UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

OBESIDADE E REPRODUÇÃO:
Efeitos da privação alimentar materna na prole de ratos machos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

DACLÉ JULIANI MACRINI

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

OBESIDADE E REPRODUÇÃO:
Efeitos da privação alimentar materna na prole de ratos machos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof[a] Dra. Maria Martha Bernardi.

DACLÉ JULIANI MACRINI

São Paulo

2014

Macrini, Daclé Juliani.
Obesidade e reprodução: efeitos da privação alimentar na prole de ratos machos / Daclé Juliani Macrini - 2014.
118 f.: il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2014.
.
Área de Concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.
Orientador: Profª. Dra. Maria Martha Bernardi.

1. Obesidade. 2. Privação alimentar. 3. Adipócitos. 4. Adipocinas I. Título. II. Bernardi, Maria Martha (orientadora).

OBESIDADE E REPRODUÇÃO:

Efeitos da privação alimentar materna

na prole de ratos machos

DACLÉ JULIANI MACRINI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/___/____

Prof[a] Dra. Maria Martha Bernardi

_____/___/____

Prof[a] Dra. Ivana Barbosa Suffredini

_____/___/____

Prof[a] Dra. Leoni Vilanos Bonamim

_____/___/____

Prof. Dr. Jorge Camilo Florio

_____/___/____

Prof[a] Dra. Helenice de Souza Spinosa

Dedico este trabalho aos meus pais, Henrique *("in memorian")* e Norma, pelo incentivo aos estudos desde a minha infância e pelo que sou.

Aos meus filhos, Fabian e Thiago, maior presente de minha vida.

Ao meu marido Cesar pela afeição, compreensão e apoio em minhas decisões.

Em homenagem a todos que fazem parte de minha vida:

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a DEUS, por ter me dado forças para realizar mais este sonho.

À professora Dra. Maria Martha Bernardi, pelo carinho, compreensão e dedicação em suas orientações, durante todo o desenvolvimento desta tese e dos trabalhos que estão sendo encaminhados para publicação.

A todos os profissionais e técnicos da USP que me acolheram e auxiliaram na realização das análises na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

À Universidade Paulista (UNIP), em especial ao Diretor do Instituto de Ciências da Saúde, Prof. Dr. Paschoal Laercio Armonia pelo apoio ao pedido financeiro na compra do Ensure® e por suas orientações e ensinamentos.

A todos os técnicos da UNIP que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Um agradecimento especial à Regina C. C. Lima Coelho por me incentivar, auxiliar e acompanhar nas leituras das lâminas.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Patologia pelos ensinamentos e carinho com que fui recebida.

Em especial à Profª Leoni Vilanos Bonamim pelas orientações na parte histológica e à Profª Ivana Barbosa Suffredini por suas sugestões e convite para participação em seus trabalhos.

A todas minhas colegas de turma pelo amigável e prazeroso convívio durante a frequência às aulas.

E finalmente a todos os funcionários da secretaria de Pós-graduação, sempre prontos a esclarecer as dúvidas e nos auxiliar em todos os pontos.

RESUMO

Na investigação dos efeitos da privação alimentar materna na prole masculina de ratos alimentados ou não com dieta hipercalórica, a dieta hipercalórica (DH) promoveu aumento no peso, na área de gordura abdominal e níveis de TNF-α; redução no comportamento sexual, peso dos órgãos sexuais e níveis séricos de testosterona. A privação materna (PV) na gestação atenuou esses efeitos, exceto peso e número de adipócitos que se mostraram aumentados. Esses resultados mostram que a PV bem como a DH alteraram as respostas hormonais e de comportamento, na idade adulta desses animais.

Palavras chaves: Obesidade, privação alimentar, adipócitos, adipocinas, testículos, hormônios, comportamento sexual.

ABSTRACT

Investigate the effects of maternal food deprivation in male offspring of rats fed or not with calorie diet, calorie diet (DH) promoted an increase in weight, abdominal fat area and levels of TNF-α, reduction in sexual behavior, weight sex organs and serum testosterone levels. Maternal deprivation (PV) during pregnancy attenuated these effects except weight and number of adipocytes which showed increased. These results show that PV and DH altered hormonal and behavioral response in these adult animals.

Key words: Obesity, food deprivation, adipocytes, adipokines, testicles, hormones, sexual behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES*

Figura A – Foto do tecido epitelial, mostrando as diferentes camadas da pele (objetiva 4x) 34

Figura B – Foto do tecido epitelial, mostrando principalmente a Derme e Hipoderme (Objetiva 10x) 35

Figura C – Foto do tecido epitelial, mostrando a Hipoderme (objetiva 40x) 35

Figura D – Imagem do programa “Image J” para medida das áreas dos adipócitos . 35

Figura E – Esquema do delineamento experimental geral. 39

(*) Obs.: Não estão listadas aqui as ilustrações apresentadas nos resumos dos trabalhos e artigos

LISTA DE TABELAS*

Tabela 1 – Escores para análise histopatológica das lâminas dos túbulos seminíferos.....33

Tabela 2 – Escores para análise das lâminas das células Intersticiais de Leydig.....33

(*) Obs.: Não estão listadas aqui as tabelas apresentadas nos resumos dos trabalhos e artigos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
AgRP	Pepetídeo Agouti
Alfa- MSH	Hormônio alfa-Melanócito Estimulador
ATM	Macrófagos do Tecido Adiposo
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CA	Circunferência Abdominal
CART	Transcrito Relacionado à Cocaína e à Anfetamina
DCV	Doenças cardiovasculares
DM2	Diabetes Melitus tipo 2
DOPAC	Ácido Dihidroxifenil acético
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GD	Dia da Gestação
Geração F1	Prole de 1ª Geração
GnRH	Hormônio liberador de Gonadotrofinas
HVA	Ácido momovanílico
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
LH	Hormônio Luteinizante
MHPG	Ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil
NAH	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
NOR	Noradrenalina
NPY	Neuropeptído Y
PCR	Proteína C Reativa
PND	Dia Pós-natal
PVN	Núcleo Paraventricular
RCQ	Relação Cintura quadril
TAB	Tecido Adiposo Branco
TNF-α	Fator de Necrose tumoral alfa
VMA	Ácido Vanilmandélico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DA LITERATURA 16

2.1 Adiposidade e Obesidade 16

2.2 Fatores que interferem no surgimento da Obesidade 18

2.2.1 Fatores Neuronais que interferem no Controle Central do Apetite 18

2.2.2 Fatores Gastrointestinais 18

2.2.3 Fatores Endócrinos e Adipocitários 19

2.2.4 Fatores genéticos e epigenéticos 26

3 OBJETIVOS 29

3.1 Geral 29

3.2 Específicos 29

4 MATERIAIS E MÉTODOS 30

4.1 Animais 30

4.2 Formação dos grupos experimentais 30

4.3 Dieta da prole 31

4.4 Procedimentos 31

4.4.1 Dados da geração Parental 31

4.4.2 Evolução do peso da prole masculina 31

4.4.3 Comportamento Sexual 32

4.4.4 Peso dos órgãos 32

4.4.5 Análise histológica dos testículos 32

4.4.6 Análise histológica dos adipócitos 34

4.4.7 Análise dos níveis séricos de Testosterona 36

4.4.8 Análise dos níveis séricos de TNF-alfa 36

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....37

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL.....38

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

8 CONCLUSÕES 58

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....59

ANEXOS 69

ANEXO 1 – ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO – ARTIGO 1.....70

ANEXO 2 – ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO – ARTIGO 2.....94

ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 117

1 INTRODUÇÃO

A incidência de sobrepeso e obesidade tem aumentado substancialmente nas últimas décadas em todo o mundo é considerada uma epidemia mundial, reduzindo a qualidade de vida devido a um aumentando na incapacidade física e metabólica dos indivíduos (Lal, Moodie *et al.*, 2012; Lehnert, Sonntag *et al.*, 2013).

O consumo em abundância de alimentos com alta quantidade de calorias derivada de alimentos ricos em gordura pode resultar em sobrepeso e obesidade. Esse tipo de alimentação é responsável por altos níveis de morbidade e mortalidade em consequência de acidentes cardiovasculares e cerebrais (Heal, Gosden *et al.*, 2009). A obesidade promove a inflamação no tecido adiposo implicando em complicações fisiopatológicas, aumentando o risco de desenvolvimento de diversas disfunções e doenças, incluindo Diabetes tipo II (Eckel, Grundy *et al.*, 2005), distúrbios respiratórios (Testerman, Breitman *et al.*, 2013), distúrbios endócrinos (Al-Suhaimi e Shehzad, 2013), doenças cardiovasculares (Asrih e Jornayvaz, 2013a; b), mau funcionamento imunológico (Rodriguez-Hernandez, Simental-Mendia *et al.*, 2013), distúrbios psiquiátricos (Lopresti e Drummond, 2013), diminuição da fertilidade (Landry, Cloutier *et al.*, 2013) e diversos tipos de cânceres, tais como neoplasias maligna de mama pós-menopausa e de endométrio (Mihu, Ciortea *et al.*, 2013; Kolodecik, Shugrue *et al.*, 2014), entre outros.

Doenças cardiovasculares (DCV) como AVC (Acidente Vascular Cerebral), angina, infarto do miocárdio e doença vascular periférica são originárias principalmente de complicações da aterosclerose, cuja principal causa é a hiperlipidemia, devido à elevação dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides (Briel, Ferreira-Gonzalez *et al.*, 2009; Leroux, Brazeau *et al.*, 2014).

Os adipócitos humanos expressam muitas citocinas e quimiocinas que são biologicamente funcionais e são capazes de induzir à inflamação e ativar as células CD4+. Isso sugere que o evento primário que leva à inflamação crônica no tecido adiposo é a disfunção metabólica de adipócitos, seguido por mediadores imunológicos produzidos por esses adipócitos e é agravada pelos Macrófagos do Tecido Adiposo (ATM) ativados (Meijer, De Vries *et al.*, 2011).

Estudos populacionais demonstram que o excesso de tecido adiposo, principalmente na região abdominal, está intimamente relacionado ao risco de desenvolvimento de doença arterial coronária, hipertensão arterial sistêmica,

diabetes mellitus e dislipidemias. Essa associação eleva-se na medida em que o índice de massa corporal (IMC) aumenta (Romero e Zanesco, 2006). Alguns estudos associam o índice de massa corporal (IMC) com os parâmetros reprodutivos em homens, mostrando que o aumento do IMC está relacionado com a má qualidade do sêmen, diminuição da concentração e mobilidade de espermatozóides e aumento no índice de fragmentação do DNA (Jensen, Andersson *et al.*, 2004b; Magnusdottir, Thorsteinsson *et al.*, 2005; Kort, Massey *et al.*, 2006). A baixa qualidade do esperma causa uma pequena redução no potencial de fertilidade, mostrando que a obesidade pode levar à menor fertilidade masculina (Fernandez, Bellentani *et al.*, 2011; Palmer, Bakos *et al.*, 2012).

Embora os efeitos cardiovasculares da diabetes mellitus tipo 2 e obesidade tenham sido extensivamente estudados, o impacto sobre a fertilidade e hipogonadismo permanece relativamente pouco explorado.

Durante a puberdade, o eixo gonadotrópico e a capacidade reprodutiva estão associados com alterações comportamentais e somáticas do indivíduo (Ojeda e Skinner, 2006).

Muito se tem cogitado sobre os efeitos da obesidade sobre a puberdade, mas a associação exata entre ambos, obesidade e puberdade masculina ainda não está totalmente clara (Tinggaard, Mieritz *et al.*, 2012). Um aumento discreto no IMC pode estar associado a uma puberdade precoce, enquanto que um aumento muito elevado se traduz em obesidade e é associado a uma puberdade mais tardia (Sorensen, Aksglaede *et al.*, 2010). Crianças e adolescentes com alto índice de massa corporal também são mais propensos a apresentar excesso de peso ou obesidade na idade adulta (Guo e Chumlea, 1999); e ainda, uma relação entre maturação sexual, sobrepeso e obesidade foi relatado por Terres *et al* (Terres, Pinheiro *et al.*, 2006). Além disso, a influência do ambiente nutricional também tem seu papel, já que a programação genética fetal pode ser afetada pela nutrição materna levando a distúrbios no metabolismo energético da prole, que aliados a uma vida sedentária e a uma alta ingestão calórica, podem desencadear a Síndrome Metabólica ocorrendo aumento de peso e obesidade (Gottlieb, Cruz *et al.*, 2008).

O presente estudo centrou-se em um modelo animal de desempenho reprodutivo, em ratos descendentes de mães privadas ou não de alimentação, que foram submetidos durante a idade peripuberal (PND 23-65), à dieta de ração de laboratório ou dieta hipercalórica, com o objetivo de verificar se a alimentação

hipercalórica administrada na puberdade para a prole de ratas privadas ou não de alimentação na gestação promove alterações de massa corporal e reprodutivas nesta prole.

Para tanto o peso corporal, assim como o de seus órgãos sexuais, o comportamento sexual, a análise morfológica dos testículos e do tecido adiposo, e a avaliação dos níveis séricos de testosterona e TNF-α foram avaliados nesses ratos na idade adulta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Adiposidade e Obesidade

O peso corporal decorre do balanço de energia e de nutrientes ao longo de um período de tempo determinado pela ingestão de macronutrientes, pelo gasto energético e pela termogênese dos alimentos. O balanço energético positivo levará, após certo período, a um ganho de peso corporal na forma de gordura, enquanto o balanço energético negativo resultará no efeito oposto(Halpern, Z. S. C., Rodrigues, M. D. B. *et al.*, 2004).

A avaliação da composição corporal é uma medida importante do estado nutricional de indivíduos e muitos métodos são utilizados para esse fim.

Os métodos envolvem medidas de peso, estatura, circunferência abdominal (CA) e do quadril, para verificação da Relação Cintura/Quadril (RCQ), medida de gordura corporal pelo método de bioimpedância tetrapolar, entre outros (Rezende, Rosado *et al.*, 2006).

Um dos métodos mais utilizados e simples é o cálculo do índice de massa corporal ou IMC, também conhecido como índice de Quételet, em homenagem ao seu criador Adolphe Quételet, utilizado na avaliação do estado nutricional de populações. O IMC é obtido a partir da divisão da massa corporal em quilogramas, pela estatura em metro, elevada ao quadrado (kg/m^2). Em seus estudos, Quételet observou que após o término do crescimento, ou seja, na vida adulta, o peso de indivíduos de tamanho normal era proporcional ao quadrado de sua estatura (Cervi, Franceschini *et al.*, 2005). O índice de massa corporal, expresso pela relação entre a massa corporal em kg e estatura em m^2, é utilizado como indicador do estado nutricional por sua boa correlação com a massa corporal e baixa correlação com a estatura (Santos e Sichierib, 2005), pois a maior parte do diferencial de peso corporal entre os adultos é devida à gordura, sendo essa uma das razões de o IMC ser considerado um bom indicador de adiposidade (Shetty e James, 1994).

Os pontos de corte de IMC preconizados pela OMS (Who, 2003) determinam que indivíduos com IMC < 18,5, são considerados abaixo do peso; com IMC 18,5 a 24,99 são classificados como eutróficos; IMC 25 a 29,99 são os indivíduos considerados com sobrepeso e IMC ≥ 30,00 os obesos (Rezende, Rosado *et al.*, 2006).

A Circunferência Abdominal (CA) é obtida através da medida na menor curvatura localizada entre as costelas e a crista ilíaca, com fita métrica flexível e inelástica sem comprimir os tecidos. Quando não é possível identificar a menor curvatura, é realizada a medida em 2,0 cm acima da cicatriz umbilical. Os pontos de corte adotados para CA foram os preconizados por Lean *et al*. (Lean, Han *et al.*, 1995), de acordo com o grau de risco para doenças cardiovasculares, sendo: risco aumentado para mulheres (CA ≥ 80 cm) e para homens (CA ≥ 94 cm), e risco muito aumentado para mulheres (CA ≥ 88 cm) e para homens (CA ≥ 102 cm).

O perímetro do quadril que é obtido colocando-se uma fita métrica flexível e inelástica ao redor da região do quadril, na área de maior protuberância, sem comprimir a pele. Com os perímetros de cintura (CA) e do quadril é possível construir a Relação Cintura/Quadril (RCQ) obtido pelo quociente entre a cintura (CA) e o perímetro do quadril. Dentre os pontos de cortes estabelecidos para discriminar valores adequados dos inadequados de RCQ, o mais utilizado tem sido 0,8 para o sexo feminino e 1,0 para o masculino (Machado e Sichieri, 2002; Rezende, Rosado *et al.*, 2006).

Em experimentos com animais torna-se muito complexa a avaliação da obesidade, e uma maneira de ser avaliada pode ser através do aumento de peso e consumo de alimento. Como a obesidade é definida como uma quantidade excessiva de gordura corporal em relação à massa magra (Stunkard e Wadden, 1993), um índice de adiposidade pode ser considerado a partir da soma de diversas camadas adiposas. Assim, a gordura corporal total medida pela soma dos pesos individuais das camadas adiposas visceral, epididimal e retroperitoneal, é empregada para o cálculo do índice de adiposidade (gordura corporal total/peso corporal final) x 100. Além disso, como a obesidade normalmente é acompanhada por distúrbios metabólicos e endócrinos, a análise de tolerância glicêmica, leptinemia e insulinemia podem ser realizadas (Barnes, Lapanowski *et al.*, 2003; Fatani, Pickavance *et al.*, 2007). A instalação da obesidade pode ser comprovada com essas medidas e o cálculo do índice de Lee. Para se calcular o Índice de Lee é necessário subtrair o peso final pelo peso inicial e colocar na seguinte fórmula: raiz cúbica do peso corporal em grama dividido pelo comprimento crânio caudal em centímetros, tudo isso multiplicado por dez (Bernardis e Patterson, 1968) que corresponde ao IMC para humanos.

2.2 Fatores que interferem no surgimento da Obesidade

Diversos fatores atuam e interagem no controle da ingestão de alimentos e do armazenamento de energia, contribuindo para o surgimento e a manutenção da obesidade. São eles os fatores neuronais, gastrointestinais, endócrinos e adipocitários, além dos fatores genéticos e epigenéticos.

2.2.1 Fatores Neuronais que interferem no Controle Central do Apetite

O hipotálamo é a região do cérebro que regula a ingestão alimentar e o gasto energético, sendo nesse local que a expressão do apetite é quimicamente codificada (Williams, Bing *et al.*, 2001; Sainsbury, Cooney *et al.*, 2002). No controle central do apetite foram identificados dois grupos de neuropeptídeos: os orexígenos e anorexígenos (Sainsbury, Cooney *et al.*, 2002) Os neuropeptídeos orexígenos são o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo agouti (AgRP); já os neuropeptídeos anorexígenos são o hormônio alfa-melanócito estimulador (Alfa-MSH) e o transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (CART). Segundo Sainsbury *et al*. (Sainsbury, Cooney *et al.*, 2002), os neurônios que expressam esses neuropeptídeos interagem com cada outro e com sinais periféricos (como a leptina, insulina, grelina e glicocorticoides), atuando na regulação do controle alimentar e do gasto energético. Os receptores para esses sinais estão concentrados no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, porém não estão restritos a essa área (Kalra, Dube *et al.*, 1999).

2.2.2 Fatores Gastrointestinais

Dentre os fatores gastrointestinais ligados ao controle alimentar, diversas evidências demonstraram que a saciedade prandial é atribuída principalmente à colecistocinina, liberada pelas células I do trato gastrintestinal, em resposta à presença de gordura e proteína (Moran e Dailey). Outros inibidores da ingestão alimentar são o peptídeo YY, ou PYY, expresso pelas células da mucosa intestinal, que também inibe a ingestão alimentar e a oxintomodulina, secretada na porção distal do intestino (Adrian, Savage *et al.*, 1985; Konturek, Konturek *et al.*, 2004). Ao contrário, a grelina é um peptídeo produzido pelas glândulas oxínticas do estômago

e da porção superior do intestino, é um dos mais importantes sinalizadores para o início da ingestão alimentar. Sua concentração mantém-se alta nos períodos de jejum e nos períodos que antecedem as refeições, caindo imediatamente após a alimentação, o que também sugere um controle neural. A grelina, além de aumentar o apetite, também estimula as secreções digestivas e a motilidade gástrica (Arnold, Mura *et al.*, 2006; Burdyga, Varro *et al.*, 2006).

2.2.3 Fatores Endócrinos e Adipocitários

- Obesidade e Inflamação

A origem desse conceito apoia-se no fato de que, os níveis circulante de muitas citocinas e proteínas de fase aguda, associadas à inflamação apresentam-se elevados em pacientes obesos. Os adipócitos secretam varias citocinas e proteínas de fase aguda que, direta ou indiretamente, elevam a produção e circulação de fatores relacionados com a inflamação. Além disso, os marcadores inflamatórios podem ser originados a partir de órgãos que não o adiposo, principalmente o fígado, ou através do tecido adiposo branco (TAB), em que podem ser secretados fatores que estimulam a produção desses marcadores inflamatórios pelo fígado e outros órgãos ou ainda diretamente pelos próprios adipócitos. O aumento no nível circulante desses marcadores reflete uma produção aumentada da massa adiposa branca (Meijer, De Vries *et al.*, 2011).

Nesse sentido, pode-se dizer que a obesidade é um estado em que há um excesso de acúmulo de tecido adiposo subcutâneo e ou abdominal e esse tecido adiposo não é mais considerado inerte e dedicado principalmente ao armazenamento de energia, é um tecido ativo na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo imunidade e inflamação (Lee, Lee *et al.*, 2013).

Os adipócitos sintetizam diversas substâncias como adiponectina, glicocorticóides, TNF-α, hormônios sexuais, interleucina-6 (IL-6) e leptina, que atuam no metabolismo e controle de diversos sistemas (Romero e Zanesco, 2006). Pode-se dizer que os adipócitos humanos produzem e liberam uma grande variedade de citocinas e quimiocinas que são biologicamente funcionais e capazes de ativar as células CD4+ induzindo à inflamação (Meijer, De Vries *et al.*, 2011). Isto sugere que o evento primário que leva à inflamação crônica no tecido adiposo é a disfunção

metabólica de adipócitos, seguido pela produção de mediadores imunológicos produzidos por esses adipócitos e agravada pelos macrófagos do tecido adiposo (ATM) ativados.

A obesidade promove a inflamação no tecido adiposo e isso implica em complicações fisiopatológicas, tais como resistência à insulina, Diabetes Tipo 2 e doenças cardiovasculares. Por outro lado, um desequilíbrio no tecido adiposo contribui para a obesidade, induzida pela inflamação crônica formando-se um círculo vicioso obesidade versus doenças resultantes (Meijer, De Vries *et al.*, 2011).

Dentre as adipocinas mais comuns, podem ser citadas a leptina, adiponectina, resistina, visfatina e adipsina, e citocinas pró e anti-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α), as interleucinas 4 e 6 (IL-4, IL-6) , o interferon γ (IFN-γ), entre outras (Lee *et al.*, 2013).

São apresentadas a seguir as características e ações específicas dessas citocinas em maiores detalhes.

- Leptina

A leptina é um hormônio com características estruturais de citocina, produzida predominantemente pelo tecido adiposo branco em relação proporcional direta à massa corporal desse tecido (Velloso, Araujo *et al.*, 2008; Castellano, Roa *et al.*, 2009). Caracteriza-se como um hormônio polipeptídeo composto por 167 aminoácidos, codificado pelo gene ob, que é expresso principalmente nos adipócitos, tanto de seres humanos quanto de roedores e atua como um fator de sinalização entre o tecido adiposo e o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar, o gasto energético e, consequentemente, a massa corporal. Entretanto, a leptina desenvolve várias outras funções fisiológicas mediadas por pelo menos seis diferentes isoformas de receptores na hematopoiese, atividade gastrointestinal, transporte da placenta, entre outros (Romero e Zanesco, 2006).

Aparentemente, a leptina possui efeitos específicos na função dos linfócitos T, através da regulação da proliferação de células envolvidas na resposta imune, tanto na inata quanto na adquirida (Marti, Marcos *et al.*, 2001), aumentando a produção de linfocinas pró inflamatórias. Esses achados suportam a teoria de a leptina ser um dos elos entre o estado nutricional e a função celular imune.

Dentre os fatores endócrinos e adipocitários ligados ao controle alimentar, a leptina e a insulina são hormônios críticos no controle da ingestão de alimentos, sendo secretados em proporção à massa adiposa (Woods, Seeley *et al.*, 1998).

A leptina atua no hipotálamo e promove a sensação de saciedade enquanto a insulina, produzida nas células beta do pâncreas, promove a queda da glicemia por incrementar a captação de glicose, sendo um estímulo para o aumento do apetite (Suyeon e Moustaid-Moussa, 2000). Além disso, a insulina por agir no sistema nervoso central incita a saciedade, aumenta o gasto energético e regula a leptina (Schwartz, 2000); interfere na secreção de entero-hormônios como o glucagon-like-peptide (GLP-1), inibindo o esvaziamento gástrico e promovendo uma sensação de saciedade prolongada (Verdich, Toubro *et al.*, 2001; Halpern, Z. S. C., Rodrigues, M. B. *et al.*, 2004).

Indivíduos obesos têm elevadas concentrações de insulina e leptina. Em consequência às altas concentrações séricas, a leptina não consegue atuar devido à resistência, o que acaba limitando seu efeito anoréxico (Woods, Seeley *et al.*, 1998). O mesmo fenômeno se dá com a insulina (Kong, Chan *et al.*, 2006).

Um importante local de ação da insulina e leptina no Sistema Nervoso Central (SNC) é o núcleo arqueado do hipotálamo (NAH), estrutura crucial no controle tanto do metabolismo como da reprodução. No NAH, insulina e leptina exercem seus efeitos através de receptores nos neurônios liberadores de neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo relacionado ao agouti, e propiomelanocortina (Benoit, Schwartz *et al.*, 2000; Cowley, Smart *et al.*, 2001). Altos níveis de insulina e leptina agem no cérebro reduzindo o apetite (Morton, Kaiyala *et al.*; Elmquist e Flier, 2004). Pesquisas com animais mostraram que a administração intracerebroventricular de insulina reduz a ingestão de alimento, peso corpóreo e adiposidade periférica (Woods, Lotter *et al.*, 1979; Air, Strowski *et al.*, 2002).

Os efeitos da insulina e leptina na modulação da função reprodutiva também estão bem estabelecidos, e animais com problemas nas vias de sinalização ou baixos níveis de insulina ou leptina apresentam comprometimento da função reprodutiva (Crowley e Kalra, 1987; Cheung, Clifton *et al.*, 1997; Bruning, Gautam *et al.*, 2000; Hill, Elmquist *et al.*, 2008).

A leptina tem grande importância para a maturação do eixo reprodutivo, e isso foi evidenciado ao se constatar sua habilidade em restaurar a puberdade e fertilidade em ratos ob/ob, em acelerar a puberdade em ratos selvagens e ao facilitar

o comportamento reprodutor em roedores. A deficiência ou insensibilidade à leptina estão associadas ao hipogonadismo hipotalâmico tanto em humanos como em roedores (Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2007).

Segundo Shi *et al.* (2009), após a puberdade, o estrógeno e a testosterona modulam a síntese e secreção de leptina (Luukkaa, Pesonen *et al.*, 1998). Os níveis de leptina são correlacionados inversamente com aqueles da testosterona (Havel, Kasim-Karakas *et al.*, 1996; Lonnqvist, Thorne *et al.*, 1997; Vettor, De Pergola *et al.*, 1997; Kristensen, Pedersen *et al.*, 1999) e a exposição a adipócitos humanos à testosterona ou diidrotestosterona inibe a expressão de leptina (Wabitsch, Blum *et al.*, 1997). Em homens idosos e obesos ocorre aumento na atividade da aromatase e conversão de andrógenos a estrógenos, fato esse, associado ao aumento plasmático da leptina (Jockenhovel, Blum *et al.*, 1997; Morley e Perry, 2000; Reizes, Lincecum *et al.*, 2001). A reposição de testosterona normaliza os altos níveis de leptina sérica em homens com hipogonadismo e em ratos castrados. Em mulheres, as flutuações dos níveis de leptina no ciclo menstrual estão diretamente correlacionadas com estrógeno, mas não com a progesterona (Mannucci, Ognibene *et al.*, 1998; Quinton, Laird *et al.*, 1999; Quinton, Smith *et al.*, 1999). Além disso, a diidrotestosterona reduz os níveis tissulares do RNAm da leptina, enquanto, em ratas, o 17 β-estradiol o aumenta e o déficit de estrógeno inibe a sensibilidade da leptina no SNC. Esses estudos sugerem que o estrógeno regula o balanço energético e a distribuição de gordura corporal por interagir também com as vias de leptina (Ainslie, Morris *et al.*, 2001; Clegg, Brown *et al.*, 2006).

- Fator de Necrose tumoral alfa (TNF-α)

O TNF-α é uma citocina imunomodulatória e pró inflamatória que apresenta grande diversidade de atividades biológicas, incluindo respostas imunológicas, reações inflamatórias, citotoxicidade, indução de resistência à insulina, neovascularização, etc.

Foi inicialmente identificado como um polipeptídio produzido por macrófagos durante infecções, algumas doenças e cânceres, situações que contribuem para o desenvolvimento de caquexia. É também caracterizado por sua capacidade de induzir a necrose em células tumorais, de onde advém o nome fator de necrose tumoral (Rose, Komninou *et al.*, 2004).

Sob condições fisiológicas, o tecido adiposo produz uma quantidade relativamente grande de TNF-α, fato este que o inclui como uma adipocina, no entanto, apenas uma parte do TNF-α derivado do tecido adiposo se origina do próprio adipócito, uma considerável parte pode ser secretada por macrófagos infiltrados no tecido, fato particularmente importante na obesidade (Harwood, 2012; Lorente-Cebrian, Mejhert *et al.*, 2014).

Nos adipócitos, o TNF-α age diretamente em processos dependentes de insulina, incluindo a homeostase do metabolismo de carboidratos e de lipídeos, inibindo a lipogênese e estimulando a lipólise (Fonseca-Alaniz *et al*, 2007).

O TNF-α é um potente regulador interno do tecido adiposo, atuando de forma autócrina e parácrina, influenciando vários processos intracelulares, incluindo a apoptose celular. Parece existir uma hierarquia das citocinas dentro do tecido adiposo branco, em que o TNF-α desenvolve um papel fundamental relacionado com a produção de várias outras citocinas e adipocinas, como IL-1 e IL-6, sendo considerado o regulador-chave da síntese de IL-6, proteínas de fase aguda e haptoglobina (Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2007; Harwood, 2012)..

De todas as citocinas inflamatórias, o fator de necrose tumoral foi o primeiro a ter sua expressão gênica identificada no TAB de roedores, apresentando-se notadamente elevada em modelos de obesidade (Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2007).

A partir desse ponto, o TNF-α começou a ser considerado um possível mediador molecular entre a obesidade e a resistência à insulina e por isso tem sido amplamente estudado em sua relação com a ação da insulina, e seus múltiplos efeitos têm sido descritos, incluindo a inibição da via de sinalização do receptor de insulina. A neutralização do TNF-α solúvel melhora a resistência à ação da insulina em ratos obesos (Coppack, 2001). Além disso, Nicklas *et al.* ((Nicklas, You *et al.*, 2005) demonstraram que a expressão genica do TNF‑α nos tecidos adiposos subcutâneo e visceral é maior em pessoas obesas do que em eutróficos.

- Interleucina- 6

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina com atuação tanto na resposta imune inata como na adaptativa. É sintetizada por monócitos, células endoteliais,

fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (Male, 2001).

A IL-6 normalmente é expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressantes. Entre os vários fatores que regulam a expressão do gene da IL-6, estão o estrógeno e a testosterona. Após a menopausa ou andropausa, os níveis de IL-6 são elevados mesmo na ausência de infecção, trauma ou estresse (Ershler e Keller, 2000).

A IL-6, produzida pelo tecido adiposo, tem sua concentração plasmática proporcional à massa de gordura e o TNF-α induz a produção de IL-6 pelos adipócitos. Aumenta a secreção de triglicerídeos pelo fígado o que contribui para a hipertrigliceridemia associada com a obesidade visceral (Harwood, 2012).

- Adiponectina

A adiponectina ou proteína complementar relacionada com o adipócito (Acrp 30) é uma proteína “colágeno símile”, específica e o mais abundante fator produzido exclusivamente pelo tecido adiposo de humanos, macacos e ratos. Está envolvida na resposta inflamatória e regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório. Aumenta a sensibilidade à insulina e inibe a inflamação vascular. A resposta anti-inflamatória da adiponectina parece ser mediada pelas concentrações de outras citocinas pró-inflamatórias, mais especificamente a IL-6, o TNF-α e a proteína C reativa (PCR) (Ronti, Lupattelli *et al.*, 2006; Harwood, 2012).

Neumeier *et al*. (2006) relataram que a adiponectina possui efeitos ambíguos, isso porque o alto peso molecular pode exercer efeito pró inflamatório por induzir a síntese de IL-6, mas o baixo peso molecular atenua a síntese de IL-6 e potencializa a síntese de IL-1, favorecendo a ação anti-inflamatória.

Ao contrário da grande maioria das adipocinas, a concentração plasmática de adiponectina apresenta-se menor em obesos do que a observada em eutróficos, e uma grande correlação negativa tem sido encontrada entre adiponectina e IMC, tanto em humanos quanto em animais (Ouchi, Kihara *et al.*, 2003).

- Resistina

A resistina é uma proteína dimérica que deve o seu nome ao seu papel, sugerido como uma resistência à insulina. Pertence a uma família de proteínas ricas em cisteína, aparecendo entre as mais novas das adipocinas, descoberta em 2001. É secretada por monócitos e adipócitos, podendo ser detectada também no plasma; é expressa, especificamente, no tecido adiposo branco e sua secreção está fortemente relacionada à resistência à insulina.

Segundo alguns autores, em humanos, a expressão de resistina nos adipócitos é reduzida, e elevada nos macrófagos e monócitos, o que sugere um importante papel inflamatório. A resistina pode ser considerada como um regulador da adipogênese, pois parece inibir a diferenciação dos pré-adipócitos primários em adipócitos (Michalakis, Mintziori *et al.*, 2013).

Os níveis de resistina aumentam na obesidade genética ou induzida por dieta e, portanto, estão ligados à resistência insulínica associada à obesidade (Park e Ahima, 2013). Em nível periférico, o hormônio foi detectado por imunohistoquímica em ambas as células, de Leydig e de Sertoli, e a expressão de resistina nos testículos impulsionada pelas gonadotrofinas (Caminos, Nogueiras *et al.*, 2008; Reverchon, Maillard *et al.*, 2013).

- Kisspeptina

Kisspeptinas são produtos peptídicos do gene KISS1. Várias formas de kisspeptina foram identificadas, todas com a mesma sequência de aminoácidos decapéptidos no terminal C. As Kisspeptinas regulam a reprodução pela estimulação do seu receptor KISS1R (também chamado GPR-54) sobre os neurônios hipotalâmicos que contêm o GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofinas), assim como a regulação de LH e secreção de FSH. As kisspeptinas desempenham um papel central na modulação da secreção de GnRH e, com isso , a regulação e ajuste das gonadotrofinas e secreção de testosterona em homens (George, Millar *et al.*, 2013).

Mutações que inativam o receptor de kisspeptina demonstraram causar hipogonadismo hipogonadotrófico no homem, ao passo que uma mutação ativadora está associada com a puberdade precoce (Roseweir e Millar, 2009).

Atualmente acredita-se que além dos fatores metabólicos (hiperglicemia, inflamação, estresse oxidativo) e fatores testiculares (diminuição da função das células de Leydig) o fator chave para o aparecimento do hipogonadismo em indivíduos com obesidade e ou DM2, seria a diminuição na secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo, o que é modulado pelas kisspeptinas (Dandona, Dhindsa *et al.*, 2008)..

A obesidade em homens afeta a fertilidade. O excesso de tecido adiposo resulta num aumento da conversão de testosterona em estradiol, podendo levar ao hipogonadismo através de supressão do eixo reprodutivo. Além disso, o estresse oxidativo ao nível do microambiente testicular pode resultar em diminuição da espermatogênese e danificar o esperma (Michalakis, Mintziori *et al.*, 2013).

2.2.4 Fatores genéticos e epigenéticos

Tanto fatores genéticos como os epigenéticos, particularmente ligados à experiência precoce nutricional podem determinar a obesidade.

Dentre os fatores epigenéticos que contribuem para a ocorrência de obesidade destaca-se a quantidade e qualidade da alimentação nos primeiros anos de vida.

Segundo Patel *et al.* (2009) a experiência nutricional qualitativa e quantitativa em períodos precoces da vida contribui para alterações metabólicas e de peso em períodos mais tardios da vida.

A exposição peripuberal a dietas desequilibradas pode interferir com a formação dos sistemas neuroendócrinos levando a disfunções na idade adulta e predispor o organismo a doenças sérias, como diabetes, obesidade, doenças afetivas (Sisk e Zehr, 2005). Também podem ser afetados os mecanismos que regulam o controle energético e as respostas ao estresse (Mccormick, Smith *et al.*, 2008), uma vez que é nesse período e no subsequente à puberdade, que esses sistemas sofrem maturação. Estudos em ratos com obesidade induzida (ratos DIO) sugerem que o período de desenvolvimento entre 3 e 5 semanas de idade é fundamental para o estabelecimento da propensão à obesidade induzida pela dieta (Michel, Dunn-Meynell *et al.*, 2004).

Além disso, a desnutrição durante a gestação pode também ser a causa de obesidade da prole que ocorre em períodos mais tardios da vida, pois promove alterações no controle hipotalâmico alimentar.

Perturbações intrauterinas podem levar a distúrbios fisiológicos promovendo mudanças na estrutura e função de múltiplos órgãos que resultam em desenvolvimento da síndrome metabólica.

Shalev *et al.* (2010) investigaram os efeitos da administração de dieta altamente palatável durante a gestação e lactação a ratas e sua interação com a exposição à mesma dieta após o desmame. Os autores mostraram que a exposição a essas dietas aumentam o risco de obesidade em ratos na puberdade, sendo acompanhada por adaptações nos sistemas de recompensa dopaminérgicos mesolimbicos.

Na adolescência, a obesidade em meninos está relacionada a menores níveis de testosterona; na idade adulta também foi observada correlação positiva entre obesidade, resistência à insulina e hipogonadismo (Moriarty-Kelsey, Harwood *et al.*). Diversos trabalhos mostram que a leptina e o neuropeptídio Y estão envolvidos com a maturação sexual (Aubert, Pierroz *et al.*, 1998). Nesse sentido, ratos machos obesos Zucker, apresentam comportamento sexual inadequado aos 4meses de idade (Edmonds, Dallie *et al.*, 1982), redução dos níveis de testosterona plasmática (Withyachumnarnkul e Edmonds, 1982) e deficiência na diferenciação sexual do cérebro (Doherty, Baum *et al.*, 1985). Hammoud *et al*. (2006) e Jensen *et al.* (2004a) sugerem haver relação entre o estilo de vida, obesidade, qualidade do sêmen e, possivelmente, fertilidade masculina. Campos *et al*. (2008) avaliaram os efeitos da obesidade em parâmetros reprodutivos de ratas. Embora os autores não tenham observado alterações reprodutivas nas gerações parental e F1, verificou-se maior incidência transgeracional de obesidade.

Reaven (2005) observou que doenças frequentes como hipertensão, alterações na glicose e no colesterol estavam, muitas vezes, associadas à obesidade. Essas condições estavam unidas por um elo comum, chamado resistência insulínica. A relação de doenças cardiovasculares e a síndrome metabólica levou a proposição de uma série de teorias que procuram elucidar seus mecanismos.

Dentre essas teorias destaca-se a Hipótese do Fenótipo Econômico, proposta por Hales e Barker (Hales e Barker, 1992) e sugere que o desenvolvimento fetal

seria sensível ao ambiente nutricional. Essa hipótese baseia-se no fato de que o genótipo da humanidade continua basicamente o mesmo desde o Período Paleolítico, e que as mudanças no estilo de vida, sedentário e a base de dieta hipercalórica alterariam a programação fetal para aumentar suas chances de sobrevivência resultando em um metabolismo pós-natal alterado (Hanson, Godfrey *et al., 2010*).

A desnutrição materna na gestação pode também ser então uma das causas do desenvolvimento de obesidade da prole, que ocorre em períodos mais tardios da vida, pois promove alterações na programação fetal do controle hipotalâmico alimentar. Assim, a restrição alimentar materna sinalizaria para o hipotálamo dos fetos em desenvolvimento a necessidade de aumentar o consumo de alimento, levando à obesidade da prole. A questão restrição materna versus obesidade da prole e suas consequências reprodutivas permanece então a ser investigada.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar se a alimentação hipercalórica administrada na puberdade para a prole masculina de ratas privadas ou não de alimentação na gestação promove alterações reprodutivas nesta prole.

3.2 Específicos

Verificar se a alimentação hipercalórica administrada durante a puberdade para a prole masculina de ratas privadas ou não de ração na gestação interfere nos parâmetros abaixo relacionados:

- desempenho reprodutivo das ratas;
- desenvolvimento ponderal da prole dessas ratas;
- dia do descolamento balanoprepucial da prole masculina dessas ratas;
- comportamento sexual dessa prole masculina;
- peso dos órgãos sexuais da prole masculina;
- morfologia dos testículos e das células de Leydig.
- área das células adiposas abdominais da prole masculina;
- níveis séricos de testosterona da prole masculina;
- níveis séricos de TNF-α da prole masculina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos “Wistar” machos e fêmeas, criados no biotério do departamento de Patologia da FMVZ-USP. Esses ratos foram trazidos ao Biotério e Laboratório de Experimentação e Comportamento Animal da Universidade Paulista e acondicionados em número de cinco em unidades (gaiolas) isoladas com temperatura e umidade controladas. Essas unidades foram colocadas em sala com temperatura, umidade e ciclo de luz controlados (12/12 horas), sendo a luz ligada às 8 horas da manhã.

Após acomodação, os animais foram colocados para cruzar e as fêmeas prenhes foram selecionadas.

O uso dos animais no experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UNIP (ANEXO 3).

4.2 Formação dos grupos experimentais

As ratas prenhes foram divididas em dois grupos: um controle, denominado mães sem privação alimentar (n=06) e outro, experimental, denominado mães privadas de alimentação (n=12). A partir do 2º dia de gestação (GD2), as ratas do grupo experimental receberam 60% da quantidade de ração consumida pelas ratas do grupo controle no dia anterior (grupo “*pair fed*”). Essa privação alimentar perdurou até o nascimento dos filhotes, quando as ratas passaram a ser alimentadas *ad libitum*. No dia pós-natal DPN2, as ninhadas dos diferentes grupos foram padronizadas (4 machos/4 fêmeas), as proles pesadas e a lactação decorreu sem interferências. Procedeu-se da mesma forma com as fêmeas do grupo controle, porém as ratas não foram privadas de ração.

Tanto os ratos machos das ninhadas do grupo controle como do grupo experimental foram divididos em 2 grupos cada no DPN22. No grupo controle (prole de mães não privadas de alimentação), um deles recebeu ração padrão do laboratório e o outro recebeu do DPN23 ao DPN65, dieta hipercalórica (ração normal acrescida de Ensure®). O mesmo procedimento foi realizado com o grupo experimental (prole de mães privadas de alimento).

No esquema abaixo são apresentados os grupos de animais do experimento:

Grupos de animais

1) Mães sem privação alimentar
- Prole com ração normal
- Prole com dieta hipercalórica

2) Mães privadas de alimentação
- Prole com ração normal
- Prole com dieta hipercalórica

4.3 Dieta da prole

Os ratos dos grupos NRC e FRC tiveram acesso apenas a ração padrão do laboratório, específica para ratos, da BIO BASF Biotec. Os ratos dos grupos NRH e FRH, receberam o suplemento alimentar Ensure® (suplemento alimentar em pó que após diluído em 100ml de água, apresenta 231kcal contendo 1,7g de gordura poli-insaturada, 3,59g de gordura monoinsaturada, e 2,2g de gordura saturada, livre de gordura trans) que foi oferecido em bebedouros cilíndricos graduados com rolha e bico dosador e ração padrão de laboratório *ad libitum*. O consumo de ambas as dietas foi medido diariamente e a troca das dietas por uma fresca também.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Dados da geração Parental

Análise do desempenho reprodutivo levando em conta o número de fêmeas emprenhadas, os pesos das ratas da geração parental após o parto, o número de filhotes mortos, o número total de filhotes vivos e de machos e fêmeas, o peso médio da ninhada e a constatação da existência ou não de canibalismo.

4.4.2 Evolução do peso da prole masculina

Os ratos foram pesados semanalmente de PND23 a PND65, e o delta dos pesos foi definido como a diferença entre os pesos final e inicial.

4.4.3 Comportamento Sexual

O dia da separação balanoprepucial, que define o começo da maturidade sexual em ratos (Ojeda e Skinner, 2006), foi observada a partir de PND29 a PND45.

Os ratos machos em idade adulta, 90-95 dias de idade, foram colocados junto a fêmeas em estro, induzidas por administração subcutânea de 1,0 mg/kg de valerato de estradiol, 24 horas antes da experiência. As observações do comportamento foram realizadas com os ratos em gaiola especial de vidro numa sala de ciclo de luz invertido (com início às 14:00hs) e iluminada com lâmpada vermelha para visualização. Os parâmetros de comportamento tais como latência para a primeira monta, latência para a primeira intromissão, primeira ejaculação e número de intromissões até a primeira ejaculação foram observados durante 15 min. Foi também calculada a porcentagem de ratos que apresentavam ejaculação em 15 min.

4.4.4 Peso dos órgãos

Os testículos e a vesícula seminal foram removidos e pesados, antes de serem colocados no Bouin. O ducto deferente e a vesícula seminal foram coletados para determinação do peso e posteriormente descartados.

4.4.5 Análise histológica dos testículos

Um testículo de cada par foi fixado em imersão em solução de Bouin durante 5,5 h. Os testículos fixados em Bouin foram lavados em etanol a 70% e transferidos para o etanol a 70% antes de serem desidratados e embebidos em cera de parafina, utilizando técnicas convencionais. Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina-eosina. Cada lâmina correspondente a um animal foi fotografada em cinco campos microscópicos de cada um dos testículos, de forma aleatória em ampliação de 40x e a partir dessas fotomicrografias foi efetuada a avaliação morfológica e semi quantitativa.

Os escores que foram atribuídos a cada campo na análise histopatológica dos túbulos seminíferos e das células intersticiais de Leydig dos testículos estão apresentados nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 – Escores para análise histopatológica das lâminas dos túbulos seminíferos

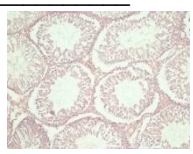
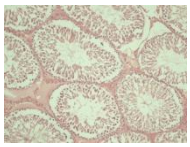
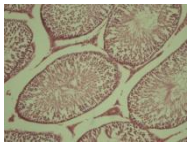
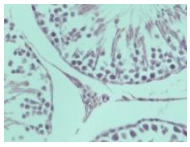
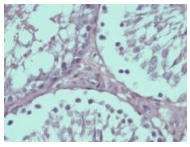
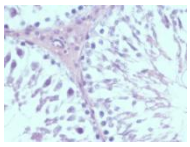
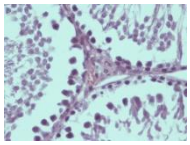
escore	descrição	foto representativa
(1)	Testículos com epitélio fino, quase sem Espermatozoides maduros e poucos espermatócitos secundários e primários	
(2)	Testículos com população celular menos intensa, espermatócitos secundários, primários e espermatogônias em menor quantidade	
(3)	Testículos apresentando grande população de células, com espermatozoides maduros facilmente vistos no interior do lúmen tubular, espermatócitos secundários, primários e espermatogônias em grande quantidade	

Tabela 2 – Escores para análise das lâminas das células Intersticiais de Leydig

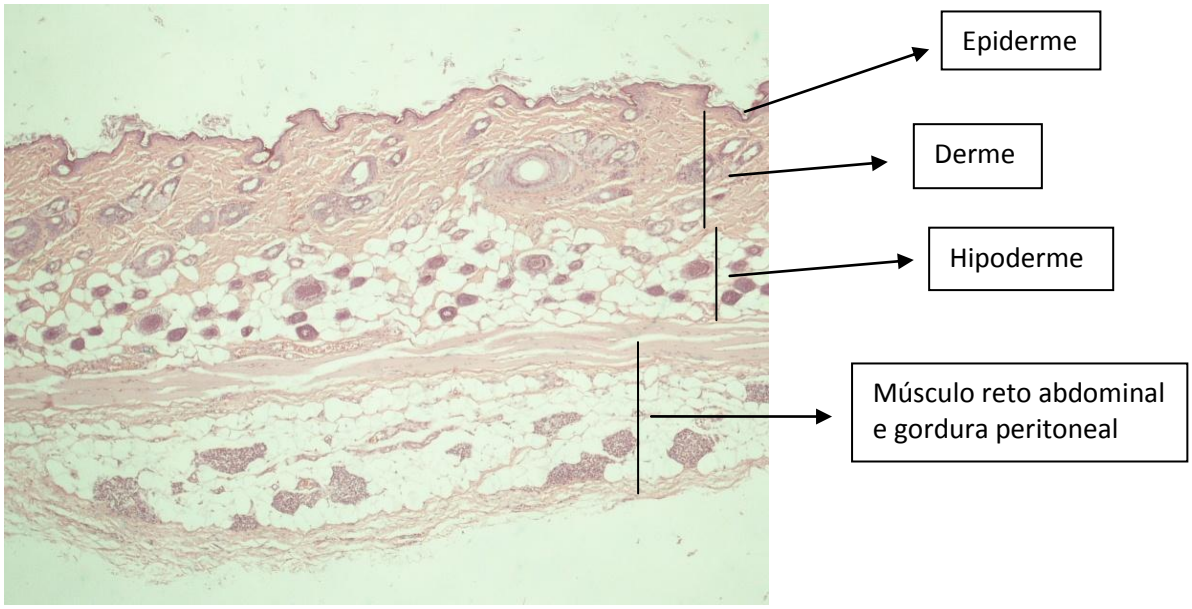
escore	descrição	foto representativa
(1)	Perfil considerado anormal, raras células	
(2)	Poucas células	
(3)	Perfil considerado normal, mas com menos células	
(4)	Células normais	

4.4.6 Análise histológica dos adipócitos

Para realizar a avaliação de tecido adiposo (hipoderme) abdominal dos animais foram realizadas as necropsias dos ratos F1 e os fragmentos de pele fixados em Formol 10% para posteriormente formação dos blocos embebidos em cera de parafina, utilizando as técnicas convencionais. Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (figura A). Cada lâmina correspondente a um animal foi fotografada em cinco campos microscópicos do tecido adiposo (hipoderme) e posteriormente através do software “Image J”, a área de cada célula de gordura que se apresentava inteira no campo de visão, foi medida em pixels e a média calculada para cada rato.

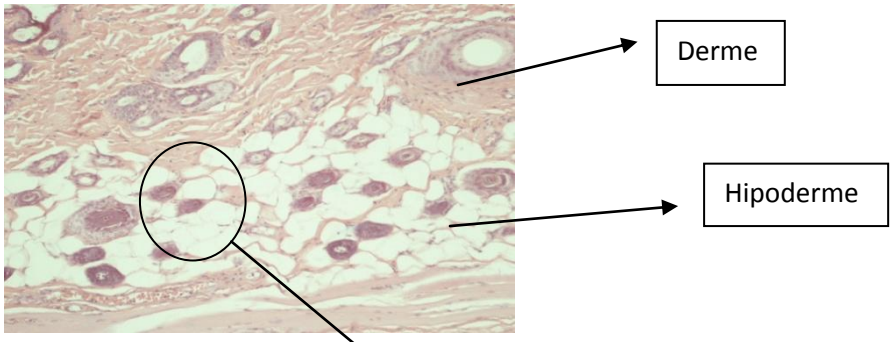
Abaixo são apresentadas as ilustrações do tecido epitelial para a análise histológica dos adipócitos, onde foram realizadas as fotomicrografias dos fragmentos de pele dos animais, utilizando a região da hipoderme.

Figura A – Foto do tecido epitelial, mostrando as diferentes camadas da pele (objetiva 4x)



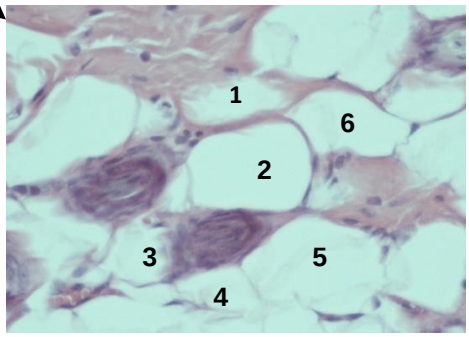
Fonte: Acervo pessoal da Profª Dra.Leoni V. Bonamin (cortesia)

Figura B – Foto do tecido epitelial, mostrando principalmente a Derme e Hipoderme (Objetiva 10x)



Fonte: Acervo pessoal da Profª Dra.Leoni V. Bonamin (cortesia)

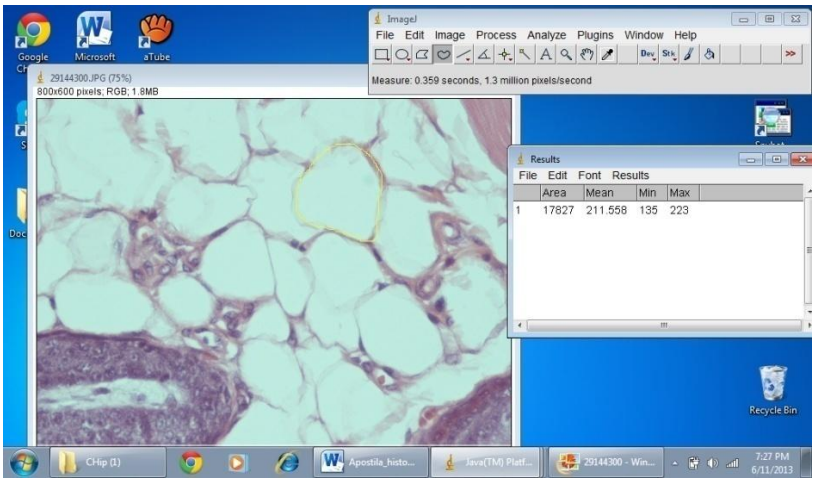
Figura C – Foto do tecido epitelial, mostrando a Hipoderme (objetiva 40x)



Fonte: Acervo pessoal da Profª Dra.Leoni V. Bonamin (cortesia)

Depois de tiradas as microfotografias no aumento de 40x (Figura C), foram realizadas as medidas das áreas dos adipócitos, através do software “Image J” (figura D).

Figura D – Imagem do programa “Image J” para medida das áreas dos adipócitos



Fonte: Acervo pessoal Daclé J. Macrini

4.4.7 Análise dos níveis séricos de Testosterona

Os animais foram sacrificados por decapitação rápida e o sangue do tronco foi recolhido para a análise dos níveis de testosterona. Essa análise foi realizada com os kits comercialmente disponíveis de imunoensaios enzimáticos [ELISA], de acordo com a ficha técnica do kit de testosterona (Cayman química, Ann Arbor, MI, EUA; cat. 582701).

4.4.8 Análise dos níveis séricos de TNF-alfa

Nos mesmos animais sacrificados por decapitação rápida e utilizando o sangue do tronco que foi recolhido, foi realizada a análise dos níveis séricos de TNF-α. Essa análise foi realizada com os kits comercialmente disponíveis de imunoensaios enzimáticos [ELISA], de acordo com a ficha técnica do kit de TNF-α (DuoSet kits, sistemas de P & D, Minneapolis, EUA; cat. DY510).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se o teste t de Student para comparação de dados de dois grupos. A ANOVA de duas vias foi utilizada para análise de dados de várias observações, levando-se em conta os dias e tratamentos. Quando a ANOVA detectou diferenças, o teste de Bonferroni foi usado para análises *post hoc*. As porcentagens obtidas da análise desses comportamentos foram analisadas pelo teste de Fisher. O limite de significância foi estabelecido como 5%.

6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL GERAL

Ratas prenhes foram divididas em dois grupos: experimental e controle. As ratas do grupo experimental receberam 60% da ração daquela consumida pelo grupo controle do dia 2 da gestação (GD2) ao GD18. Essa privação foi feita em regime alimentar pareado, ou seja, tomava-se a quantidade média de ração consumida pelo grupo controle no dia específico da gestação e administrava-se 60% dessa quantidade às fêmeas do grupo experimental no dia da gestação correspondente ao das ratas do grupo controle. A gestação foi a termo e no dia 2 pós-natal observou-se o desempenho reprodutivo das ratas dos dois grupos. No 23° dia de vida a prole masculina dessas ratas foi subdividida em 4 grupos:

1) Filhotes de mães não restritas de ração que receberam ração padrão do laboratório durante a puberdade e idade adulta (NRC);

2) Filhotes de mães não restritas de ração que receberam dieta hipercalórica do 23° ao 65° dia de idade (NRH);

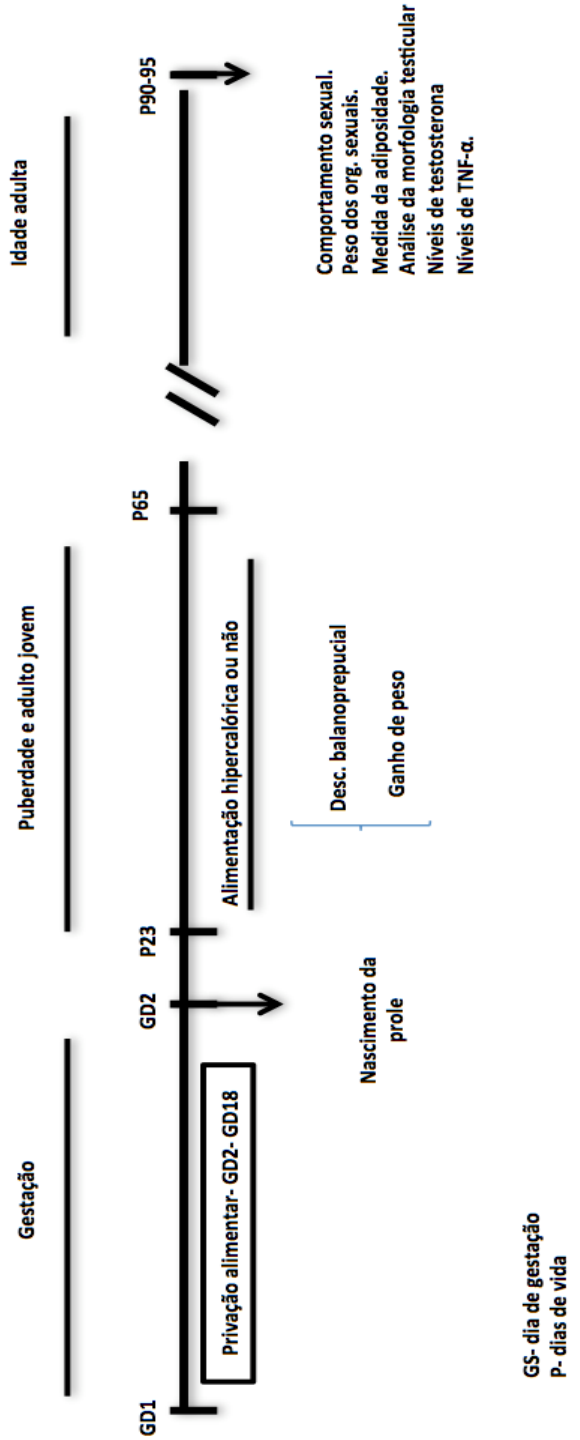
3) Filhotes de mães restritas de ração que receberam ração padrão do laboratório durante a puberdade e idade adulta (FRC);

4) Filhotes de mães restritas de ração que receberam dieta hipercalórica do dia 23º ao dia 65º de idade (FRH).

Após o 65° dia de vida, os animais de todos os grupos receberam ração padrão do laboratório até o término dos experimentos. O peso corporal desses animais foi acompanhado até a idade adulta (90 – 95 dias). O dia de descolamento balanoprepucial foi observado durante o desenvolvimento. Aos 90-95 dias de idade foram avaliados o comportamento sexual, áreas de adipócitos abdominais, peso dos órgãos sexuais, níveis séricos de testosterona e TNF-α, morfologia dos testículos e células de Leydig.

O esquema abaixo (Figura E) ilustra esse delineamento experimental.

Figura E – Esquema do delineamento experimental geral.



7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados individualmente nas páginas seguintes através dos resumos dos trabalhos propostos para publicação e detalhadamente nos artigos submetidos para publicação (ANEXOS 1 e 2).

Parte I – trabalho 1

Pubertal hypercaloric diet disrupts male sexual behavior, reduced testosterone levels and increases serum TNF-α levels of rats in adult age.

A dieta hipercalórica na puberdade reduz o comportamento sexual masculino e os níveis de testosterona sérica aumentando os de TNF-α na idade adulta.

- ✓ **Resumo:**

Neste trabalho são comparados os resultados obtidos de animais que receberam dieta hipercalórica na puberdade com animais tratados com a ração normal e cujas mães não foram submetidas à privação alimentar durante a gestação. A administração de dieta hipercalórica na puberdade de ratos machos promoveu aumento do ganho de peso corporal aos 65 e 90 dias de idade (fig.1), não alterou o dia de descolamento balanoprepucial (fig.2), reduziu o comportamento sexual (fig.3), reduziu o peso de órgãos sexuais (fig.4), reduziu os níveis de testosterona sérica (fig.5A), aumentou a adiposidade (fig.5B) e os níveis séricos de TNF-α (fig.5C).

- ✓ **Resultados:**

São apresentadas a seguir as figuras e gráficos com os respectivos resultados.

Fig.1 - (A) Peso corporal de ratos machos tratados ou não do 23° ao 65° dias de idade com dieta hipercalórica. *p < 0.0001, diferença significante em relação ao respectivo grupo controle (ANOVA para dados repetidos seguidos pelo teste de Bonferroni). (B) Ganho de peso de ratos machos alimentados com dieta hipercalórica na puberdade no 90° dia de idade. ***p < 0.0001 (Teste t de Student). Os dados são apresentados como médias e respectivos erros-padrão (n=8 ratos/grupo).

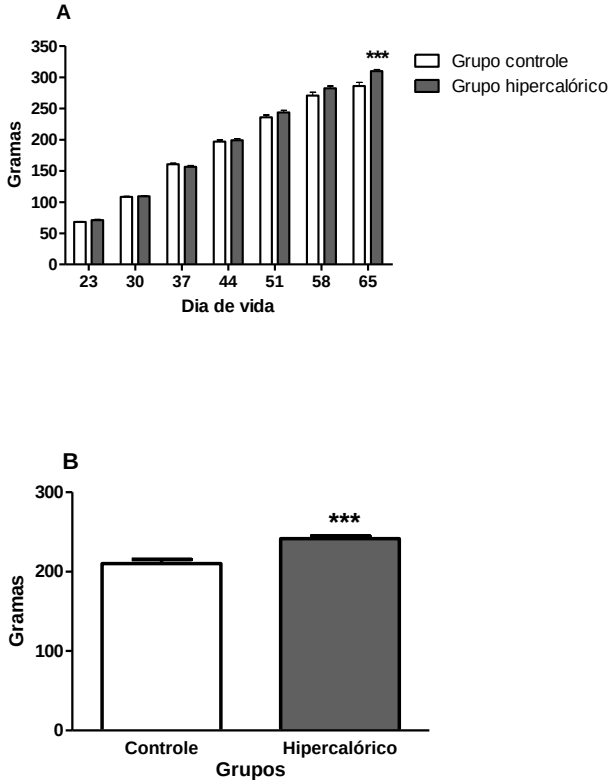


Fig.2 - Dia do descolamento balanoprepucial de ratos machos tratados ou não do 23° ao 65° dias de idade com dieta hipercalórica. Teste t de Student). Os dados são apresentados como médias e respectivos erros-padrão (n=8 ratos/grupo).

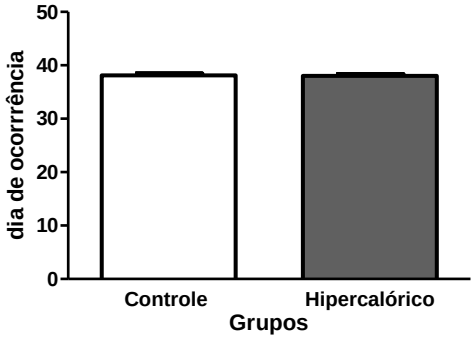


Fig.3 - Comportamento sexual de ratos machos tratados ou não do 23° ao 65° dias de idade com dieta hipercalórica. (A) latência para primeira monta; (B) latência para primeira intromissão; (C) latência para ejaculação; (D) número de montas; (E) porcentagem de ratos que ejacularam em 15 minutos. Os dados são expressos em médias e respectivos erros-padrão (n=7 ratos/grupo). ***p* < 0.01 (teste t de Student). As porcentagens foram analisadas pelo teste de Fisher. ***p* < 0.01.

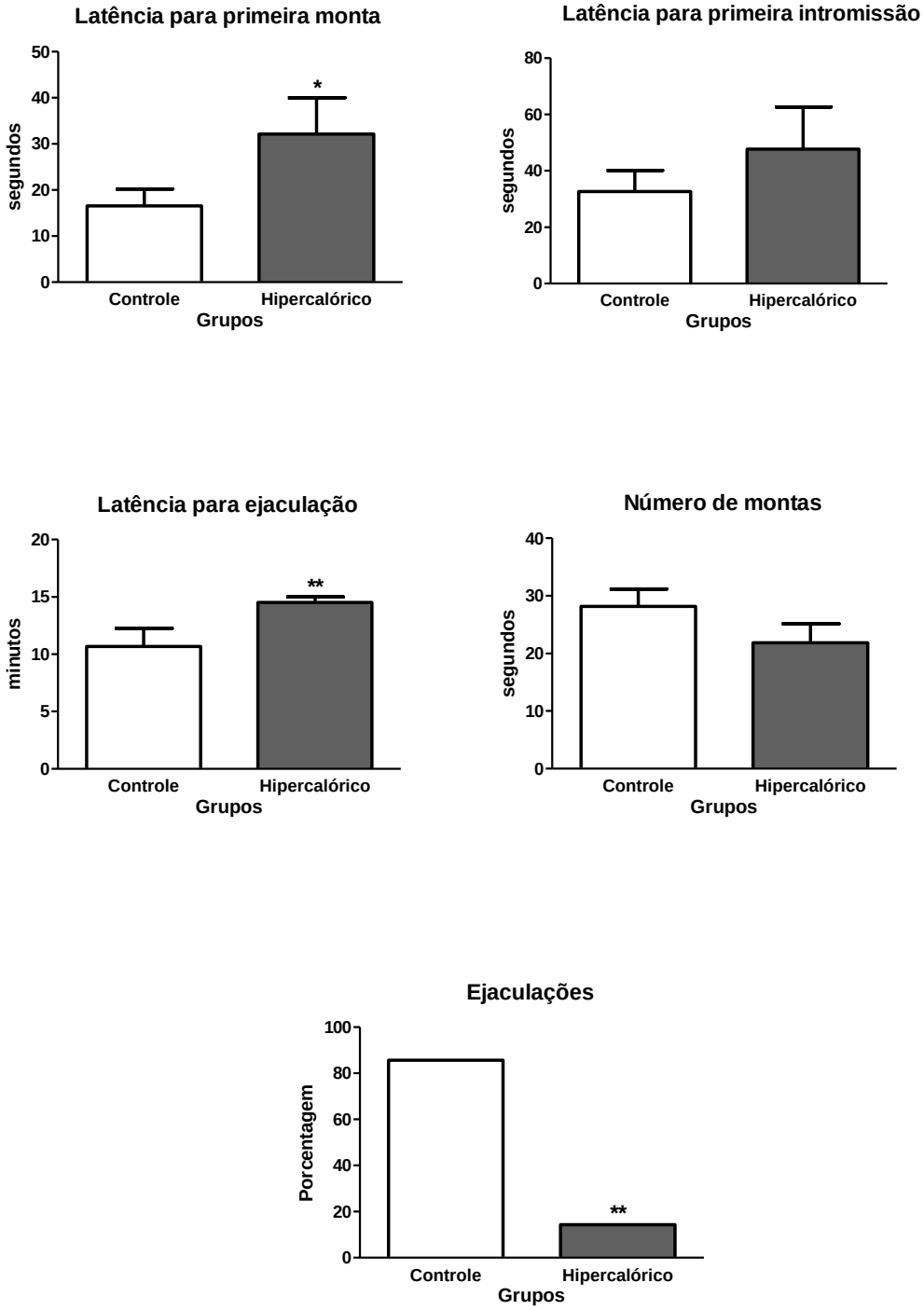


Fig.4 - Peso absoluto e relativo dos testículos e vesícula seminal de ratos machos tratados ou não do 23° ao 65° dias de idade com dieta hipercalórica. (A) peso absoluto dos testículos; (B) peso relativo dos testículos. * p< 0,05 em relação ago grupo controle, teste t de Student em relação ao grupo controle. (C) peso absoluto da vesícula seminal. **p* = 0.04, teste t de Student em relação do grupo controle; (D) peso relativo da vesícula seminal. ***p* = 0.02 (teste t de Student). Os dados são apresentados como média e respectivos erros-padrão (n= 8 ratos/grupo).

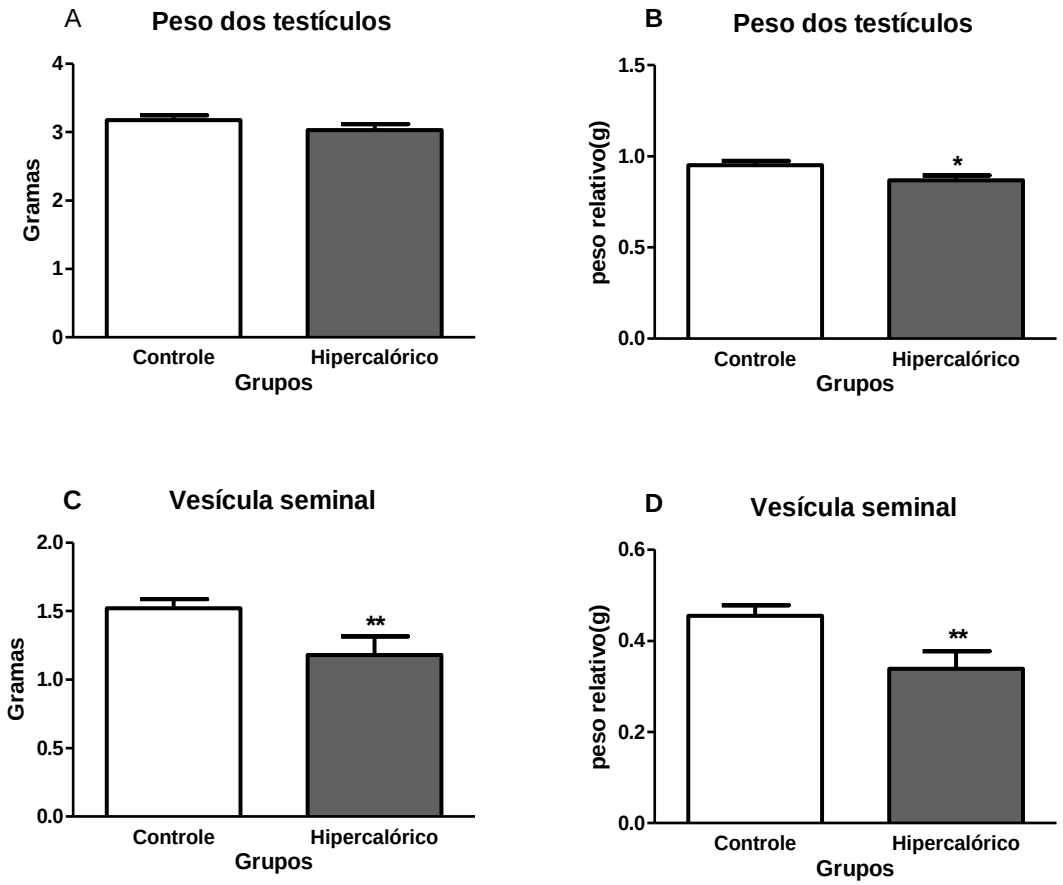
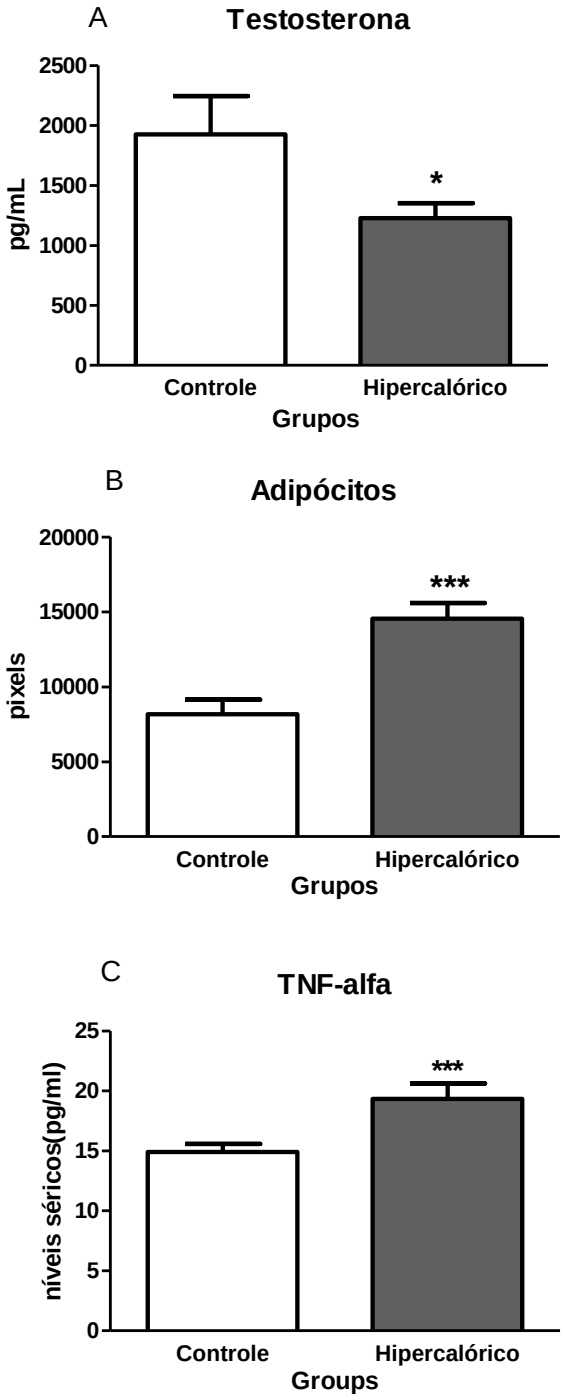


Fig. 5 - Níveis séricos de testosterona (A, n=7-10 ratos/grupo), área dos adipócitos (B, n=10 ratos/grupo) e níveis séricos de TNF-α (C, n=10 ratos/ grupo) de ratos machos tratados ou não do 23° ao 65° dias de idade com dieta hipercalórica. Os dados são apresentados como médias e respectivos erros-padrão. * p< 0,05, **p< 0.01, ***p< 0,001 em relação ao grupo controle (Teste t de Student).



✓ Comentários e Conclusões

1) A administração de dieta hipercalórica durante a puberdade promoveu aumento no ganho de peso nos ratos expresso apenas no início da idade adulta, ou seja, aos 65 dias de idade. Na idade adulta (90-95 dias de idade), apesar de a dieta hipercalórica ter sido substituída por ração normal de ratos no 65°dia de idade, esse aumento no ganho de peso ainda foi significativamente maior nos animais tratados com a dieta hipercalórica em relação ao grupo controle. Uma vez que esse aumento foi cerca de 15% maior que no grupo controle, caracterizou-se que os animais do grupo experimental estavam obesos. O aumento da área dos adipócitos nesse grupo reforça esta afirmação.
2) A administração de dieta hipercalórica durante a puberdade não promoveu alteração no dia de descolamento balanoprepucial dos ratos em relação ao grupo controle, fato indicativo de que a alimentação hipercalórica não modificou o dia de ocorrência da puberdade.
3) A administração de dieta hipercalórica durante a puberdade reduziu o comportamento sexual dos ratos do grupo experimental em relação ao controle. E tanto os parâmetros ligados à fase apetitiva como com a consumatória foram reduzidos.
4) A administração de dieta hipercalórica durante a puberdade reduziu o peso dos testículos e da vesícula seminal em relação ao grupo controle.
5) A administração de dieta hipercalórica durante a puberdade reduziu os níveis de testosterona sérica em relação ao grupo controle. Este dado pode explicar a redução no comportamento sexual uma vez que é eliciado por esse hormônio. A redução dos níveis de testosterona pode estar envolvida com a redução do peso dos testículos e vesícula seminal dos ratos do grupo experimental.
6) A administração de dieta hipercalórica durante a puberdade aumentou os níveis de TNF-α. É fato conhecido que a obesidade estaria ligada a processos inflamatórios, ou seja, na obesidade os adipócitos liberam mediadores inflamatórios. Desde que citocinas pró inflamatórias como o TNF-α, inibem as funções gonadais, sugeriu-se que a redução dos níveis de testosterona tenha sido causado pelo aumento dos níveis dessas citocinas.

Baseado nos dados acima, a hipótese para explicar os resultados seria que a alimentação hipercalórica de ratos machos durante a puberdade induziu à obesidade e ao aumento da área dos adipócitos. Esses adipócitos liberaram maiores quantidades de TNF-α, que reduziu a liberação de testosterona. A redução dos níveis desse hormônio seria responsável pelo prejuízo no comportamento sexual e redução do peso dos órgãos sexuais.

Parte II – trabalho 2

Maternal food deprivation differentially affect the sexual behavior, area of adipocytes cells, plasma testosterone and TNF-α levels in pup male rats fed or not during prepubertal age with hypercaloric diet.

A privação alimentar maternal afeta diferencialmente o comportamento sexual, a área dos adipócitos, os níveis séricos de testosterona e TNF-α na prole de ratas alimentadas durante o período peripuberal com dieta hipercalórica.

✓ **Resumo**

Neste trabalho são comparados os resultados obtidos de animais, cujas mães foram privadas de ração do GD2 ao GD18 em 60% que receberam ou não dieta hipercalórica do 23° ao 65° dias de idade. Como grupo controle branco tomou-se os dados de filhotes que receberam ração normal e cujas mães não foram privadas de ração na gestação e receberam a ração normal do biotério. Têm-se então os seguintes grupos:

- NRC - filhotes de ratas não privadas de ração que receberam ração normal do laboratório durante a puberdade e idade adulta;
- FRC - filhotes de ratas privadas de ração que receberam ração normal do laboratório durante a puberdade e idade adulta;
- FRH - filhotes de ratas privadas de ração que receberam dieta hipercalórica do dia 23º ao dia 65º de idade.

Verificou-se que:

1) No desempenho reprodutivo houve redução do número de filhotes machos e fêmeas bem como do peso médio das ninhadas de ratas privadas de ração na gestação em relação àquelas do grupo não privado (tabela 1);
2) Aumento no ganho de peso dos filhotes do grupo FRH em relação àqueles dos grupos FRC e NRC durante o desenvolvimento, porém na idade adulta essas diferenças não mais ocorreram (fig.1);
3) No comportamento sexual houve aumento da latência para primeira intromissão no grupo FRC em relação aos grupos FRH e NRC, não havendo diferenças significantes entre os dados do comportamento sexual dos grupos FRH e NRC (fig.2);

4) Não foram observadas diferenças significantes entre os pesos absolutos e relativos dos testículos e vesículas seminais dos diferentes grupos (fig. Suplementar);
5) Houve aumento na área dos adipócitos no grupo FRH em relação àqueles dos grupos FRC e NRC (fig.3A);
6) Não foram observadas diferenças significantes nos níveis de testosterona (fig.3B) dos grupos FRC e FRH, porém verificou-se aumento nos níveis séricos de TNF-α do grupo FRC em relação àqueles do grupo NRC (fig.3 C).

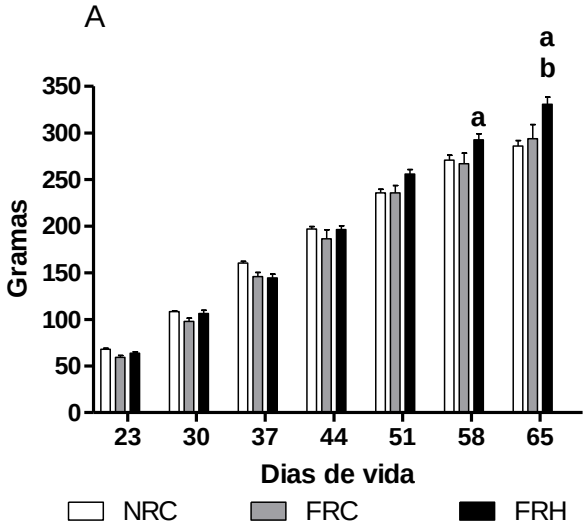
✓ **Resultados**

Tabela 1. Desempenho reprodutivo de ratas privadas ou não em 60% de alimento durante a gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão, porcentagens e valores absolutos dos dados obtidos (controle, n=6 ninhadas; experimental, n=12 ninhadas.

Parâmetros	Controle	Experimental
N^0 de fêmeas cruzadas	8	18
N^0 de fêmeas que emprenharam	6/8 (75%)	12/18 (66,67%)
Peso médio das fêmeas após o parto(g)	267,50±7,96	251,50±9,27
N^0 total de filhotes	64	42
N^0 total de filhotes machos	24	17
N^0 total de filhotes fêmeas	40	25
N^0 médio dos filhotes machos	4,0±0,26	1,42±0,20***
N^0 médio dos filhotes fêmeas	6,67±0,56	2,08±0,38***
Peso médio da ninhada (g)	66,68±3,27	22,60±2,55***

***p<0,0001 teste t de Student em relação ao grupo controle.

Fig.1 - Peso corporal durante a puberdade (A) e ganho de peso na idade adulta(B) de ratos machos de mães restritas de ração ou não durante a gestação, que receberam ou não do 23°ao 65° dias de idade dieta hipercalórica. NRC - ratas não privadas de ração na gestação, cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRC - ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRH - ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu dieta hipercalórica do 23° ao 65° dias de idade e a partir desse dia receberam ração normal. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, n=8 ratos/grupo para análise dos dados do peso no desenvolvimento, (a-p< 0.05, b-p< 0.01 em relação ao grupo NRC). Os dados de ganho de peso na idade adulta foram comparados pela ANOVA de uma via.



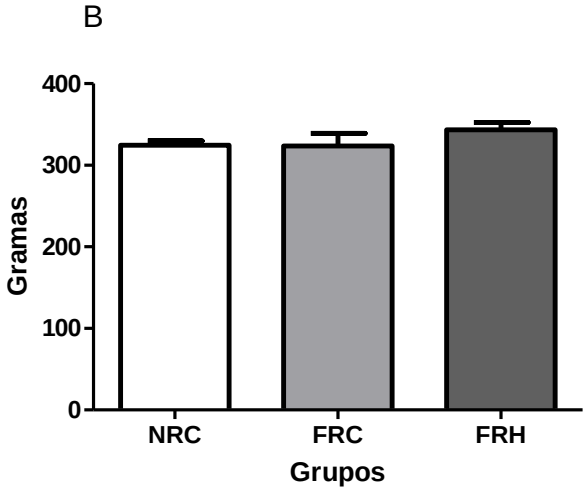


Fig.2 - Comportamento sexual de ratos machos de mães restritas de ração ou não durante a gestação, que receberam ou não do 23°ao 65° dias de idade dieta hipercalórica. NRC- ratas não privadas de ração na gestação cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRC- ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRH- ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu dieta hipercalórica do 23° ao 65° dias de idade e a partir desse dia receberam ração normal. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão, ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tuckey, * p< 0.05 em relação ao grupo NRC, n=7-8 ratos/grupo.

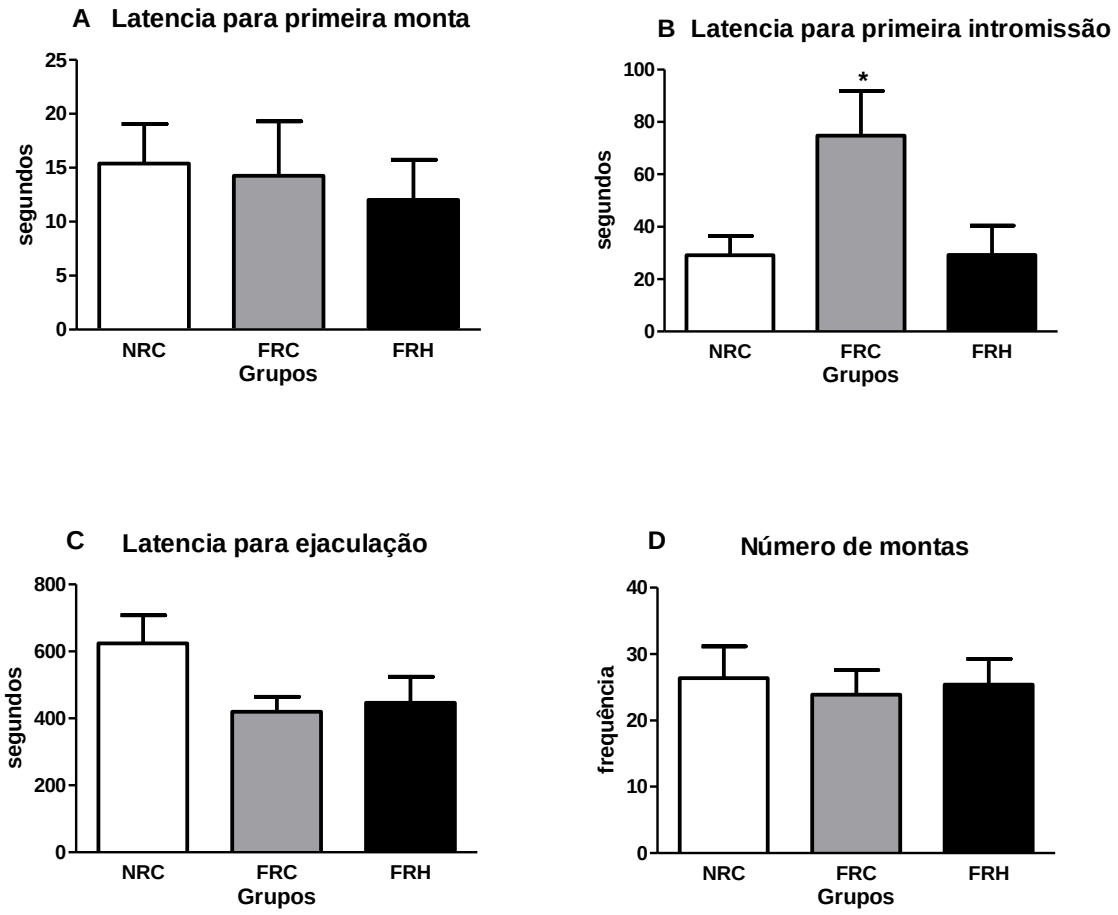


Fig.Suplementar - Peso absoluto e relativo dos testículos (A e B, respectivamente) e das vesículas seminais (C e D respectivamente) de ratos machos de mães restritas de ração ou não durante a gestação e que receberam ou não do 23°ao 65° dias de idade, dieta hipercalórica. NRC - ratas não privadas de ração na gestação, cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRC - ratas privadas de ração na gestação, cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRH - ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu dieta hipercalórica do 23° ao 65° dias de idade e a partir deste dia receberam ração normal. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. ANOVA de uma via. N=8 ratos/grupo.

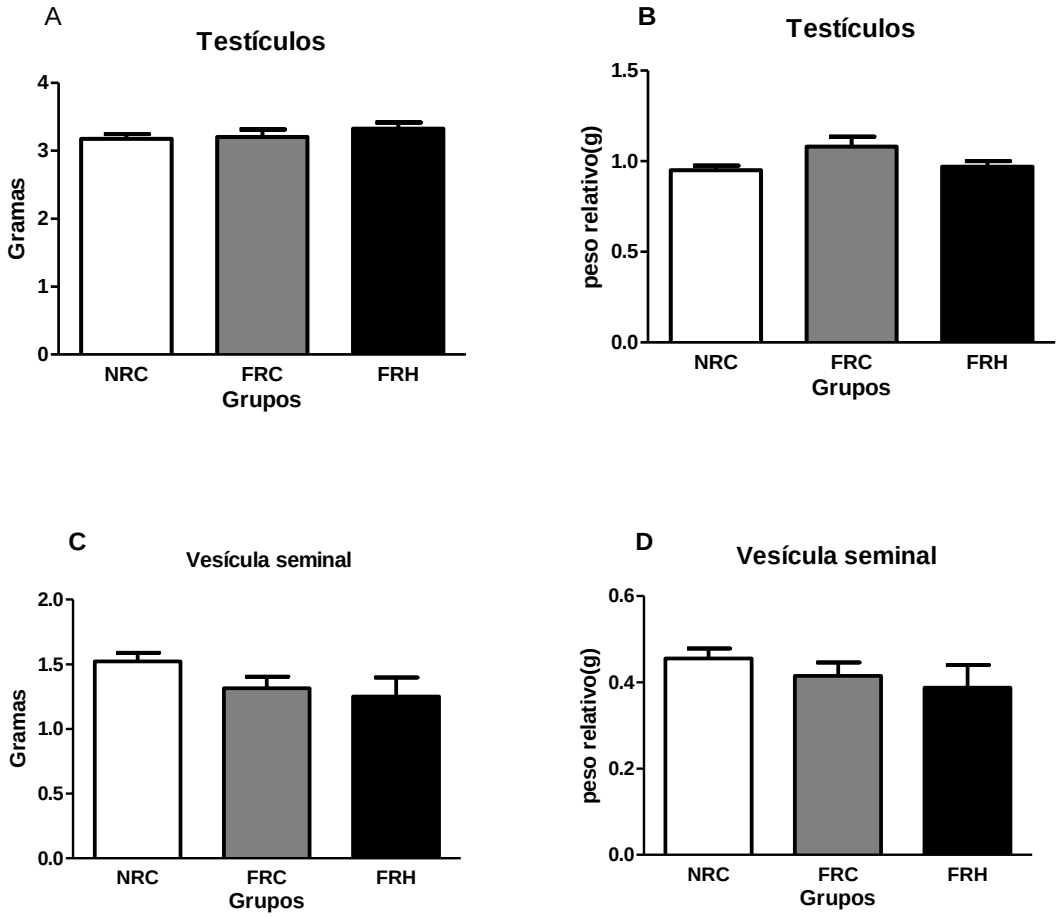
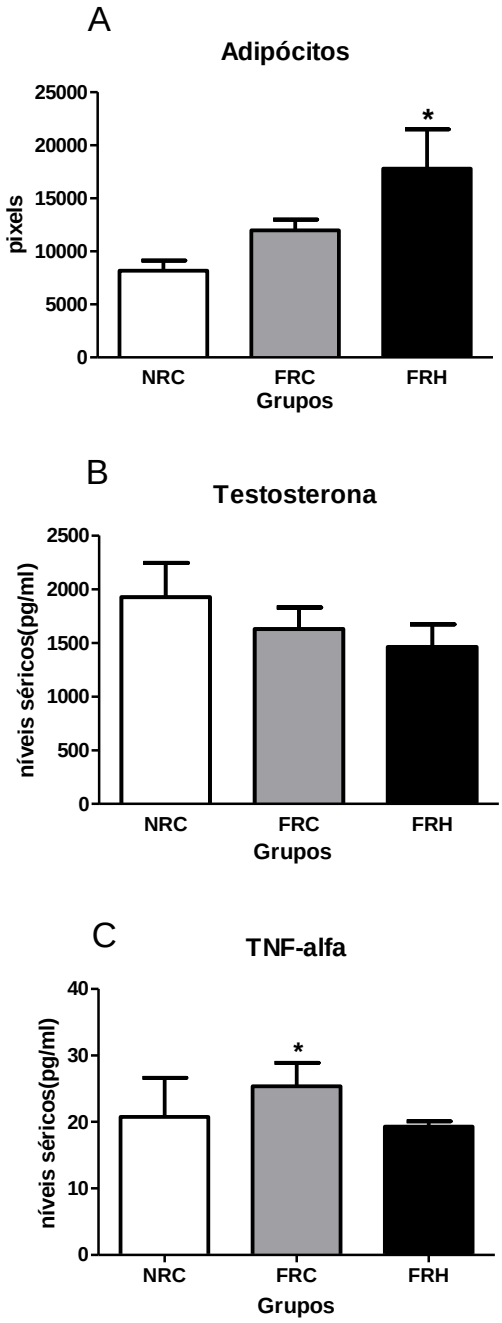


Fig.3 - Área dos adipócitos (A), níveis séricos de testosterona (B) e de TNF-α(C) de ratos machos de mães restritas de ração ou não durante a gestação que receberam ou não do 23°ao 65° dias de idade dieta hipercalórica. NRC- ratas não privadas de ração na gestação cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRC- ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRH- ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu dieta hipercalórica do 23° ao 65° dias de idade e a partir desse dia receberam ração normal. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tuckey, * p< 0.05 em relação ao grupo NRC, n=7-10 /grupo.



- ✓ **Comentários e Conclusões**

1) A redução do número de filhotes, machos e fêmeas durante a gestação das fêmeas privadas de ração em relação ao não privado foi atribuída à privação alimentar durante a gestação. A ausência de alterações no peso corporal dos filhotes ao desmame deveu-se a volta da alimentação normal das mães o que, provavelmente, permitiu produção de leite suficiente para permitir o desenvolvimento ponderal da prole.
2) Apenas os ratos de mães privadas de ração na gestação e que receberam dieta hipercalórica (grupo FRH) apresentaram aumento no ganho de peso nos dias 58 e 65 de idade em relação ao dos grupos NRC e FRC . Além disso, na idade adulta não foram observadas alterações no peso corporal dos três grupos. Esses dados não estão de acordo com a literatura, pois é fato conhecido que a privação materna tem efeitos a longo prazo no peso de sua prole, levando à obesidade. Essas discrepâncias foram atribuídas às diferenças no início, duração e tipo de privação.
3) Observou-se aumento nas áreas de adipócitos nos ratos machos do grupo FRH em relação aos grupos NRC e FRC, sugerindo a obesidade nos ratos do grupo FRH.

   O maior peso corporal associado à maior área de adipócitos do grupo FRH foram associados a adaptações no metabolismo da prole devido a alterações no ambiente maternal. Essas adaptações podem ser benéficas ou prejudiciais para a sobrevivência da prole. Desse modo, a restrição de alimento materna poderia alterar a programação fetal em períodos mais tardios da vida reduzindo seu sucesso reprodutivo, mas aumentando a sua probabilidade de sobrevivência.
4) A latência para a primeira intromissão do grupo FRC foi maior que dos demais grupos, sugerindo redução da motivação sexual desse grupo. Os demais parâmetros do comportamento sexual não foram modificados nos grupos FRC e FRH.

   A restrição alimentar materna tem efeitos severos nos aspectos reprodutivos, e a alimentação hipercalórica na puberdade desses animais pode restaurar a supressão de comportamento copulatórios e explicaria a ausência de efeitos na esfera reprodutiva dos ratos do grupo FRH. No entanto, a

privação alimentar materna do grupo FRC induziu poucas modificações no comportamento sexual.

5) Não foram observadas alterações nos níveis de testosterona sérica e no peso dos testículos e vesículas seminais nos animais do grupo FRH o que reforça a ausência de efeitos no comportamento sexual desse grupo uma vez que esse hormônio elicia o comportamento sexual. Os níveis de testosterona e o peso dos órgãos sexuais dos animais do grupo FRC não foram alterados em relação ao grupo NRC. Provavelmente, alterações nos níveis desse hormônio não estão envolvidos com o aumento da motivação sexual desse grupo.

6) Observou-se aumento nos níveis de TNF-α nos ratos do grupo FRC mas não naqueles do grupo FRH, embora área dos adipócitos tenha sido maior no grupo FRH do que nos demais grupos.

Os adipócitos produzem citocinas, as adipocinas, que estão positiva ou negativamente correlacionadas com processos inflamatórios. Por isso, a obesidade é considerada um processo inflamatório crônico. Dentre as adipocinas liberadas pelos adipócitos na obesidade, destaca-se o TNF-α com propriedades pró inflamatórias. Dessa forma, o aumento da adiposidade nos animais do grupo FRH sugeriria a presença de inflamação crônica. No entanto, os níveis dessas citocinas no grupo FRH não se mostraram diferentes daqueles do grupo NRC, sugerindo que a alimentação hipercalórica na puberdade e início da vida adulta tenha revertido os efeitos da privação alimentar.

Não foi observado aumento na área dos adipócitos nos animais do grupo FRC, mas os níveis da citocinas estavam aumentados nesses animais, o que sugere a presença de processo inflamatório.

A privação alimentar materna induziu obesidade em filhotes alimentados durante a puberdade com dieta hipercalórica. No entanto, esse fato não ocorreu em filhotes de mães com alimentação restrita mas com dieta normal durante a puberdade. Somente a restrição materna de alimento levou à redução da motivação sexual, sendo revertido pela dieta hipercalórica da prole na puberdade. Não foram observadas correlações entre níveis de hormônios, redução na motivação sexual, aumento na área de adipócitos e níveis séricos de TNF-α. O entendimento destes dados contraditórios permanecem por serem melhor investigados.

Parte III – Estudo morfológico

Sobre o estudo morfológico dos testículos e células de Leidyg

✓ **Resumo**

Foi realizado um estudo inicial da morfologia testicular de ratos machos dos seguintes grupos:

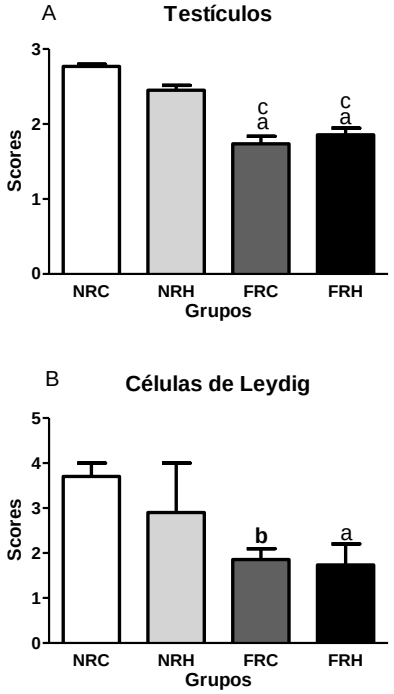
- NRC - filhotes de ratas não privadas de ração que receberam ração normal do laboratório durante a puberdade e idade adulta;
- NRH - filhotes de ratas não privadas de ração que receberam dieta hipercalórica do 23° ao 65° dia de idade;
- FRC - filhotes de ratas privadas de ração que receberam ração normal do laboratório durante a puberdade e idade adulta;
- FRH - filhotes de ratas privadas de ração que receberam dieta hipercalórica do dia 23° ao dia 65° de idade.

Na idade adulta (90-95 dias de idade) os testículos foram removidos e pesados, sendo um testículo de cada par imerso e fixado em solução de Bouin por 5.5 h. Após a fixação foram desidratados em álcool a 70% e embebidos em parafina usando técnicas padrão. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina. Cada secção foi fotografada e 5 delas/rato foram aleatoriamente escolhidas para observação em microscópio a 10x de magnificação para a avaliação morfológica e semi quantitativa. Os seguintes escores foram atribuídos a cada secção observada: (3) testículos com população de células maduras facilmente vistas no lúmen tubular, espermatócitos primários e secundários, e espermatogônias em grande quantidade; (2) testículos com menor intensidade de população de células, menores quantidades de espermatócitos primários e secundários, e espermatogônias; (1) fino epitélio testicular com espermatozoides maduros raros ou ausentes e raros espermatócitos primários e secundários. Ao final das observações foram calculadas as medianas dos escores de cada animal.

As células de Leydig foram também avaliadas usando os seguintes escores: (4) - células normais, (3) - perfil normal, porém com menos células, (2) - poucas células, e (1) - perfil anormal e poucas células. Ao final das observações foram calculadas as medianas dos escores de cada animal.

- ✓ **Resultados**

Fig.1 - Avaliação morfológica e semi quantitativa dos testículos e células de Leydig de ratos machos de mães restritas de ração ou não durante a gestação e que receberam ou não do 23°ao 65° dias de idade dieta hipercalórica. NRC- ratas não privadas de ração na gestação, cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; NRH- ratas não privadas de ração na gestação cuja prole recebeu dieta hipercalórica durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRC- ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu ração normal durante seu desenvolvimento e na idade adulta; FRH- ratas privadas de ração na gestação cuja prole recebeu dieta hipercalórica do 23° ao 65° dias de idade e a partir desse dia receberam ração normal. Os dados são apresentados em médias e respectivos erros-padrão. Análise de variância de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. a- p< 0.0001 em relação ao grupo NRC; b- p<0.01 em relação ao grupo NRC, c-p< 0.5 em relação ao grupo NRH. n=7-10 /grupo.



- ✓ **Comentários e Conclusões**

Os resultados mostraram que em ratos cujas mães foram privadas de ração na gestação (grupos FRC e FRH) apresentaram menores escores tanto na avaliação testicular como naquela das células de Leydig, sugerindo lesão testicular nestes dois últimos grupos. Estes resultados são iniciais, pois o material incluído em parafina será submetido a uma nova coloração e metodologia para avaliação mais detalhada dos testículos e células de Leydig. Dessa forma, as correlações com os demais dados deste trabalho serão feitas após essa nova avaliação.

8 CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a privação alimentar materna bem como a dieta hipercalórica da prole alterou a programação fetal de ratos promovendo respostas diferenciais de comportamento, nos níveis hormonais e de citocinas na idade adulta desses animais.

A alimentação hipercalórica administrada a ratos machos no período peripuberal da vida levou à obesidade e prejuízos na reprodução.

A privação materna por si só não levou à obesidade quando os animais foram alimentados com ração normal durante a fase peripuberal, no entanto, quando as mães foram privadas de ração na gestação e sua prole alimentada com ração hipercalórica, a obesidade no início da idade adulta ficou ainda mais evidente.

A alimentação hipercalórica da prole levou a prejuízos na reprodução desses animais. No entanto, com a privação alimentar materna, mesmo sendo essa prole submetida à dieta hipercalórica, houve uma reversão nesses prejuízos. Os mecanismos subjacentes a esse efeito de reversão permanecem por serem esclarecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adrian, T. E., A. P. Savage*, et al.* Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. Gastroenterology, v.89, n.3, Sep, p.494-9. 1985.

Ainslie, D. A., M. J. Morris*, et al.* Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. Int J Obes Relat Metab Disord, v.25, n.11, Nov, p.1680-8. 2001.

Air, E. L., M. Z. Strowski*, et al.* Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. Nat Med, v.8, n.2, Feb, p.179-83. 2002.

Al-Suhaimi, E. A. e A. Shehzad. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. Eur J Med Res, v.18, n.1, p.12. 2013.

Arnold, M., A. Mura*, et al.* Gut vagal afferents are not necessary for the eating-stimulatory effect of intraperitoneally injected ghrelin in the rat. Journal of Neuroscience, v.26, n.43, p.11052-11060. 2006.

Asrih, M. e F. R. Jornayvaz. Diets and nonalcoholic fatty liver disease: The good and the bad. Clin Nutr, Nov 8. 2013a.

_____. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. Journal of Endocrinology, v.218, n.3, Sep, p.R25-36. 2013b.

Aubert, M. L., D. D. Pierroz*, et al.* Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin. Mol Cell Endocrinol, v.140, n.1-2, May 25, p.107-13. 1998.

Barnes, M. J., K. Lapanowski*, et al.* High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. Brain Research Bulletin, v.61, n.5, Sep 30, p.511-9. 2003.

Benoit, S., M. Schwartz*, et al.* CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake. Horm Behav, v.37, n.4, Jun, p.299-305. 2000.

Bernardis, L. L. e B. D. Patterson. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. Journal of Endocrinology, v.40, n.4, Apr, p.527-8. 1968.

Briel, M., I. Ferreira-Gonzalez*, et al.* Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. BMJ, v.338, p.b92. 2009.

Bruning, J. C., D. Gautam, *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science, v.289, n.5487, Sep 22, p.2122-5. 2000.

Burdyga, G., A. Varro, *et al.* Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.290, n.6, Jun, p.G1289-97. 2006.

Caminos, J. E., R. Nogueiras, *et al.* Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. Endocrinology, v.149, n.7, Jul, p.3390-402. 2008.

Campos, K. E., G. T. Volpato, *et al.* Effect of obesity on rat reproduction and on the development of their adult offspring. Braz J Med Biol Res, v.41, n.2, Feb, p.122-5. 2008.

Castellano, J. M., J. Roa, *et al.* KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. Peptides, v.30, n.1, Jan, p.139-45. 2009.

Cervi, A., S. C. Franceschini, *et al.* Índice de Massa Corporal em Idosos. . Rev. Nutr., v.18, n.6, p.765-775. 2005.

Cheung, C. C., D. K. Clifton, *et al.* Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. Endocrinology, v.138, n.10, Oct, p.4489-92. 1997.

Clegg, D. J., L. M. Brown, *et al.* Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. Diabetes, v.55, n.4, Apr, p.978-87. 2006.

Coppack, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. Proceedings of the Nutrition Society, v.60, n.3, Aug, p.349-56. 2001.

Cowley, M. A., J. L. Smart, *et al.* Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. Nature, v.411, n.6836, May 24, p.480-4. 2001.

Crowley, W. R. e S. P. Kalra. Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones. Neuroendocrinology, v.46, n.2, Aug, p.97-103. 1987.

Dandona, P., S. Dhindsa, *et al.* Hypogonadotrophic hypogonadism in type 2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. Curr Mol Med, v.8, n.8, Dec, p.816-28. 2008.

Doherty, P. C., M. J. Baum, *et al.* Evidence of incomplete behavioral sexual differentiation in obese male Zucker rats. Physiol Behav, v.34, n.2, Feb, p.177-9. 1985.

Eckel, R. H., S. M. Grundy*, et al.* The metabolic syndrome. Lancet, v.365, n.9468, Apr 16-22, p.1415-28. 2005.

Edmonds, E. S., S. K. Dallie*, et al.* Reproductive system of the obese male zucker rat. Reproductive capacity, artificial insemination and plasma testosterone levels. Biol Reprod, v.27, n.4, Nov, p.891-7. 1982.

Elmquist, J. K. e J. S. Flier. Neuroscience. The fat-brain axis enters a new dimension. Science, v.304, n.5667, Apr 2, p.63-4. 2004.

Ershler, W. B. e E. T. Keller. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. Annu Rev Med, v.51, p.245-70. 2000.

Fatani, S., L. C. Pickavance*, et al.* Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenonological study. Nutr Metab (Lond), v.4, p.15. 2007.

Felicio, L. F., J. C. Florio*, et al.* Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. Brain Res Bull, v.40, n.4, p.253-6. 1996.

Fernandez, C. D., F. F. Bellentani*, et al.* Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. Reproductive Biology and Endocrinology, v.9, p.32. 2011.

Fonseca-Alaniz, M. H., J. Takada*, et al.* Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. J Pediatr (Rio J), v.83, n.5 Suppl, Nov, p.S192-203. 2007.

George, J. T., R. P. Millar*, et al.* Hypothesis: kisspeptin mediates male hypogonadism in obesity and type 2 diabetes. Neuroendocrinology, v.91, n.4, p.302-7. 2013.

Gottlieb, M. G. V., I. B. M. Cruz*, et al.* Origin of the metabolic syndrome: genetic,evolutionary and nutritional aspects. *Scientia Medica*, v.18, n.1, p.31-38. 2008.

Guo, S. S. e W. C. Chumlea. Tracking of body mass index in children in relation to overweight in adulthood. American Journal of Clinical Nutrition, v.70, n.1, Jul, p.145S-8S. 1999.

Hales, C. N. e D. J. Barker. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia, v.35, n.7, Jul, p.595-601. 1992.

Halpern, Z. S. C., M. B. Rodrigues*, et al.* Physiological Determinants of Weight and Appetite Control. Revista de Psquiatria Clínica, v.31, n.4, p.150-153. 2004.

Halpern, Z. S. C., M. D. B. Rodrigues*, et al.* Physiological Determinants of Weight and Appetite Control. Rev. Psiq. Clin., v.31, n.4, p.150-153. 2004.

Hammoud, A. O., M. Gibson*, et al.* Obesity and male reproductive potential. J Androl, v.27, n.5, Sep-Oct, p.619-26. 2006.

Hanson, M., K. M. Godfrey*, et al.* Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. Prog Biophys Mol Biol, v.106, n.1, Jul, p.272-80. 2010.

Harwood, H. J., Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. Neuropharmacology, v.63, n.1, Jul, p.57-75. 2012.

Havel, P. J., S. Kasim-Karakas*, et al.* Gender differences in plasma leptin concentrations. Nat Med, v.2, n.9, Sep, p.949-50. 1996.

Heal, D. J., J. Gosden*, et al.* Regulatory challenges for new drugs to treat obesity and comorbid metabolic disorders. british journal of clinical pharmacology, v.68, p.861-874. 2009.

Hill, J. W., J. K. Elmquist*, et al.* Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.294, n.5, May, p.E827-32. 2008.

Jensen, T. K., A. M. Andersson*, et al.* Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. Fertil Steril, v.82, n.4, Oct, p.863-70. 2004a.

_____. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. Fertility and Sterility, v.82, n.4, Oct, p.863-70. 2004b.

Jockenhovel, F., W. F. Blum*, et al.* Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. J Clin Endocrinol Metab, v.82, n.8, Aug, p.2510-3. 1997.

Kalra, S. P., M. G. Dube*, et al.* Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocr Rev, v.20, n.1, Feb, p.68-100. 1999.

Kolodecik, T., C. Shugrue*, et al.* Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets. Front Physiol, v.4, p.415. 2014.

Kong, A. P., N. N. Chan*, et al.* The role of adipocytokines and neurohormonal dysregulation in metabolic syndrome. Curr Diabetes Rev, v.2, n.4, Nov, p.397-407. 2006.

Konturek, P. C., S. J. Konturek*, et al.* Neuroendocrinology of gastric H+ and duodenal HCO3- secretion: the role of brain-gut axis. Eur J Pharmacol, v.499, n.1-2, Sep 19, p.15-27. 2004.

Kort, H. I., J. B. Massey*, et al.* Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. Journal of Andrology, v.27, n.3, May-Jun, p.450-2. 2006.

Kristensen, K., S. B. Pedersen*, et al.* Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun, v.259, n.3, Jun 16, p.624-30. 1999.

Lal, A., M. Moodie*, et al.* Health care and lost productivity costs of overweight and obesity in New Zealand. Aust N Z J Public Health, v.36, n.6, Dec, p.550-6. 2012.

Landry, D., F. Cloutier*, et al.* Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. Reprod Biol, v.13, n.1, Mar, p.1-14. 2013.

Lean, M. E., T. S. Han*, et al.* Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. BMJ, v.311, n.6998, Jul 15, p.158-61. 1995.

Lee, H., I. S. Lee*, et al.* Obesity, Inflammation and Diet. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, v.16, n.3, Sep, p.143-152. 2013.

Lehnert, T., D. Sonntag*, et al.* Economic costs of overweight and obesity. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, v.27, n.2, Apr, p.105-15. 2013.

Leroux, C., A. S. Brazeau*, et al.* Lifestyle and Cardiometabolic Risk in Adults with Type 1 Diabetes: A Review. Can J Diabetes, v.38, n.1, Feb, p.62-69. 2014.

Lonnqvist, F., A. Thorne*, et al.* Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.17, n.7, Jul, p.1472-80. 1997.

Lopresti, A. L. e P. D. Drummond. Obesity and psychiatric disorders: commonalities in dysregulated biological pathways and their implications for treatment. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, May 14. 2013.

Lorente-Cebrian, S., N. Mejhert*, et al.* MicroRNAs Regulate Human Adipocyte Lipolysis: Effects of miR-145 Are Linked to TNF-alpha. PLoS One, v.9, n.1, p.e86800. 2014.

Luukkaa, V., U. Pesonen*, et al.* Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.9, Sep, p.3243-6. 1998.

Machado, P. A. N. e R. Sichieri. Relação cintura-quadril e fatores de dieta em adultos. Rev Saúde Pública, v.36, n.2, p.198-204. 2002.

Magnusdottir, E. V., T. Thorsteinsson*, et al.* Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. Hum Reprod, v.20, n.1, Jan, p.208-15. 2005.

Male, D. Intoduction to the immune system. In: I. Roitt, J. Brostoff*, et al* (Ed.). Immunobiology. London: Mosby, v.1, 2001. Intoduction to the immune system

Mannucci, E., A. Ognibene*, et al.* Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. Eur J Endocrinol, v.139, n.2, Aug, p.198-201. 1998.

Marti, A., A. Marcos*, et al.* Obesity and immune function relationships. Obes Rev, v.2, n.2, May, p.131-40. 2001.

Mccormick, C. M., C. Smith*, et al.* Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. Behav Brain Res, v.187, n.2, Mar 5, p.228-38. 2008.

Meijer, K., M. De Vries*, et al.* Human primary adipocytes exhibit immune cell function: adipocytes prime inflammation independent of macrophages. PLoS One, v.6, n.3, p.e17154. 2011.

Michalakis, K., G. Mintziori*, et al.* The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. Metabolism, v.62, n.4, Apr, p.457-78. 2013.

Michel, C., A. Dunn-Meynell*, et al.* Reduced brain CRH and GR mRNA expression precedes obesity in juvenile rats bred for diet-induced obesity. Behav Brain Res, v.154, n.2, Oct 5, p.511-7. 2004.

Mihu, D., R. Ciortea*, et al.* Abdominal adiposity through adipocyte secretion products, a risk factor for endometrial cancer. Gynecol Endocrinol, v.29, n.5, May, p.448-51. 2013.

Moran, T. H. e M. J. Dailey. Intestinal feedback signaling and satiety. Physiol Behav, v.105, n.1, Nov 30, p.77-81. 2011.

Moriarty-Kelsey, M., J. E. Harwood*, et al.* Testosterone, obesity and insulin resistance in young males: evidence for an association between gonadal dysfunction and insulin resistance during puberty. J Pediatr Endocrinol Metab, v.23, n.12, Dec, p.1281-7. 2010.

Morley, J. E. e H. M. Perry, 3rd. Androgen deficiency in aging men: role of testosterone replacement therapy. J Lab Clin Med, v.135, n.5, May, p.370-8. 2000.

Morton, G. J., K. J. Kaiyala*, et al.* Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.300, n.2, Feb, p.E392-401. 2011.

Neumeier, M., J. Weigert*, et al.* Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. Journal of Leukocyte Biology, v.79, n.4, Apr, p.803-8. 2006.

Nicklas, B. J., T. You*, et al.* Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. CMAJ, v.172, n.9, Apr 26, p.1199-209. 2005.

Ojeda, S. e M. K. Skinner. Puberty in the rat. In: J. D. Neill (Ed.). The physiology of reproduction. San Diego: Academic Press/Elsevier, 2006. Puberty in the rat, p.2061-2126.

Ouchi, N., S. Kihara*, et al.* Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. Current Opinion in Lipidology, v.14, n.6, Dec, p.561-6. 2003.

Palmer, N. O., H. W. Bakos*, et al.* Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. Spermatogenesis, v.2, n.4, Oct 1, p.253-263. 2012.

Park, H. K. e R. S. Ahima. Resistin in rodents and humans. Diabetes Metab J, v.37, n.6, Dec, p.404-14. 2013.

Patel, M., M. Srinivasan*, et al.* Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. J Inherit Metab Dis. , v.32, n.2, p.218-228. 2009.

Quinton, N. D., S. M. Laird*, et al.* Serum leptin levels during the menstrual cycle of healthy fertile women. Br J Biomed Sci, v.56, n.1, p.16-9. 1999.

Quinton, N. D., R. F. Smith*, et al.* Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. J Clin Endocrinol Metab, v.84, n.7, Jul, p.2336-41. 1999.

Reaven, G. M. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. Panminerva Med, v.47, n.4, Dec, p.201-10. 2005.

Reizes, O., J. Lincecum*, et al.* Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. Cell, v.106, n.1, Jul 13, p.105-16. 2001.

Reverchon, M., V. Maillard, *et al.* [Adiponectin and resistin: a role in the reproductive functions?]. Med Sci (Paris), v.29, n.4, Apr, p.417-24. 2013.

Rezende, F. A. C., L. E. F. P. L. Rosado, *et al.* Índice de Massa Corporal e Circunferência Abdominal: Associação com Fatores de Risco Cardiovascular. Arq Bras Cardiol, v.87, n.6, p.728-734. 2006.

Rodriguez-Hernandez, H., L. E. Simental-Mendia, *et al.* Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation. Int J Endocrinol, v.2013, p.678159. 2013.

Romero, C. e A. Zanesco. The role of leptin and ghrelin on the genesis of obesity. Revista de Nutrição, Campinas, v.19, n.1, p.85-91. 2006.

Ronti, T., G. Lupattelli, *et al.* The endocrine function of adipose tissue: an update. Clin Endocrinol (Oxf), v.64, n.4, Apr, p.355-65. 2006.

Rose, D. P., D. Komninou, *et al.* Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. Obes Rev, v.5, n.3, Aug, p.153-65. 2004.

Roseweir, A. K. e R. P. Millar. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. Human Reproduction Update, v.15, n.2, Mar-Apr, p.203-12. 2009.

Sainsbury, A., G. J. Cooney, *et al.* Hypothalamic regulation of energy homeostasis. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, v.16, n.4, Dec, p.623-37. 2002.

Santos, D. B. e R. Sichierib. Índice de massa corporal e indicadores antropométricos de adiposidade em idosos - Body mass index and measures of adiposity among elderly adults. Revista de Saúde Pública, v.39, n.2, p.163-168. 2005.

Schwartz, M. V. Staying slim with insulin in mind. Science, v.289, p.2066-2067. 2000.

Shalev, U., A. Tylor, *et al.* Long-term physiological and behavioral effects of exposure to a highly palatable diet during the perinatal and post-weaning periods. Physiol Behav, v.101, n.4, Nov 2, p.494-502. 2010.

Shetty, P. S. e W. P. T. James. Body mass index - a measure of chronic energy deficiency in adults. Food and Agriculture Organization of the United, - Nations. Rome 1994.

Shi, H., R. J. Seeley, *et al.* Sexual differences in the control of energy homeostasis. Front Neuroendocrinol, v.30, n.3, Aug, p.396-404. 2009.

Sisk, C. L. e J. L. Zehr. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. Front Neuroendocrinol, v.26, n.3-4, Oct-Dec, p.163-74. 2005.

Sorensen, K., L. Aksglaede*, et al.* Recent changes in pubertal timing in healthy Danish boys: associations with body mass index. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.95, n.1, Jan, p.263-70. 2010.

Stunkard, A. J. e T. A. Wadden, Eds. Obesity: theory and therapy. New York: Raven Press, v.1, 2end ed. 1993.

Suyeon, K. e N. Moustaid-Moussa. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of adipocyte. Journal of Nutrition, v.130: 3110S-315S, 2000, p.3115S-315S. 2000.

Terres, N. G., R. T. Pinheiro*, et al.* [Prevalence and factors associated to overweight and obesity in adolescents]. Revista de Saude Publica, v.40, n.4, Aug, p.627-33. 2006.

Testerman, G. M., I. Breitman*, et al.* Airway pressure release ventilation in morbidly obese surgical patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Am Surg, v.79, n.3, Mar, p.242-6. 2013.

Tinggaard, J., M. G. Mieritz*, et al.* The physiology and timing of male puberty. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, v.19, n.3, Jun, p.197-203. 2012.

Velloso, L. A., E. P. Araujo*, et al.* Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. Neuroimmunomodulation, v.15, n.3, p.189-93. 2008.

Verdich, C., S. Toubro*, et al.* The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety--effect of obesity and weight reduction. Int J Obes Relat Metab Disord, v.25, n.8, Aug, p.1206-14. 2001.

Vettor, R., G. De Pergola*, et al.* Gender differences in serum leptin in obese people: relationships with testosterone, body fat distribution and insulin sensitivity. Eur J Clin Invest, v.27, n.12, Dec, p.1016-24. 1997.

Wabitsch, M., W. F. Blum*, et al.* Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. J Clin Invest, v.100, n.4, Aug 15, p.808-13. 1997.

Who. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.: World Health Organ Tech Rep Ser. 916: 1-149 p. 2003.

Williams, G., C. Bing, *et al.* The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. Physiol Behav, v.74, n.4-5, Nov-Dec, p.683-701. 2001.

Withyachumnarnkul, B. e E. S. Edmonds. Plasma testosterone levels and sexual performance of young obese male Zucker rats. Physiol Behav, v.29, n.5, Nov, p.773-7. 1982.

Woods, S. C., E. C. Lotter, *et al.* Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. Nature, v.282, n.5738, Nov 29, p.503-5. 1979.

Woods, S. C., R. J. Seeley, *et al.* Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science, v.280, n.5368, May 29, p.1378-83. 1998.

ANEXOS

ANEXO 1 - ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO - ARTIGO 1
ANEXO 2 - ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO - ARTIGO 2
ANEXO 3 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO 1 – ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO – ARTIGO 1

ARTIGO 1

Pubertal hypercaloric diet disrupts male sexual behavior, reduces testosterone levels, and increases serum tumor necrosis factor-α levels in adult rats

Macrini, D.J.,[a] Ferri, R[a], Todon e Silva, A [a],Teodorov, E.,[b] Bonamin, L.V.,[a] Coelho, C.P.,[a, d] Dias Motta, P.,[a] Kirsten, T.B.,[c] Chaves-Kirsten, G.P.,[c] Fukushima, A.,[c] Queiroz-Hazarbassanov, N.,[c] Bernardi, M.M.[a, b]

[a] Graduate Program of Environmental and Experimental Pathology and Graduate Program of Dentistry, Paulista University, UNIP, Rua Dr. Bacelar, 1212, São Paulo, SP, CEP 04026-002, Brazil.

[b] Mathematics, Computing and Cognition Center, Federal University of ABC, Av. dos Estados, 5001, Santo André, SP, CEP 09210-971, Brazil.

[c] School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, CEP 05508-270, Brazil.

[d] Graduate Program of Animal Medicine and Wellcare, University of Santo Amaro, Rua Enéas de Siqueira Neto, 340, São Paulo, SP, CEP 04829-900, Brazil.

Running head: Pubertal obesity and sexual behavior

Conflict of Interest Statement: All authors declare that there are no conflicts of interest.

Source of funding: FAPESP, UNIP, CNPq and CAPES

Correspondence: Maria Martha Bernardi, Instituto de Ciências da Saúde, Rua Dr. Bacelar, 1212, 4º andar, Vila Clementino, São Paulo, SP, 04026-002, Brazil. Tel: +55-11-5586-4000; Fax: +55-11-2275-1541; e-mail: marthabernardi@gmail.com

Abstract

Objective: The present study focused on sexual behavior in rats fed a hypercaloric diet during the peripubertal stage (postnatal day [PND] 23-65).

Methods: Body weight gain during treatment and the day of balanopreputial separation were evaluated in rats fed a hypercaloric diet or laboratory chow. Sexual behavior, the morphology of adipose tissue, and serum testosterone and tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels were evaluated in these adult rats.

Results: Compared with the control group, rats subjected to a hypercaloric diet during the peripubertal stage exhibited (1) an increase in body weight at 65 and 90 days of age, (2) impairment of sexual behavior, (3) decreases in testis and seminal vesicle weights and testosterone levels, (4) an increased number of adipocytes, (5) an increase in serum TNF-α levels, and (6) no differences in the day of balanopreputial separation.

Conclusions: Obesity induced by a hypercaloric diet administered during puberty impaired male sexual behavior performance in adulthood. The increase in serum TNF-α levels supports the hypothesis that obesity is associated with a permanent inflammatory process and a decrease in testosterone levels. Testosterone is a critical hormone that elicits and maintains male sexual behavior, explaining the decrease in sexual behavior.

Keywords: sexual behavior, inflammation, puberty, hypercaloric diet, TNF-α

1. Introduction

Obesity and being overweight have substantially increased in recent decades and are now major global health problems [1,2]. The large obesity-related health burden negatively impacts many relevant health outcomes, including quality of life, disability, and mortality, and leads to increased healthcare utilization [3,4]. Obesity can lead to an increased risk for several diseases, including type 2 diabetes [5], respiratory disorders [6], cardiovascular disease [7], endocrine disorders [8], immune malfunction [9,10], certain types of cancers [11], psychiatric disorders [12], and decreased fertility [13].

Some studies have associated obesity and being overweight with reproductive parameters in men, showing that increased body weight is related to poor semen quality, decreased sperm concentration, decreased normal-motile sperm cells, and an increased DNA fragmentation index [14-17]. Obese adult rats did not exhibit alterations in sexual behavior, but sperm quality was affected, in which a reduction of sperm motility was found. The low sperm quality caused a slight reduction of fertility potential, showing that obesity may lead to impairment in male fertility [14,18].

In genetically obese Zucker rats, inadequate sexual behavior is one factor that contributes to reduced reproductive capacity [19]. Alterations in organ weights, semineferous epithelium architecture, sperm production, and transit time were observed in the pubertal obese rats. Adult animals exhibited a significant increase in the extent of damage found in sperm DNA [20]. Testosterone levels were also lower at 2-4 months of age in Zucker rats than in lean rats, but serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone were normal, suggesting that obese male Zucker rats have a defect in testicular testosterone production but a normal pituitary response to hypothalamic stimulation [21].

Puberty is a complex physical and psychological process that occurs between childhood and adulthood, resulting in the attainment of adult reproductive capacity. During

puberty, the gonadotropic axis and reproductive capacity develop and are associated with somatic and behavioral changes [22,23]. Obesity is thought to affect pubertal timing, but the association between obesity and male puberty has remained unclear [24]. Being overweight is associated with earlier puberty, whereas obesity is often associated with later puberty [25].

The present study investigated the effects of a hypercaloric diet in male rats fed during the peripubertal stage from postnatal day (PND) 23 to PND65. At 65 days of age until adulthood, the hypercaloric diet-treated rats received standard laboratory chow. To determine when the hypercaloric diet promoted obesity, body weight gain during puberty was assessed until early adulthood. Body weight gain and the area of adipose abdominal tissue were evaluated at adulthood to verify whether the hypercaloric diet administered during puberty led to obesity in adulthood, despite the fact that after PND65 they received only laboratory chow. To investigate the sexual consequences of the hypercaloric diet administered during puberty, the day of balanoprepucial separation, sexual behavior, and serum testosterone levels were evaluated in these adult rats. Serum tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels were measured to determine whether the pubertal hypercaloric diet was associated with a permanent inflammatory process observed in adulthood [26] and reduced testosterone levels.

2. Material and Methods

2.1. Animals

The offspring of male and female adult Wistar rats, provided by the Faculty of Medicine Veterinary, São Paulo University, were used. Upon arrival in the laboratory, the male and female rats were housed in microisolator cages at a controlled temperature (22-26°C) and humidity (50-65%) in artificially lit rooms on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) with free access to sterilized water and irradiated food that is specific to rats. One week after their arrival in the laboratory, the adult male and female rats were mated, and

their pups were used in the experiments at 23 days of age (four pups per cage). The animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources and Brazilian guidelines of the Institutional Ethics Committee, Universidade Paulista (protocol no. 134/12, CEP/ICS/UNIP,15/10/2012). The experiments were performed in accordance with good laboratory practice protocols and quality assurance methods. All efforts were made to minimize the suffering of the animals.

2.2. Hypercaloric diet

The rats were randomly assigned to either the lean or obese condition prior to experimentation, from PND23 to PND65, so that the average and range of body weights were similar across conditions. At PND65 until adulthood, both groups received standard laboratory chow. The rats in the hypercaloric group were given free access to the diet (Ensure, Abbot Brasil, São Paulo, SP, Brazil; total of 100 kcal/100 g and 0.99 kcal/ml, 28% fat [information provided by the manufacturer]) in addition to laboratory chow (Nuvilab, Sogorb Ind. & Com. Ltda, São Paulo, SP, Brazil, values per 100 g solid food item: 350.5 kcal, 55 g carbohydrate, 22.5 g protein, and 45 g total fat). Ensure is a highly palatable liquid diet supplement, and each 231 kcal bottle contains 1.7 g polyunsaturated fat, 3.59 g monounsaturated fat, and 2.2 g saturated fat. It did not contain any trans-fat. It was presented in a graduated cylinder with a stopper. To avoid spillage of the hypercaloric diet, the tip of the cooler had a safety valve that prevented the liquid from dripping. The rats in the lean group (i.e., control group) were given access only to laboratory chow. The food was placed in a compartment that contained a wire mesh below it to collect food loss. The consumption of both diets/cage was measured daily, and a fresh diet was changed daily. Hypercaloric consumption was measured directly in the graduated bottle. The laboratory chow was weighed. The time of treatment began on PND23 (prepubertal phase), and the end of

hypercaloric administration was determined based on body weight gain in the control and experimental rats. Thus, when the weight gain of the rats treated with the hypercaloric diet was greater than the control group, the hypercaloric diet was replaced by laboratory chow. In adulthood (i.e., 90-95 days of age), sexual behavior, testis and seminal vesicle absolute and relative (absolute weight / body weight) weights, intra-abdominal fat area, serum testosterone levels, and serum TNF-α levels were evaluated.

To evaluate the development of body weight, sexual behavior, and sexual organ weight, 7-8 rats/group were used. The adipocyte area, serum testosterone level, and serum TNF-α level were measured in 7-10 rats/group.

2.3. Body weight evaluation and day of balanopreputial separation

The rats were weighed weekly from PND23 to PND65, and the delta weight was defined as the difference between the final and initial weights. We also evaluated body weight gain in adulthood (90-95 days of age). The day of balanopreputial separation, which defines the start of sexual maturity in rats [27,28], was observed from PND29 to PND45.

2.4. Sexual behavior

Male rats (90-95 days of age, 380 ± 10 g) were placed together with females (90-95 days of age, 300 ± 20 g) in estrus, induced by 1.0 mg/kg estradiol valerate (s.c.) 24 h before the experiment. The behavioral observations were made during a reverse light/dark cycle (starting at 2:00 PM). The following parameters were observed for 15 min: latency to first mount, latency to first intromission, latency to first ejaculation, number of mounts until first ejaculation, and number of intromissions until first ejaculation. The percentage of rats that ejaculated in 15 min was also calculated.

2.5. Abdominal adipose tissue area evaluation

To evaluate abdominal adipose tissue, ImageJ software (http://imagej.softonic.com.br/) was used. The slides of subcutaneous abdominal tissue were prepared for each rat, and five random photomicrographs were taken for each rat tissue sample. The area of each fat cell was measured and is expressed in pixels, and the mean was calculated for each rat.

2.6. Serum testosterone and TNF-α levels

The animals were exposed to CO_2 gas and euthanized by rapid decapitation, and trunk blood was centrifuged and used to analyze serum testosterone and TNF-α levels. This analysis was performed using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays according to the manufacturer's instructions: testosterone kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; catalog no. 582701) and TNF-α (DuoSet kits, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; catalog no. DY510).

2.7. Statistical analyses

Homoscedasticity was verified using an *F* test or Bartlett's test. Normality was verified using the Kolmogorov-Smirnov test. A two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used to compare the weight gain data during puberty. Student's *t*-test (unpaired, two-tailed) was used to compare the parametric data between the two groups. Nonparametric data of the two groups were analyzed using the Mann-Whitney U test. The percentage data were analyzed using Fisher's test. The results are expressed as mean ± SEM. In all cases, the results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1.Body weight evaluation and balanopreputial separation

The two-way repeated-measures ANOVA revealed significant effects of time ($F_{6,98}$ = 1515.90, p < 0.0001) and hypercaloric diet ($F_{1,98}$ = 15.37, p = 0.0002; Fig. 1A) on weekly weight. A time of observation × diet interaction was found ($F_{1,98}$ = 4.24, p = 0.0006). The Bonferroni *post hoc* test indicated that body weight in the hypercaloric diet-treated group was greater than in the control group on PND65 (p < 0.001). A significant increase in the delta weight was observed in hypercaloric rats compared with controls (t = 5.78, df = 14, p < 0.0001, Student's t-test; Fig. 1B).

No differences were found between the day of balanopreputial separation in the control group (day 38.0 ± 1.0) and experimental group (day 38.0 ± 1.0).

3.2. Sexual behavior

The latencies to the first mount (t = 1.79, df = 12, p = 0.048; Fig. 2A) and first ejaculation (t = 2.32, df = 12, p = 0.02; Fig. 2C) increased in hypercaloric rats compared with controls. The percentage of rats that ejaculated during the 15 min observation period was significantly decreased in hypercaloric rats compared with rats fed laboratory chow (p = 0.03, Fisher's test). No significant differences were found between groups in the latency to the first intromission (t = 0.89, df = 12, p = 0.194) or number of mounts (t = 1.41, df = 12, p = 0.09).

3.3. Weight in adulthood

Male hypercaloric rats exhibited a significant increase in body weight in adulthood compared with the control group (t = 1.99, df = 14, p = 0.03; Fig. 3A).

3.4. Morphological evaluations

Hypercaloric rats did not exhibit significant differences in testis weight compared with controls (t = 1.25, df = 14, p = 0.23; Fig. 3B), but the relative testis weight decreased in the hypercaloric group compared with the control group (t = 2.24, df = 14, p = 0.04; Fig. 3C). Both the weight (t = 2.27, df = 14, p = 0.03; Fig. 3D) and relative weight (t = 2.61, df = 14, p = 0.02; Fig. 3E) of the seminal vesicles were significantly decreased in the hypercaloric group compared with the control group. Student's *t*-test showed that hypercaloric rats exhibited a significant increase in adipocyte area compared with controls (t = 4.45, df = 18, p = 0.0003, Fig. 4).

3.5. Serum testosterone and TNF-α levels

Student's *t*-test showed that hypercaloric rats exhibited a significant decrease in serum testosterone levels compared with controls (t = 2.30, df = 15, p = 0.04; Fig. 4). Student's *t*-test also showed that hypercaloric rats exhibited a significant increase in serum TNF-α levels compared with controls (t = 3.04, df = 18, p = 0.0007; Fig. 4).

4. Discussion

Rats that received the hypercaloric diet exhibited higher body weight gain than controls when adults. These adults became obese despite receiving normal laboratory chow from PND65. Body weight gain in the hypercaloric group was 15% greater than in the control group, indicating that the hypercaloric diet induced obesity [29,30], which was corroborated by the increase in the hypodermic fat cell area in the hypercaloric group. The critical periods for adipocyte differentiation in humans include the first year of life and puberty [31-34]. During these periods of development, the number of fat cells naturally increases. The loss of weight after this period only reduces the fat cell size and not the number of fat cells [35,36]. Therefore, our rats received the hypercaloric diet during the critical period of adipocyte

differentiation, resulting in an increase in the fat cytoplasm cell area and explaining the occurrence of obesity in these rats compared with controls in adulthood.

The present results indicate that the hypercaloric diet impaired sexual behavior. Sexual behavior in male nonhuman animals has two distinct phases: a highly variable sequence of behaviors that involves attracting and courting a female (appetitive phase) and a highly stereotyped copulatory sequence (consummatory phase) [37,38]. Mount latency is considered a measure of sexual motivation [39]. Ejaculation and erection are considered parameters related to the consummatory phase [37,38]. Moreover, all sexual responses, including erection, depend on motivation. Thus, rats treated with the hypercaloric diet may have presented decreases in sexual motivation (i.e., the appetitive phase) and the consummatory aspects of sexual behavior compared with controls.

Testosterone is often called the male sex hormone, regulating sex drive and many other processes [40]. The androgenic and anabolic effects of testosterone play a pivotal role in the maturation of sex organs, particularly the penis and scrotum, during fetal development [41]. During puberty, this hormone stimulates the growth of the genitals, stimulates the development of other male secondary sex characteristics [42], induces growth of the prostate and hair, and causes male balding [43,44]. Androgens can also modulate almost every aspect of sexual behavior and not only autonomic functions. Androgens can also impact emotional, motivational, and cognitive aspects. In male hamsters, exposure to testosterone during adolescence is required for the normal expression of adult sexual behavior [45]. Early and prepubertal castration of male rats prevents the expression of sexual behavior. Testosterone replacement has been shown to reverse, at least partially, sexual behavior [46-48]. Thus, we can attribute the reduction of sexual behavior in the rats that received the hypercaloric diet to the decrease in serum testosterone levels. Thus, the decrease in testosterone levels suggests that the prepubertal hypercaloric diet induced some hormonal disturbances in adulthood,

leading to the impairment of sexual behavior.

An increase in the adipocyte area in the experimental group compared with controls was observed. We also found an increase in serum TNF-α levels in rats treated with the hypercaloric diet during puberty. As reviewed by Wanders et al. [50], adipocytes produce several adipokines that act both positively and negatively in systemic inflammatory processes. In lean individuals, adipocytes maintain a noninflammatory cytokine profile. In obese individuals, adipocyte hypertrophy is associated with the dysregulation of adipokine secretion [51], producing more proinflammatory cytokines (e.g., TNF-α) and contributing to the chronic inflammation seen in obesity [52-55]. Adipose tissue inflammation is characterized by the increased expression of the inflammatory cytokines TNF-α and interleukin-6 (IL-6) and suppression of the antiinflammatory adipokine adiponectin [56,57]. Thus, administration of the hypercaloric diet from the prepubertal period until early adulthood induced chronic inflammation related to obesity in adulthood.

Proinflammatory cytokines, such as TNF-α and IL-1, play an inhibitory role in gonadal functions, particularly in the steroidogenesis of Leydig cells [58]. Administration of TNF-α to healthy men and rats decreases serum testosterone levels [59,60], whereas treatment with TNF-α or IL-1 inhibits steroidogenesis in cultured Leydig cells [61]. Proinflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1, and IL-6, inhibit testicular Leydig cell steroidogenesis at the level of gene expression of different steroidogenic enzymes [61]. All of these studies were performed in adult animals. The present study suggests that a pubertal hypercaloric diet decreases testosterone levels because of an increase in TNF-α levels.

In conclusion, rats subjected to a hypercaloric diet during the peripubertal stage presented several physical and sexual impairments in adulthood. These rats were obese, with important deficiencies in sexual behavior. They also exhibited reduced testis and seminal vesicle weights and an increase in the area of abdominal adipocytes. Moreover, they presented

a decrease in serum testosterone levels and an increase in serum TNF-α levels. The hypercaloric diet caused the rats to become obese at an early age (PND65) and adult age (PND90-95), which impaired sexual performance at the hormonal, immunological, and behavioral levels. Moreover, the increase in serum TNF-α levels corroborates the hypothesis that obesity is associated with a permanent inflammatory process and is associated with decreased testosterone levels. Our findings clearly revealed impairments associated with the hypercaloric diet during puberty, including sexual performance. Therefore, maintaining a balanced diet early in development may help maintain whole-body health, including healthy sexual performance.

5. Acknowledgements

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (thematic grant 09/51886-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES to Dr. Maria Martha Bernardi and is part of the doctoral thesis of Daclé Juliani Macrini. Special thanks are also extended to Paulista University for supplying the Ensure and other laboratory supplies.

6. References

[1] Kanter R, Caballero B. Global gender disparities in obesity: a review. Adv Nutr 2012;3(4):491-8.

[2] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization, 2000.

[3] Lehnert T, Sonntag D, Konnopka A, Riedel-Heller S, Konig HH. Economic costs of overweight and obesity. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2013;27(2):105-15.

[4] Lal A, Moodie M, Ashton T, Siahpush M, Swinburn B. Health care and lost productivity costs of overweight and obesity in New Zealand. Aust N Z J Public Health 2012;36(6):550-6.

[5] Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet 2005;365(9468):1415-28.

[6] Testerman GM, Breitman I, Hensley S. Airway pressure release ventilation in morbidly obese surgical patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Am Surg 2013;79(3):242-6.

[7] Asrih M, Mach F, Quercioli A, Dallegri F, Montecucco F. Update on the pathophysiological activities of the cardiac molecule cardiotrophin-1 in obesity. Mediators Inflamm 2013;2013:370715.

[8] Stevens A, De Leonibus C, Hanson D, Dowsey AW, Whatmore A, Meyer S, Donn RP, Chatelain P, Banerjee I, Cosgrove KE, Clayton PE, Dunne MJ. Network analysis: a new approach to study endocrine disorders. J Mol Endocrinol 2013;52(1):R79-93.

[9] Rodriguez-Hernandez H, Simental-Mendia LE, Rodriguez-Ramirez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. Int J Endocrinol 2013;2013:678159.

[10] Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. Semin Nephrol 2013;33(1):2-13.

[11] Mihu D, Ciortea R, Mihu CM. Abdominal adiposity through adipocyte secretion products, a risk factor for endometrial cancer. Gynecol Endocrinol 2013;29(5):448-51.

[12] Lopresti AL, Drummond PD. Obesity and psychiatric disorders: commonalities in dysregulated biological pathways and their implications for treatment. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2013;45:92-9.

[13] Landry D, Cloutier F, Martin LJ. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. Reprod Biol 2013;13(1):1-14.

[14] Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WD. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. Reproductive Biol Endocrinol 2011;9:32.

[15] Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. J Androl 2006;27(3):450-2.

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

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

[18] Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. Spermatogenesis 2012;2(4):253-63.

[19] Edmonds ES, Withyachumnarnkul B. Sexual behavior of the obese male Zucker rat. Physiol Behav 1980;24(6):1139-41.

[20] Vendramini V, Cedenho AP, Miraglia SM, Spaine DM. Reproductive function of the male obese Zucker rats: alteration in sperm production and sperm DNA damage. Reprod Sci 2013;21:221-9.

[21] Young RA, Frink R, Longcope C. Serum testosterone and gonadotropins in the genetically obese male Zucker rat. Endocrinology 1982;111(3):977-81.

[22] Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endocrine Rev 2003;24(5):668-93.

[23] Ojeda S, Skinner MK. Puberty in the rat. In: Neill JD, editor. The physiology of reproduction. San Diego: Academic Press, 2006. pp. 2061-126.

[24] Tinggaard J, Mieritz MG, Sorensen K, Mouritsen A, Hagen CP, Aksglaede L, Wohlfahrt-Veje C, Juul A. The physiology and timing of male puberty. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2012;19(3):197-203.

[25] Sorensen K, Aksglaede L, Petersen JH, Juul A. Recent changes in pubertal timing in healthy Danish boys: associations with body mass index. J Clin Endocrinol Metab 2010;95(1):263-70.

[26] Borst SE, Conover CF. High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-α. Life Sci 2005;77(17):2156-65.

[27] Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. Int J Prev Med 2013;4(6):624-30.

[28] Korenbrot CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol Reprod 1977;17(2):298-303.

[29] Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. J Nutr 2003;133(4):1081-7.

[30] Harrold JA, Williams G, Widdowson PS. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. J Neurochem 2000;74(3):1224-8.

[31] Hauner H, Loffler G. Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors: Part I. Adipose tissue development and the role of precursor cells. Klin Wochenschr 1987;65(17):803-11.

[32] Wabitsch M. Overweight and obesity in European children: definition and diagnostic procedures, risk factors and consequences for later health outcome. Eur J Pediatr 2000;159(Suppl 1):S8-13.

[33] Wabitsch M. Overweight and obesity in European children and adolescents: causes and consequences, treatment and prevention: an introduction. Eur J Pediatr 2000;159(Suppl 1):S5-7.

[34] Andersen RE. The spread of the childhood obesity epidemic. CMAJ 2000;163(11):1461-2.

[35] Yost TJ, Jensen DR, Eckel RH. Tissue-specific lipoprotein lipase: relationships to body composition and body fat distribution in normal weight humans. Obes Res 1993;1(1):1-4.

[36] Reynisdottir S, Langin D, Carlstrom K, Holm C, Rossner S, Arner P. Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. Clin Sci (London) 1995;89(4):421-9.

[37] Balthazart J, Ball GF. Topography in the preoptic region: differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. Front Neuroendocrinol 2007;28(4):161-78.

[38] Gorzalka BB, Morrish AC, Hill MN. Endocannabinoid modulation of male rat sexual behavior. Psychopharmacology (Berl) 2008;198(4):479-86.

[39] Agmo A. Male rat sexual behavior. Brain Res Brain Res Protoc 1997;1(2):203-9.

[40] Durdiakova J, Ostatnikova D, Celec P. Testosterone and its metabolites: modulators of brain functions. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2011;71(4):434-54.

[41] Toppari J, Skakkebaek NE. Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1998;12(1):143-56.

[42] Hiort O. Androgens and puberty. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2002;16(1):31-41.

[43] Shidaifat F. Age-dependent expression of 5α-reductase and androgen receptors mRNA by the canine prostate. Physiol Res 2009;58(1):155-8.

[44] Trueb RM. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. Exp Gerontol 2002;37(8-9):981-90.

[45] Sato SM, Schulz KM, Sisk CL, Wood RI. Adolescents and androgens, receptors and rewards. Horm Behav 2008;53(5):647-58.

[46] Larsson K. Testicular hormone and developmental changes in mating behavior of the male rat. J Comp Physiol Psychol 1967;63(2):223-30.

[47] Lisk RD, Suydam AJ. Sexual behavior patterns in the prepubertally castrate rat. Anatom Rec 1967;157(2):181-9.

[48] Griffiths M, Cooper KJ, Crighton DB. The effects of castration and androgen replacement therapy on the ability of the male to influence the oestrous cycle of the underfed rat. J Reprod Fertil 1972;30(3):481-3.

[49] Taneli F, Ersoy B, Ozhan B, Calkan M, Yilmaz O, Dinc G, Genc A, Taneli C. The effect of obesity on testicular function by insulin-like factor 3, inhibin B, and leptin concentrations in obese adolescents according to pubertal stages. Clin Biochem 2010;43(15):1236-40.

[50] Wanders D, Graff EC, White BD, Judd RL. Niacin increases adiponectin and decreases adipose tissue inflammation in high fat diet-fed mice. PLoS One 2013;8(8):e71285.

[51] Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Mol Cell Endocrinol 2010;314(1):1-16.

[52] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-α: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 1993;259(5091):87-91.

[53] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun 1999;257(1):79-83.

[54] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372(6505):425-32.

[55] Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF-α and obesity. Curr Direct Autoimmun 2010;11:145-56.

[56] Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARγ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes 2001;50(9):2094-9.

[57] Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003;285(3):E527-33.

[58] Hong CY, Park JH, Ahn RS, Im SY, Choi HS, Soh J, Mellon SH, Lee K. Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. Mol Cell Biol 2004;24(7):2593-604.

[59] Mealy K, Robinson B, Millette CF, Majzoub J, Wilmore DW. The testicular effects of tumor necrosis factor. Ann Surg 1990;211(4):470-5.

[60] van der Poll T, Romijn JA, Endert E, Sauerwein HP. Effects of tumor necrosis factor on the hypothalamic-pituitary-testicular axis in healthy men. Metabolism 1993;42(3):303-7.

[61] Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. J Reprod Immunol 2002;57(1-2):3-18.

Figure Legends

Fig. 1. (A) Weekly body weight in male hypercaloric diet-treated rats from PND23 to PND65. *p < 0.0001, significant difference from respective control group (repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni test). (B) Body weight gain in male rats fed a hypercaloric diet from PND23 to PND65. ***p < 0.0001 (Student's t-test). The data are expressed as mean ± SEM (n = 8 animals/group).

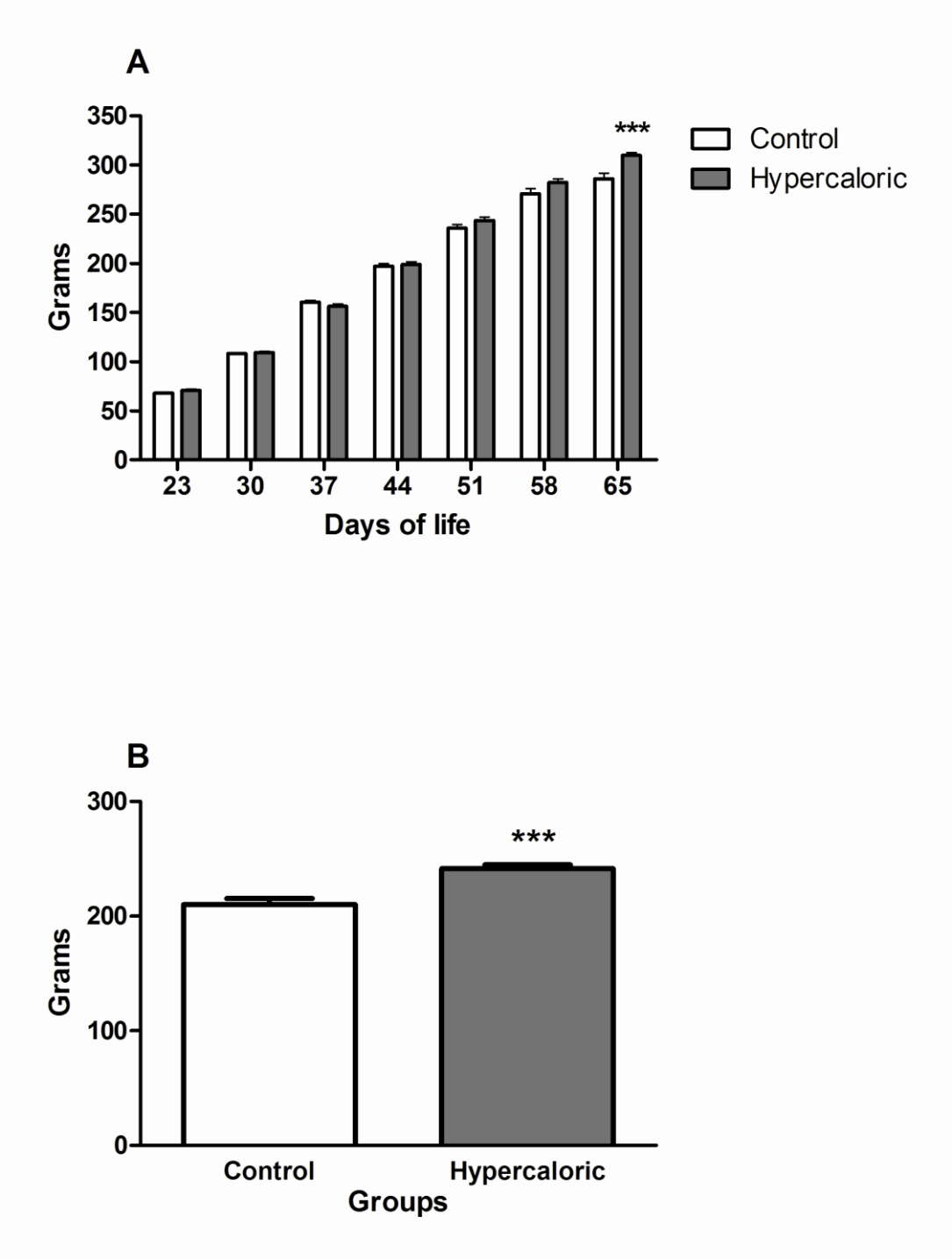


Fig. 2. Sexual behavior in rats fed a hypercaloric diet or laboratory chow from PND23 to PND65. (A) Latency to first mount. (B) Latency to first intromission. (C) Latency to ejaculation. (D) Number of mounts. (E) Percentage of rats that ejaculated in 15 min. The data are expressed as mean ± SEM (n = 7 animals/group). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ (Student's t-test). The percentage data were analyzed using Fisher's test. **$p < 0.01$.

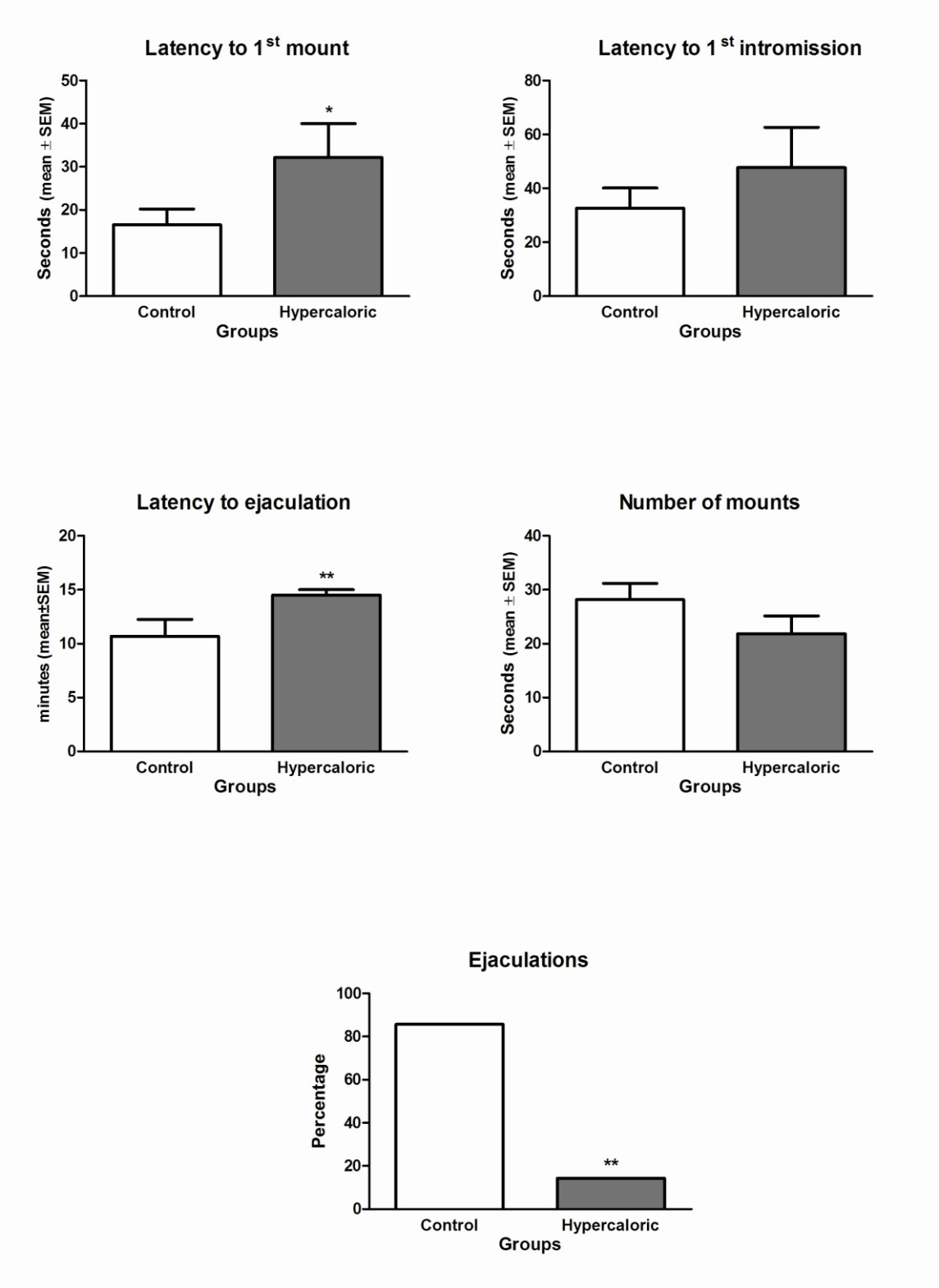


Fig. 3. (A) Body weight in adulthood in male hypercaloric diet-treated rats. ***p = 0.001, significant difference from respective control group (Student's t-test). (B) Absolute testis weight in male rats fed a hypercaloric diet from PND23 to PND65. p = 0.23 (Student's t-test). (C) Relative testis weight in male rats fed a hypercaloric diet from PND23 to PND65. *p = 0.04 (Student's t-test). (D) Absolute seminal vesicle weight in male rats fed a hypercaloric diet from PND23 to PND65. **p = 0.03 (Student's t-test). (E) Relative seminal vesicle weight in male rats fed a hypercaloric diet from PND23 to PND65. **p = 0.02 (Student's t-test). The data are expressed as mean ± SEM (n = 8 animals/group).

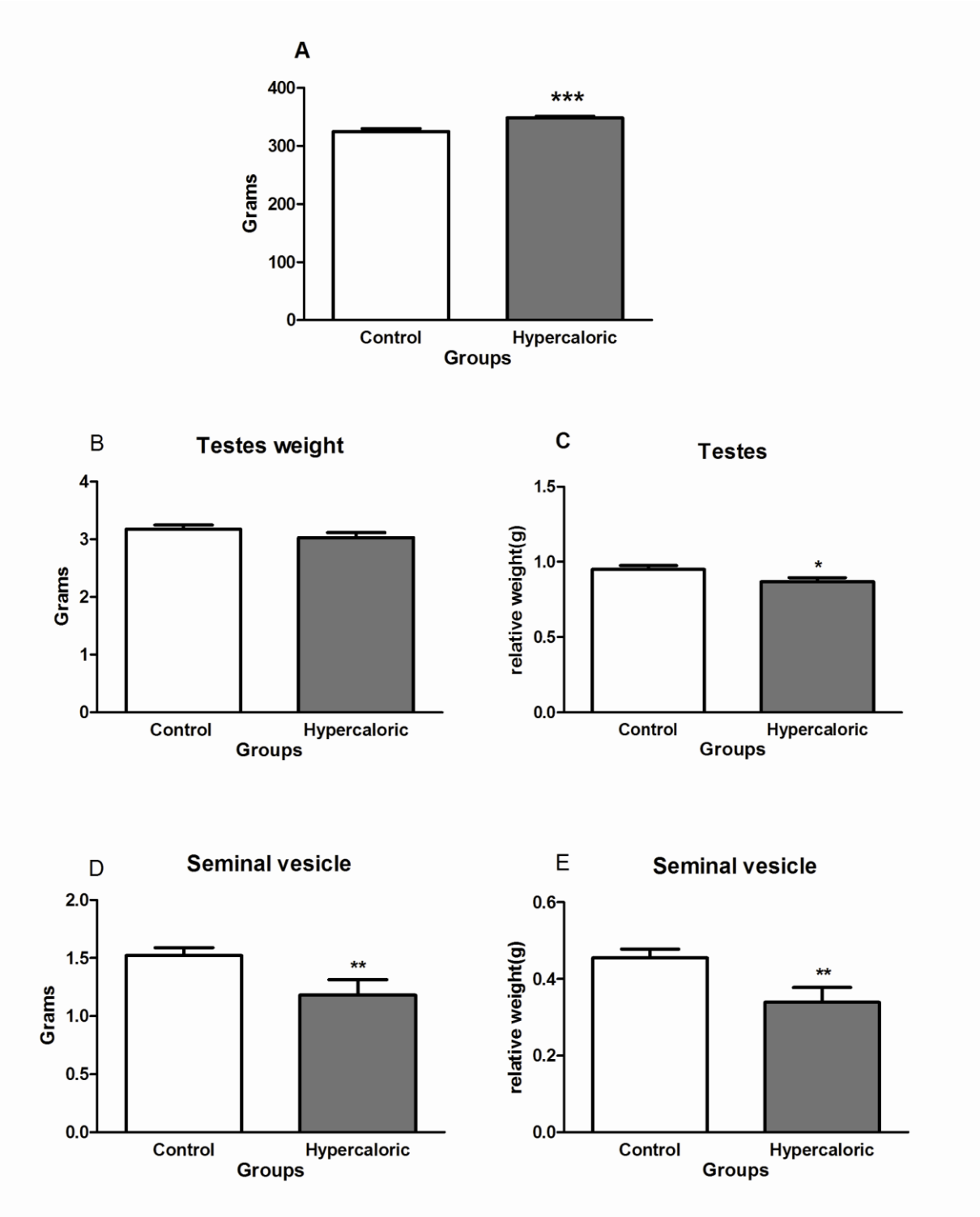
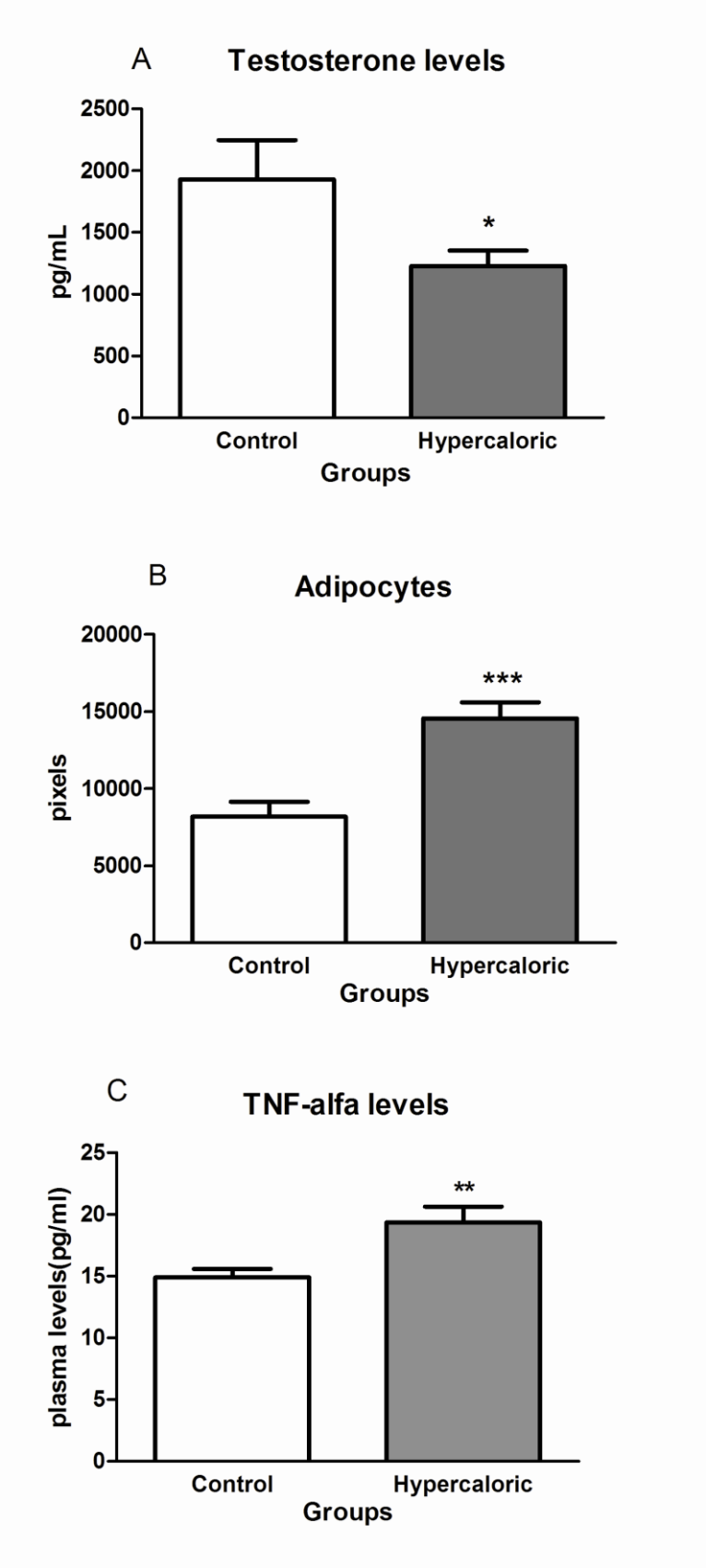


Fig. 4. (A) Serum testosterone levels (n = 7-10), (B) adipocyte areas (n = 10/group), and (C) serum TNF-α levels (n = 10/group) in male rats fed a hypercaloric diet from PND23 to PND65. The data are expressed as mean ± SEM. *$p < 0.05$, ***$p < 0.01$, compared with controls (Student's t-test).



ANEXO 2 – ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO – ARTIGO 2

ARTIGO 2

Maternal food deprivation during pregnancy reversed the sexual disruption induced by hypercaloric diet administered to male pup rats during puberty.

Macrini, D.J.,[a] Teodorov, E.,[b] Bonamin, L.V.,[a] Coelho, C.P.,[a, d] Dias Motta, P.,[a] Kirsten, T.B.,[c] Chaves-Kirsten, G.P.,[c] Fukushima, A.,[c] Queiroz-Hazarbassanov, N.,[c] Bernardi, M.M.[a,b]

[a] Graduate Program of Environmental and Experimental Pathology and Graduate Program of Dentistry, Paulista University, UNIP, Rua Dr. Bacelar, 1212, São Paulo, SP, CEP 04026-002, Brazil.

[b] Mathematics, Computing and Cognition Center, Federal University of ABC, Av. dos Estados, 5001, Santo André, SP, CEP 09210-971, Brazil.

[c] School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, CEP 05508-270, Brazil

[d] Graduate Program of Animal Medicine and Wellcare, University of Santo Amaro, Rua Enéas de Siqueira Neto, 340, São Paulo, SP, CEP 04829-900, Brazil.

Running head: maternal food restriction and hypercaloric diet.

Conflict of Interest Statement: All authors declare that there are no conflicts of interest.

Source of funding: FAPESP, UNIP and CAPES

Correspondence: Maria Martha Bernardi, Instituto de Ciências da Saúde, Rua Dr. Bacelar, 1212, 4º andar, Vila Clementino, São Paulo, SP, 04026-002, Brazil. Tel: +55-11-5586-4000; Fax: +55-11-2275-1541; e-mail: marthabernardi@gmail.com

Abstract

In the present study we investigated the reproductive, hormonal and immune aspects of pups from dams prenatally food restricted and fed during puberty with hypercaloric diet. It was examined the male pups body weight development, sexual behavior, testes lesions, testosterone and TNF-α serum levels. Female pregnant rats were 60% food deprived (FR) or not from gestation day (GD) 2 to GD18. At weaning, the pup rats of dams FR were randomly divided into two groups: one group received a hypercaloric diet (FRH group) from PND23 to PND65 and the second group (FRC group)) received the laboratory chow from PND 23 until adult age. Pups of non food restricted dams (NRC group) received during all experiment the laboratory chow. The results showed that: 1) a reduced in the number of pups born and in the litter weight; 2) an increased body weight of FRH pups relative to FRC and NRC groups; 3) no differences between sexual behavior of FRH and NRC groups; 4) an increased latency to the first intromission in FRC group relative to FRH and NRC groups; 5) an increased of adipocytes cells area in FRH group relative to NRC and FRC groups; 6) no differences between the testosterone and serum TNF-α levels in FRH group relative to NRC group; 7) an increased TNF-α levels in FRC group relative to NRC group. We concluded that despite the FRH group presented an increased body weight gain and in the area of adipocytes , maternal FR reversed the effects hypercaloric diet during puberty on sexual, hormonal and immune aspects. How these adaptive changes were induced by maternal food restriction, hypercaloric diet and inflammatory process remained to be investigated.

Key words: adipocytes, testosterone, TNF-α, obesity, food restriction.

Introduction

The mammals development is a complex process which occurs through sequential events in each step is dependent upon meticulous orchestration of cell differentiation, migration, proliferation and apoptosis (Komiya and Habas, 2008; Koopman, 2010). Interactions between intrinsic fetal factors (e.g. genetics) and extrinsic environmental factors (e.g. maternal pre-pregnancy weight and nutrition, placental insufficiency) influence these developmental signaling pathways and may culminate in abnormal organ development (Hyatt et al., 2008; Parlee and Macdougald, 2013).

Increasing evidence suggests that adverse environmental factors leading to intrauterine grow retardation,under or overnutrition may predispose individuals to pathologies later in life by altering their fetal programming (Parlee and Macdougald, 2013; Williams et al., 2013). The thrifty phenotype hypothesis of Hales and Barker proposes that poor nutrition in early life results in poor fetal growth and increased susceptibility to type 2 diabetes and the metabolic syndrome (Hales and Barker, 1992; 2001). Adult individuals whose mothers were undernourished early in pregnancy displayed higher rates of intra-abdominal adiposity associated with increased risk of metabolic pathologies (Muhlhausler and Ong, 2011; Yang and Huffman, 2013). In addition, prenatal maternal undernutrition associated with pups early hypercaloric nutrition may significantly heighten energy balance dysfunctions in adulthood (Williams et al., 2013).

It has been shown that not only are dietary exposures during pregnancy important in mediating this disease susceptibility but also the timing of this exposure during development [20,21]. Thus, since the fetus or neonate is undergoing rapid cell division, tissues may be affected differently by the same exposure depending on the timing of the insult. In this respect, prenatal undernutrition associated with post-weaning hypercaloric diet leads to a

phenotypic increase in the adipocytes area as well as adipocyte hypertrophy (Desai et al., 2007; Khorram et al., 2007; Parlee and Macdougald, 2013; Sutton et al., 2010). In contrast, growth-restricted newborn rats subjected to continued nutrient-restriction throughout suckling have slowed compensatory growth and normalized or reduced adipose tissue weights (Jimenez-Chillaron et al., 2006; Parlee and Macdougald, 2013; Williams et al., 2013). Pups of mothers early or mid gestational food restricted presented persistent pubertal obesity induced by reduction in physical activity when all animals were maintained within individual pens. These adaptations may persist until adult age and may be transmitted to next generations (Holemans et al., 2003a; Sebert et al., 2009).

Previously we observed that pubertal hypercaloric diet increased adiposity, disrupts male sexual behavior, reduced testosterone levels and increases serum TNF-α levels of rats in adult age. In the present study we investigated the effects of maternal food restriction in pups' reproductive aspects fed with hypercaloric diet. Some questions were done. First, prenatal maternal food restriction induces obesity in pups feed during puberty with hypercaloric diet? Second, this procedure interfered with pups sexual behavior in adult age? Third, there are some relationships between the reproductive function of these rats with hormonal and immune interferences?

Thus, dams were food restricted from GD1 until GD18. The period of food restriction was discontinued in GD 18 because previously we observed that maternal restriction at the end of pregnancy could lead to perinatal deaths and/or maternal cannibalism. From GD 18 and during lactation the dams received *ad libitum* the lab chow. After weaning the offspring received the hypercaloric diet or the lab chow from 23 until 65 days of age. This period comprises the pre pubertal, puberty and young adult phases. During development the body weight gain and the day of balanopreputial separation were observed. In adult age (90-95 days old), sexual behavior, sexual organs weight, abdominal fat area, serum testosterone and

TNF-α levels were evaluated.

2.Material and Methods

2.1.Animals

Female rats from the Faculty of Medicine Veterinary, São Paulo University were used. These female were individually housed in microisolator cages at a controlled temperature (22-26°C) and humidity (50-65%) in artificially lit rooms on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) with free access to sterilized water and irradiated food. Sterilized and residue-free wood shavings were used for the animal bedding. To evaluate sexual behavior, the light cycle was reversed (i.e., lights on at 11:00 PM The animal procedures were in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources and Brazilian guidelines of Institutional Ethics Committee, Universidade Paulista (protocol no. 134/12, CEP/ICS/UNIP, 15/10/2012). The experiments were performed in accordance with good laboratory practice protocols and quality assurance methods. All efforts were made to minimize the suffering of the animals.

2.2.Maternal food restriction(FR) and reproductive performance

The pregnant females were divided into two groups. In the control group (n=6), the animals received feed *ad libitum*. In the second group(n=12) the pregnant female rats animals were subjected to FR 60% of the total amount ingested by the controls. The FR occurred from GD2 to GD18 and the food intake was measured (± 0.1 g) between GD2 to GD18. On postnatal day the female reproductive performance was performed (the postpartum maternal weight, total number of pups born, total number of female and male born, the litter weight and the presence of

pups death). After this procedure the litter was culled to eight pups (four male and four female) for each dam.

2.3. Hypercaloric diet

At weaning, the pups rats of dams restricted of food control group were randomly divided into two groups: one group received a hypercaloric diet (FRH group) from PND23 to PND65 when the diet was changed for the laboratory chow. The second group (FRC group)) received the laboratory chow from PND 23 until adult age. Pups of non food restricted dams (NRC group) received during all experiment the laboratory chow. The rats in the hypercaloric group were given free access to the diet (Ensure, Abbot Brasil, São Paulo, SP, Brazil; a total of 100 kcal/100 g and 0.99 kcal/ml, 28% fat [information provided by the manufacturer]) in addition to laboratory chow (Nuvilab, Sogorb Ind. & Com. Ltda, São Paulo, SP, Brazil, values per 100 g solid food item: 350,5 kcal, carbohydrate-55g, protein-22.5g and total fat-45g) . Ensure is a highly palatable liquid diet supplement, and each 231 kcal bottle contained 1.7 g of polyunsaturated fat, 3.59 g of monounsaturated fat, and 2.2 g of saturated fat . It did not contain any trans-fat. It was presented in a graduated cylinder with a stopper. The consumption of both diets was measured daily, and a fresh diet was changed daily.

In adult age (90-95 days old), the sexual behavior, sexual organs weight, abdominal fat area, testis morphology, serum testosterone and TNF-α levels were evaluated.

To evaluate body weight development, sexual behavior, and sexual organ weight 7-8 rats/group were used. The adipocyte area, testes morphology, serum testosterone and TNF-α levels were observed in 7-10 rats/group. One or two male pups of each litter were used in the experiments. The female pups were used in other experiment.

2.4. Body weight evaluation and day of balanopreputial separation.

The male rats were weighed weekly from PND23 to PND65, and the delta weight was defined as the difference between the final and initial weights. Moreover, the body weight of male pups were taken in adulthood. The day of balanopreputial separation, which defines the start of sexual maturity in rats (Korenbrot et al., 1977; Sengupta, 2013), was observed from PND29 to PND45.

2.5. Sexual behavior

Male rats were placed together with females in estrus, induced by the administration of 1.0 mg/kg estradiol valerate, subcutaneously, 24 h before the experiment. The behavioral observations were made during a reversed light/dark cycle (starting at 2:00 PM). The following parameters were observed for 15 min: latency to first mount, latency to first intromission, first ejaculation, number of mounts until first ejaculation, and number of intromissions until first ejaculation. The percentage of rats that ejaculated in 15 min was also calculated.

2.6.Morphological evaluations

The testes and seminal vesicle were removed and weighed. To evaluate abdominal adipose tissue, *Image J software* (http://imagej.softonic.com.br/) was used. The slides of abdominal subcutaneous tissue were prepared for each rat, and five random photomicrographs were taken for each rat tissue. The area of each fat cell was measured and is expressed in pixels, and the mean was calculated for each rat.

2.7.Serum testosterone and TNF-α levels

The animals were euthanized by rapid decapitation, and trunk blood was collected to

analyze serum testosterone and TNF-α levels. This analysis was performed using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays according to the manufacturer's instructions: testosterone kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; catalog no. 582701) and TNF-α (DuoSet kits, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; catalog no. DY510).

2.8. Statistical Analyses

Homoscedasticity was verified using an F-test or Bartlett's test. Normality was verified by a Kolmogorov-Smirnov test. The two way repeated-measures analysis of variance (RANOVA) was used to compare data of weight gain and the day of *day of* balanopreputial separation during puberty. The one way ANOVA was used to analyze data of male pups' body weight in adult age, sexual behavior, organs weight and adipocytes area. The TNF-α and testosterone levels were compared by the Kruskall-Wallis test. Data in percentage were analyzed by the Fisher´s exact test. The results are expressed as mean ± SEM or in percentage. In all cases, the results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Maternal food restriction and reproductive performance

The number of male/litter ($t=7.858$ $df=16$, $p< 0.0001$) and of female/litter ($t=6.899$ $df=16$, $p< 0.0001$) were decreased in dams restricted of food as well as the litters weight ($t=10.27$ $df=16$, $p< 0.0001$) relative to control group. No differences were observed in the remained parameters (Table 1).

3.2.Pups body weight evaluation and balanopreputial separation

A two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) revealed significant effects of time ($F_{6/147}$ = 627.17, p < 0.0001) and diet ($F_{2/147}$ = 27.20, p = 0.0001; Fig. 1A) on weekly weight. An interaction between time of observation and diet was found ($F_{12/147}$ = 2.91, p = 0.0001). The Bonferroni *post hoc* test indicated that delta body weight in the FRH group was greater than in the FRC and NRC groups on PND65 (p< 0.001). Moreover, a significant increase in the delta weight was observed in FRH group compared with NRC group on PND 58 (p < 0.0001). In adult age (PND90) no differences were observed between the male delta weight of all groups (F 2/23 = 1.08, p = 0.36, fig.1B).

No differences were found between the day of balanopreputial separation in the NRC group (38.0 ± 1.0), FRC group (38.0 ± 1.0) and FRH group (37.9 ± 1.0).

3.3.Sexual behavior

The one way ANOVA show significant differences between the latencies to the first intromissions ($F_{2/22}$ = 4.40, p = 0.02, fig.2 B). The Tuckey's test indicates that this parameter was increased in FRC group relative to NRC group, but not in relation to FRH group. The remained parameters did not differ between all groups (latency to first mount- $F_{2/22}$ = 0.16, p = 0.86, fig.2 A; latency to first ejaculation – $F_{2/22}$ = 2.58, p = 0.10, fig.2 C; number of mounts- $F_{2/22}$ = 0.73, p = 0.91, fig.2 D).

3.4. Organs weight and Morphological evaluations

No significant differences were observed between all groups on absolute testis weight ($F_{2/23}$ = 0.72, p = 0.50), relative testis weight ($F_{2/23}$ = 3.12, p = 0.06), absolute seminal vesicle weight ($F_{2/23}$ = 0.76, p = 0.20) and the relative seminal vesicle weight ($F_{2/23}$ = 0.84, p = 0.45) of all groups (supplementary data).

3.5. Adipocytes cells, serum testosterone and TNF-α levels

The area of adipocytes were significantly different between groups ($F_{2/26} = 4.71$, $p = 0.019$, fig.3A). The Tuckey' multiple comparison test show that the area of adipocytes of FRH group were increased in relation to NRC group ($p < 0.05$), but not in relation to FRC group ($p > 0.05$). The testosterone levels of all groups did not differ (KW = 0.53, fig.3B). The TNF-α levels of all groups differ (KW= 8.54, fig.3C). The Dunn's multiple comparison test indicates that the TNF-α levels of FRC group increased in relation to NRC group. No differences were observed between these levels of NRC and FRH groups.

Discussion

Food restriction from GD1 to Gd18 reduced the litter weight as wells as the male and female pups born in relation to control group. In many species, including humans and laboratory rats, food restriction is accompanied by suboptimal reproductive success (Frisch, 1994; Galler and Zartarian, 1981; Kliewer and Rasmussen, 1987; van Marthens, 1977).From studies in experimental species, it is known that severe undernutrition decreases the rate of conception and increases the likelihood of premature delivery and the birth of a small offspring (Alexander et al., 1988; Galler and Zartarian, 1981; Henriksen, 1999; McGuire et al., 1995; Rogers and Velten, 2011; Zane, 1976). Maternal reduced food intake leads to resorptions, fetal mortality rate, fetal weight and the number of fetuses with intrauterine weight retardation was decreased (Henriksen, 1999; Rogers and Velten, 2011; van Marthens, 1977; Zane, 1976). There is also evidence from clinical studies that suboptimal growth in the first trimester is associated with an increased risk of low birth weight and premature delivery suggesting a relationship between early development and gestation length(Smith et al., 1998). Thus, it's possible that the reduced number of male and female pups/litter was consequence of the dam's restricted food during pregnancy. Also the reduced litter weight could be a consequence of the maternal undernutrition.

Maternal undernutrition decrease milk production, and hence, the growth of suckling rats(Kliewer and Rasmussen, 1987; McGuire et al., 1995; Roberts and Coward, 1985). However, FRC pups did not presented during prepubertal until PND65 differences in relation to control group on body weight development. Also in adult age no differences in body weight gain was observed in FRC group relative to the control group. In our experiment, the dams were food restrict until the GD18 and from this day and during lactation, the dams

received food *ad libitum*. Thus, we thought that this allowed that adequate amounts of milk were given to puppies and reversed the effects of maternal food deprivation.

Maternal food restriction associated to prepubertal hypercaloric diet increased at 58 and 65 days of treatment the FRH pups body weight in relation to control and FRC groups, but in adult age these differences were no longer observed. The present results are not in according to previous data showing that prenatal maternal food deprivation associated with pups early hypercaloric nutrition may significantly heighten energy balance dysfunctions in adulthood (Parlee and Macdougald, 2013; Rifas-Shiman et al., 2011; Williams et al., 2013). Considering that nutritional deficiency has opposing effects on adult obesity, depending on its timing within gestation (Le Lay et al., 2001), discrepancies in the present data with the literature may be associated with differences in onset, duration and type of nutrient deprivation, rather than the deficiency itself (Parlee and Macdougald, 2013).

The area of abdominal fat adipocytes in adult age was taken as an index of overweight or obesity, since only body weight did not reveal differences between groups. No differences were observed between NRC and FRC groups but a significant increase in the area of abdominal fat adipocytes of FRH group in relation to NRC group was detected. Thus, only maternal food restriction associated to hypercaloric diet, in our experimental design, was able to increase both body weight at puberty and the area of abdominal fat adipocytes.

Maternal effect is the effect of parental phenotype on offspring phenotype that does not have a Mendelian genetic basis (Boonstra et al., 1998). Changes in maternal environment induce adaptations in fetal metabolism. These adaptations may be beneficial or may have detrimental to the offspring(Boonstra et al., 1998; Holemans et al., 2003a; b; Mousseau and Fox, 1998; Xie et al., 2012). Maternal food restriction may programming reproductive aspects of their progenies reducing its reproductive success (McGuire et al., 1995; Speakman and

Mitchell, 2011), but increase its life span (Kirkwood and Shanley, 2005; Masoro, 2009) which permit its survival.

In male rodents, maternal food restriction can affected strongly several reproductive aspects because it may decrease their ability to compete with other males and their attractiveness to females(Martin et al., 2008). Re-feeding can restore body weight and physiological conditions of food-restricted animals (Xie et al., 2012) as well as the suppression of copulatory behaviors(Temple and Rissman, 2000), However, it is not clear whether re-feeding could evoke overcompensation in reproductive success in animals after food restriction.

In relation to NRC group, maternal food restriction increased the latencies to the first intromission of sexual behavior and increased the TNF-α levels in FRC group. No differences were observed between FRC and NRC groups on testosterone levels and in the adipocytes area.

Sexual behavior in male nonhuman animals has two distinct phases: a highly variable sequence of behaviors that involves attracting and courting a female (appetitive phase) and a highly stereotyped copulatory sequence (consummatory phase; (Balthazart and Ball, 2007; Gorzalka et al., 2008). Mount and intromission latencies are considered a measure of sexual motivation (Agmo, 1997). Ejaculation and erection are considered parameters related to the consummatory phase (Balthazart and Ball, 2007; Gorzalka et al., 2008). Moreover, all sexual responses, including erection, depend on motivation. Thus, rats of dams' restricted food may have presented decreases in sexual motivation (i.e., the appetitive phase). Maternal restriction followed by pubertal hypercaloric diet reversed the reduced sexual motivation and the increased TNF-α levels. No differences were observed in the testosterone levels relative to

NRC and FRC. Since testosterone levels is critical to elicit sexual behavior, this explain the reversion of hypercaloric diet in this behavior.

Increased in the adipocyte area in FRH group compared with NRC and FRC groups were observed. Furthermore, we only found an increase in serum TNF-α levels in rats FRC group but not in FRH group. As reviewed by Wanders et al. (2013), adipocytes produce several adipokines that act both positively and negatively in systemic inflammatory processes. In lean individuals, adipocytes maintain a noninflammatory cytokine profile. In obese individuals, adipocyte hypertrophy is associated with the dysregulation of adipokine secretion (Maury and Brichard, 2010), producing more proinflammatory cytokines (e.g., TNF-α) and contributing to the chronic inflammation seen in obesity (Arita et al., 1999; Hotamisligil et al., 1993; Tzanavari et al., 2010; Zhang et al., 1994). Adipose tissue inflammation is characterized by the increased expression of the inflammatory cytokines TNF-α and interleukin-6 and suppression of the antinflammatory adipokine adiponectin (Bruun et al., 2003; Maeda et al., 2001). Thus, despite FRH group showed increased body weight at the end of puberty and in the area of adipocytes in adult age, the maternal food restriction induced-chronic inflammation did not occur revealing that hypercaloric diet during puberty reversed the inflammatory effect.

In conclusion, prenatal maternal food restriction induces overweight in pups feed during puberty with hypercaloric diet but not in pups from dams restricted food whose pups receive the lab chow during puberty. Only maternal restriction reduced sexual motivation of male rats feed with lab chow; this effect was reversed by hypercaloric diet during puberty. No relationships were observed between hormonal levels and sexual motivation in both FRC and FRH groups. Adipocytes area was increased in both, FRC and FRH groups but only FRC group showed increased TNF-α levels, suggesting that hypercaloric diet during puberty reversed the inflammatory effect observed in FRC group. How these adaptive changes were

induced by maternal food restriction, hypercaloric diet and inflammatory process remained to be investigated.

References

Agmo, A., 1997. Male rat sexual behavior. Brain Res Brain Res Protoc 1, 203-209.
Alexander, M.H., Lazan, K.S., Rasmussen, K.M., 1988. Effect of chronic protein-energy malnutrition on fecundability, fecundity and fertility in rats. J. Nutr. 118, 883-887.
Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 257, 79-83.
Balthazart, J., Ball, G.F., 2007. Topography in the preoptic region: differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. Front. Neuroendocrinol. 28, 161-178.
Boonstra, R., Krebs, C., NC., S., 1998. Population Cycles in Small Mammals: The Problem of Explaining the Low Phase. Ecology 79, 1479-1488.
Bruun, J.M., Lihn, A.S., Verdich, C., Pedersen, S.B., Toubro, S., Astrup, A., Richelsen, B., 2003. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E527-533.
Desai, M., Gayle, D., Han, G., Ross, M.G., 2007. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. Reprod Sci 14, 329-337.
Frisch, R.E., 1994. The right weight: body fat, menarche and fertility. Proc. Nutr. Soc. 53, 113-129.
Galler, J.R., Zartarian, G., 1981. Reproductive performance in rats with different histories of malnutrition. Br. J. Nutr. 45, 251-255.
Gorzalka, B.B., Morrish, A.C., Hill, M.N., 2008. Endocannabinoid modulation of male rat sexual behavior. Psychopharmacology (Berl) 198, 479-486.
Hales, C.N., Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 35, 595-601.
Hales, C.N., Barker, D.J., 2001. The thrifty phenotype hypothesis. Br. Med. Bull. 60, 5-20.
Henriksen, T., 1999. Foetal nutrition, foetal growth restriction and health later in life. Acta Paediatr Suppl 88, 4-8.
Holemans, K., Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003a. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. J Soc Gynecol Investig 10, 392-399.
Holemans, K., Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003b. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. J Physiol 547, 11-20.
Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259, 87-91.
Hyatt, M.A., Budge, H., Symonds, M.E., 2008. Early developmental influences on hepatic organogenesis. Organogenesis 4, 170-175.
Jimenez-Chillaron, J.C., Hernandez-Valencia, M., Lightner, A., Faucette, R.R., Reamer, C., Przybyla, R., Ruest, S., Barry, K., Otis, J.P., Patti, M.E., 2006. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. Diabetologia 49, 1974-1984.

Khorram, O., Momeni, M., Desai, M., Ross, M.G., 2007. Nutrient restriction in utero induces remodeling of the vascular extracellular matrix in rat offspring. Reprod Sci 14, 73-80.
Kirkwood, T.B., Shanley, D.P., 2005. Food restriction, evolution and ageing. Mech. Ageing Dev. 126, 1011-1016.
Kliewer, R.L., Rasmussen, K.M., 1987. Malnutrition during the reproductive cycle: effects on galactopoietic hormones and lactational performance in the rat. Am. J. Clin. Nutr. 46, 926-935.
Komiya, Y., Habas, R., 2008. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis 4, 68-75.
Koopman, P., 2010. Organogenesis in development. Preface. Curr. Top. Dev. Biol. 90, xiii-xiv.
Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.I., 1977. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod. 17, 298-303.
Le Lay, S., Krief, S., Farnier, C., Lefrere, I., Le Liepvre, X., Bazin, R., Ferre, P., Dugail, I., 2001. Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. J. Biol. Chem. 276, 16904-16910.
Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., Kuriyama, H., Hotta, K., Nakamura, T., Shimomura, I., Matsuzawa, Y., 2001. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes 50, 2094-2099.
Martin, B., Golden, E., Carlson, O.D., Egan, J.M., Mattson, M.P., Maudsley, S., 2008. Caloric restriction: impact upon pituitary function and reproduction. Ageing Res. Rev. 7, 209-224.
Masoro, E.J., 2009. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. Biochim. Biophys. Acta 1790, 1040-1048.
Maury, E., Brichard, S.M., 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Mol. Cell. Endocrinol. 314, 1-16.
McGuire, M.K., Littleton, A.W., Schulze, K.J., Rasmussen, K.M., 1995. Pre- and postweaning food restrictions interact to determine reproductive success and milk volume in rats. J. Nutr. 125, 2400-2406.
Mousseau, T.A., Fox, C.W., 1998. The adaptive significance of maternal effects. Trends Ecol. Evol. 13, 403-407.
Muhlhausler, B.S., Ong, Z.Y., 2011. The fetal origins of obesity: early origins of altered food intake. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 11, 189-197.
Parlee, S.D., Macdougald, O.A., 2013. Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. Biochim. Biophys. Acta.
Rifas-Shiman, S.L., Sherry, B., Scanlon, K., Birch, L.L., Gillman, M.W., Taveras, E.M., 2011. Does maternal feeding restriction lead to childhood obesity in a prospective cohort study? Arch. Dis. Child. 96, 265-269.
Roberts, S.B., Coward, W.A., 1985. Dietary supplementation increases milk output in the rat. Br. J. Nutr. 53, 1-9.
Rogers, L.K., Velten, M., 2011. Maternal inflammation, growth retardation, and preterm birth: insights into adult cardiovascular disease. Life Sci. 89, 417-421.
Sebert, S.P., Hyatt, M.A., Chan, L.L., Patel, N., Bell, R.C., Keisler, D., Stephenson, T., Budge, H., Symonds, M.E., Gardner, D.S., 2009. Maternal nutrient restriction between early and midgestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. Endocrinology 150, 634-641.
Sengupta, P., 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med 4, 624-630.
Smith, G.C., Smith, M.F., McNay, M.B., Fleming, J.E., 1998. First-trimester growth and the risk of low birth weight. N. Engl. J. Med. 339, 1817-1822.
Speakman, J.R., Mitchell, S.E., 2011. Caloric restriction. Mol Aspects Med 32, 159-221.

Sutton, G.M., Centanni, A.V., Butler, A.A., 2010. Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. Endocrinology 151, 1570-1580.
Temple, J.L., Rissman, E.F., 2000. Brief refeeding restores reproductive readiness in food-restricted female musk shrews (Suncus murinus). Horm. Behav. 38, 21-28.
Tzanavari, T., Giannogonas, P., Karalis, K.P., 2010. TNF-alpha and obesity. Curr. Dir. Autoimmun. 11, 145-156.
van Marthens, E., 1977. Alterations in the rate of fetal and placental development as a consequence of early maternal protein/calorie restriction. Biol. Neonate 31, 324-332.
Wanders, D., Graff, E.C., White, B.D., Judd, R.L., 2013. Niacin increases adiponectin and decreases adipose tissue inflammation in high fat diet-fed mice. PLoS One 8, e71285.
Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P.M., Charron, M.J., 2013. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. Biochim. Biophys. Acta.
Xie, X., Wen, Y., Niu, H., Shi, D., Zhang, Z., 2012. Re-feeding evokes reproductive overcompensation of food-restricted Brandt's voles. Physiol. Behav. 105, 653-660.
Yang, Z., Huffman, S.L., 2013. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. Matern Child Nutr 9 Suppl 1, 105-119.
Zane, C.E., 1976. Effects of various degrees of undernutrition of mice on pregnancy and conceptus. Experientia 32, 1291-1292.
Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372, 425-432.

Table 1. Reproductive performance of maternal food restriction (60%) or not during pregnancy. Data are presented as means ± SEM, percentage or absolute values. N control group = 6/ litter; n= experimental group =12/ litter.

Parameters	Control group	Experimental group
N^0 of females mated.	8	18
N^0 of pregnant females.	6/8 (75%)	12/18 (66,67%)
Body weight post partum (g).	267,50±7,96	251,50±9,27
Total number of pups.	64	42
Total number of male pups.	24	17
Total number of female pups.	40	25
Number of male/litter.	4,0±0,26	1,42±0,20***
Number of female/litter.	6,67±0,56	2,08±0,38***
Litter weight (g).	66,68±3,27	22,60±2,55***

***p<0,0001 Student t test relative to control group.

Captions to figures

Fig.1.Pups body weight during puberty (A) and weight gain in adult age (B) of male rats from dams restricted or not of food and feed or not with hypercaloric diet from 23 to 65 days of age. NRC - Pups of non food restricted dams that received during all experiment the laboratory chow ; FRC-= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of age the laboratory chow, FRH= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of age the hypercaloric diet. Data are presented as means ± SEM. N=8/group. To pups body weight - two way analysis of Variance followed by the Bonferroni test. a-p< .05 in relation to NRC group, b-p< 0.01 in relation to FRC group. One way ANOVA to weight gain in adult age.

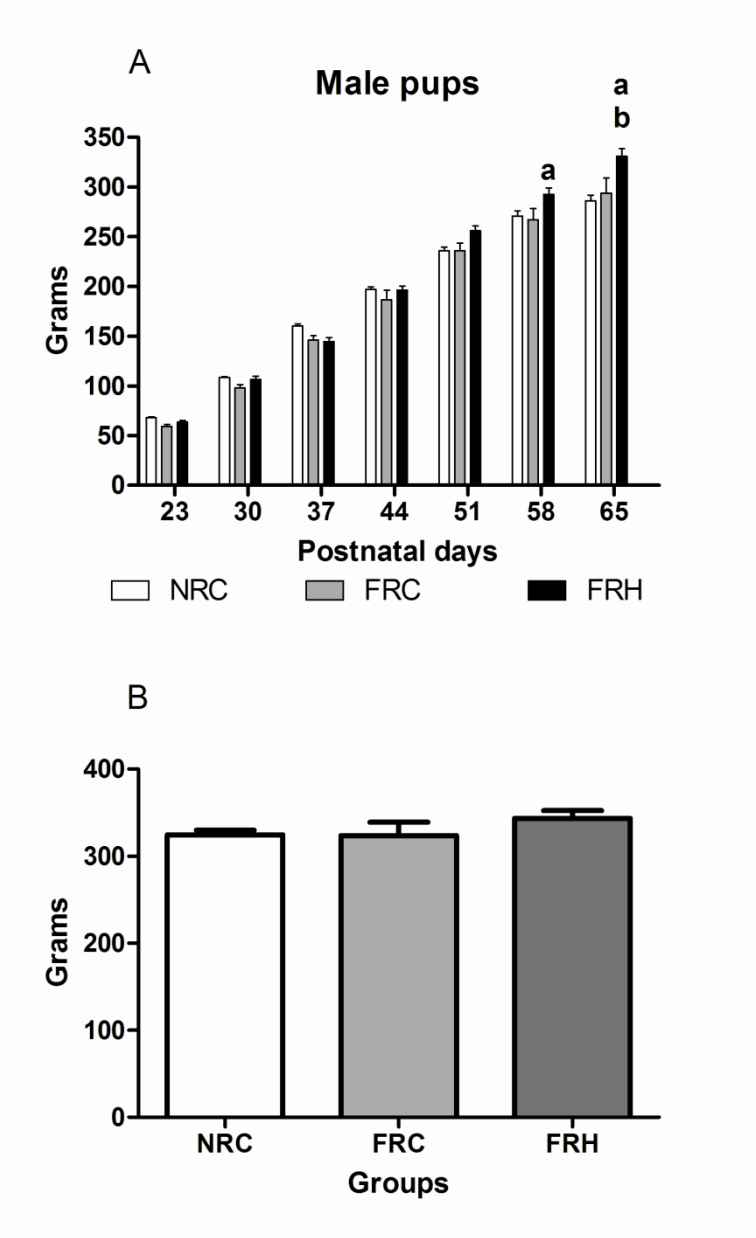


Fig.2. Sexual behavior of male rats from dams restricted or not of food during pregnancy and feded or not with hypercaloric diet from 23 to 65 days of age. NRC - Pups of non food restricted dams that received during all experiment the laboratory chow ; FRC-= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of age the laboratory chow, FRH= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of age the hypercaloric diet. N= 7-8/group. Data are presented as means ± SEM. One way ANOVA followed by the Bonferroni test. * p< 0.05 in relation to NRC group.

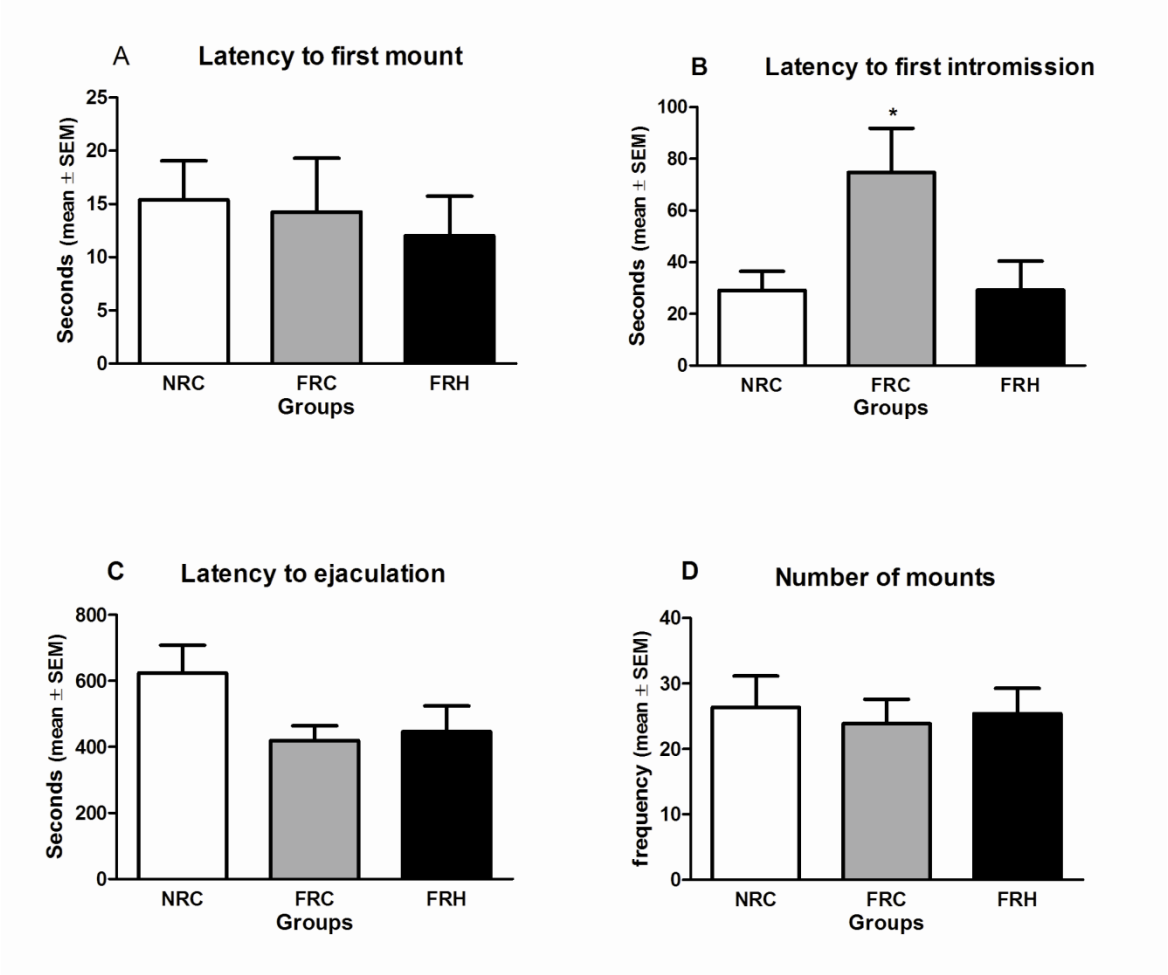
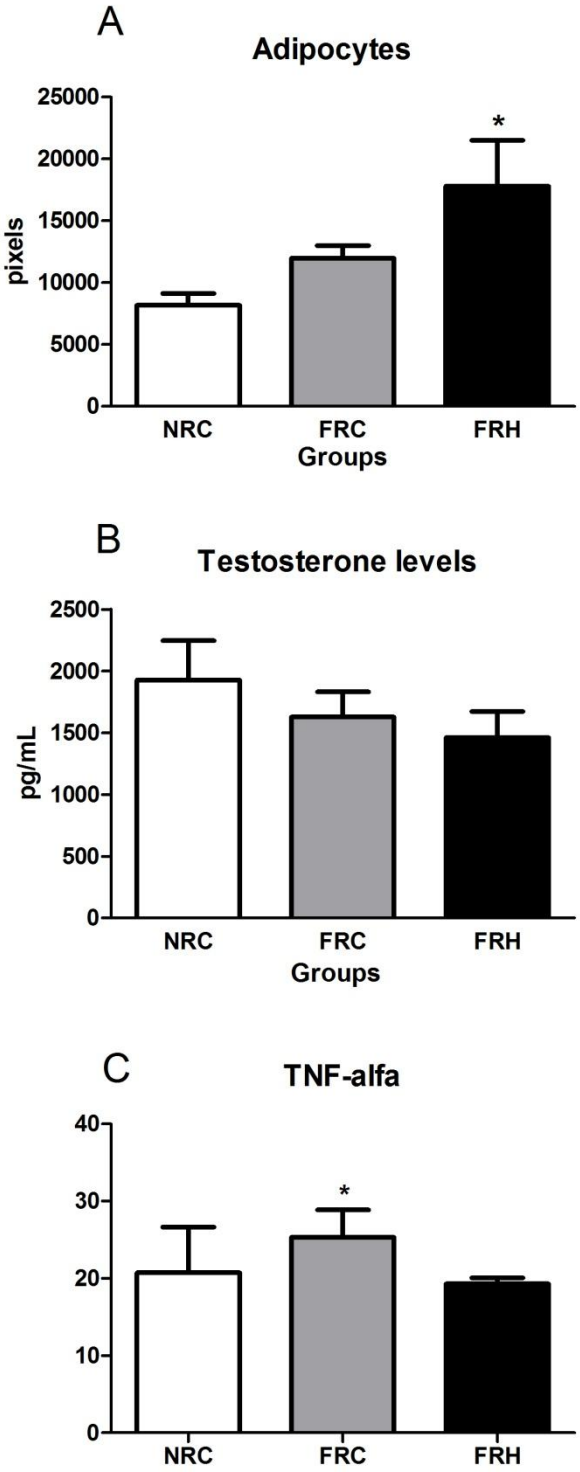
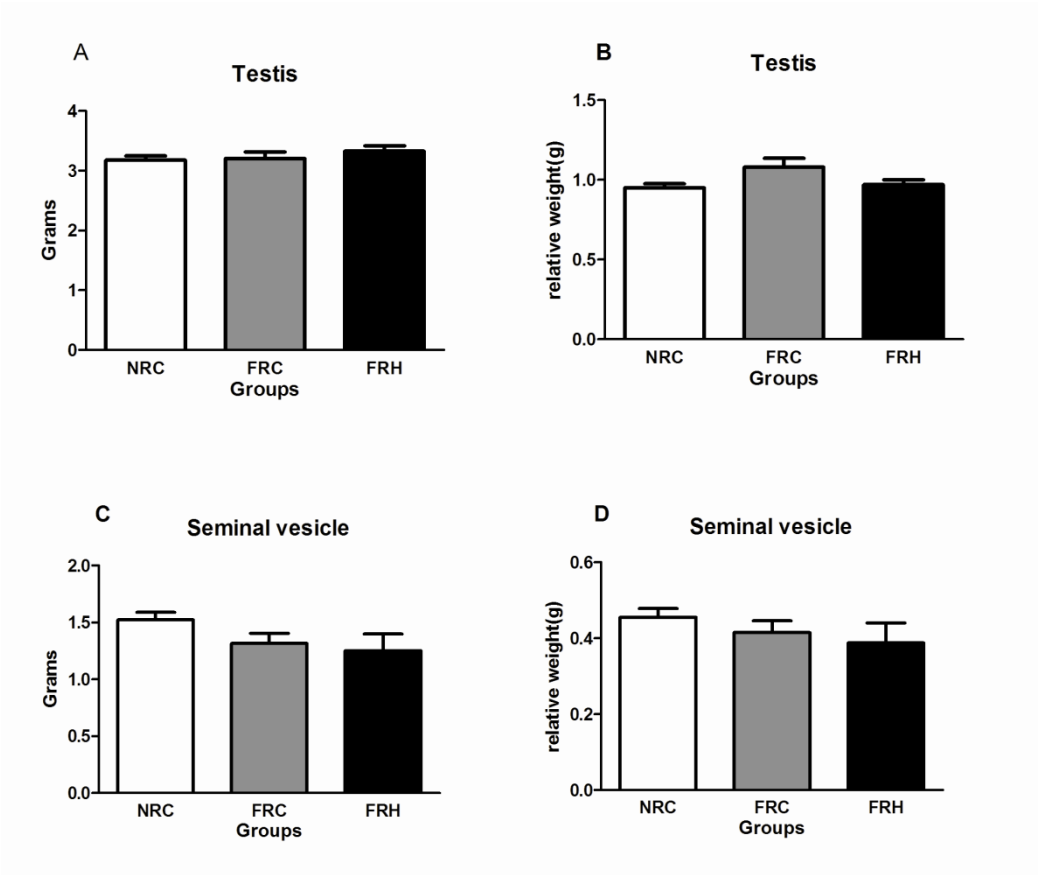


Fig.3 Area of adipocytes cells (A), testosterone (B) and TNF-α levels (C) of male rats from dams restricted or not of food during pregnancy and feed or not with hypercaloric diet from 23 to 65 days of age. NRC - Pups of non food restricted dams that received during all experiment the laboratory chow ; FRC-= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of age the laboratory chow, FRH= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of age the hypercaloric diet. N= 7-10/group. Data are presented as means ± SEM. One way ANOVA followed by the Tuckey test * $p < 0.05$ in relation to NRC group.



Captions to supplementary figure

Supplementary figure .Organs weight of male rats from dams restricted or not of food and feed or not with hypercaloric diet from 23 to 65 days of life. NRC - Pups of non food restricted dams that received during all experiment the laboratory chow ; FRC-= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of life the laboratory chow, FRH= Pups of food restricted dams that received from 23 to 65 days of life the hypercaloric diet. N= /group. Data are presented as means ± SEM. One way ANOVA.



ANEXO 3 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 134/12 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Obesidade e Reprodução: Efeitos da privação alimentar materna na prole de ratos machos; espécie utilizada: “ratos”; número de animais utilizados: “87”; sob a responsabilidade de ‘’DACLÉ JULIANI MACRINI’’, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 25 dias do mês de outubro de 2012.

Hailey Barros F. Gonçalves
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa da UNIP