *Journal of Cellular Physiology* 213:429-433.

V. ANEXOS

V.1. CERTIFICADO DO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

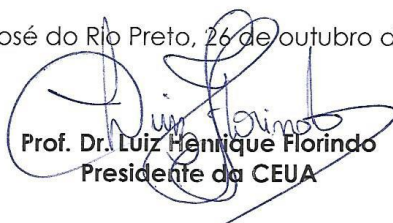
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do excesso de lipídeos saturados e da curcumina na dieta materna sobre os parâmetros reprodutivos de ratos machos adultos", registrada com o nº. 140/2016 - CEUA, sob a responsabilidade da Professora Doutora Rejane Maira Góes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou de ensino), encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), do IBILCE/UNESP, em reunião de 26 de outubro de 2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	07 de novembro de 2016 a 01 de abril de 2018
Espécie/linhagem/Raça	Rato isogênico
Nº de animais	82 (oitenta e dois)
Peso/Idade	300 gramas/ De 06 a 12 semanas
Sexo	66 machos e 16 fêmeas
Origem	ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA (CNPJ: 65.440.612/0001-40). Paulínia/SP

São José do Rio Preto, 26 de outubro de 2016.


Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo
Presidente da CEUA

V.2. DECLARAÇÃO DOS DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos da minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **“Efeitos do excesso de lipídios saturados e da curcumina na dieta materna sobre os parâmetros reprodutivos de ratos machos adultos”**, não infringem os dispositivos da Lei n. ° 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06/08/2020

Assinatura: Vanessa Reame

Nome da autora: **Vanessa Reame**

RG n. ° 41.878.061-4

Assinatura: Rejane Maira Góes

Nome da orientadora: Profa. Dra. Rejane Maira Góes

RG n. o 17404810