



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Pamella Campos Silva

**A influência da dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal na
morfologia da próstata, dos testículos e nos parâmetros
espermáticos de ratos Wistar adultos**

Rio de Janeiro

2018

Pamella Campos Silva

**A influência da dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal na morfologia da
próstata, dos testículos e nos parâmetros espermáticos de ratos Wistar
adultos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientadora: Prof.^a Dra. Bianca Martins Gregório

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Pamella Campos.

A influência da dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal na morfologia da próstata, dos testículos e nos parâmetros espermáticos de ratos Wistar adultos / Pamella Campos Silva. – 2018.
132 f.

Orientadora: Bianca Martins Gregório.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Próstata – Teses. 2. Dieta hiperlipídica - Teses. 3. Feto – Desenvolvimento – Teses. 4. Testículos - Teses. 5. Desenvolvimento fetal. I. Gregório, Bianca Martins. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.65

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Pamella Campos Silva

**A influência da dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal na morfologia da
próstata, dos testículos e nos parâmetros espermáticos de ratos Wistar
adultos**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências
Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio
de Janeiro. Área de concentração: Sistema
Urogenital.

Aprovada em 16 de maio de 2018.

Orientadora: Prof.^a Dra. Bianca Martins Gregório

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Lúcia Gomes Rodrigues

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Caroline Fernandes dos Santos Bottino

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Fernanda Amorim de Moraes Nascimento Braga

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais, Jorge Santos da Silva e Rose Mary Campos Vale Silva, que sempre incentivaram meu crescimento intelectual e profissional. Agradeço a compreensão por todas as vezes que precisei me ausentar do convívio familiar para me dedicar a produção científica.

AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, por proporcionar a existência e a qualidade do curso e pelo incentivo ao progresso da ciência.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Bianca Martins Gregório, pelos ensinamentos, disponibilidade, confiança e compreensão desde o Mestrado até o período de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Waldemar Silva Costa, exemplo de dedicação à profissão, pela generosidade com que me recebeu na Unidade de Pesquisa Urogenital, quando eu ingressei para a realização da Iniciação Científica, pelos ensinamentos e amizade ao longo desses anos.

A Prof^a. Dr^a. Carla Braga Mano Gallo e ao Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza pelo incentivo e pela força.

Ao Prof. Dr. Raúl Segundo Sánchez Gutiérrez e toda a sua equipe, pelos ensinamentos, oportunidade e confiança para a realização de parte do meu Doutorado na Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

As amigas Carina Teixeira Ribeiro e Gabriela Faria Buys Gonçalves pela amizade, cumplicidade e conhecimento compartilhado.

Aos amigos do Laboratório de Estrutura e Ultra-estrutura da Unidade de Pesquisa Urogenital, pela cooperação e boa convivência.

A minha família, que sempre me apoiou incondicionalmente e com amor e carinho me confortaram nos momentos difíceis em que meus ideais pareciam distantes.

Ao meu namorado Jonas Moreira da Silva pelo incentivo e companheirismo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro na forma de Bolsa de Doutorado e Bolsa de Doutorado Sanduíche.

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo suporte financeiro na forma de Bolsa de Doutorado Nota 10.

A Deus, por tudo que foi citado acima.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

SILVA, Pamella Campos. **A influência da dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal na morfologia da próstata, dos testículos e nos parâmetros espermáticos de ratos Wistar adultos**. 2018. 132 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal nos parâmetros metabólicos, na morfologia da próstata ventral, na morfologia e na função testicular de ratos Wistar aos 4 meses de idade. Vinte fêmeas foram alimentadas com dieta controle (C) ou *high-fat* (HF), durante a gestação e a lactação. Após o desmame, os filhotes machos foram divididos em 4 grupos experimentais: C/C (n=8), C/HF (n=8), HF/C (n=9) e HF/HF (n=8), onde a primeira letra/sigla indica a dieta materna e a segunda letra/sigla a dieta da prole. Os parâmetros biométricos, o metabolismo lipídico, o perfil glicêmico, os níveis de testosterona, o índice gonadossomático, os depósitos de gordura epididimária, os parâmetros espermáticos, os testículos e a próstata ventral foram avaliados. Os parâmetros biométricos e as medições das gônadas foram similares entre os grupos. A dieta hiperlipídica pré-natal aumentou os níveis de triacilgliceróis e a dieta hiperlipídica pós-natal diminuiu os níveis de HDL-c ($P=0,0005$ e $P=0,0100$, respectivamente). A dieta hiperlipídica, independentemente do período de administração, promoveu hiperglicemia ($P=0,0064$). A concentração espermática foi menor no grupo HF/HF comparado ao HF/C ($P=0,0072$) e a viabilidade espermática foi menor em todos os grupos que receberam a dieta hiperlipídica comparado ao grupo C/C ($P<0,0001$). O compartimento tubular foi menor no grupo HF/HF ($P<0,0001$) e o diâmetro do túbulo seminífero foi maior no grupo HF/C ($P<0,0001$), comparados aos demais grupos. A altura do epitélio seminífero foi menor em todos os grupos comparado ao C/C ($P<0,0001$). Os níveis de testosterona sérica e a expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) foram menores no grupo C/HF comparado ao C/C ($P=0,0218$ e $P=0,0215$, respectivamente). A área acinar foi reduzida em todos os grupos que receberam a dieta hiperlipídica comparado ao grupo C/C ($P<0,0001$). A altura do epitélio prostático foi menor nos grupos HF/C e HF/HF em comparação aos grupos C/C e C/HF ($P<0,0001$) e a densidade volumétrica do epitélio foi menor no grupo HF/C comparado aos grupos C/C e C/HF ($P=0,0024$). A densidade volumétrica do tecido conjuntivo foi menor nos grupos HF/C e HF/HF ($P<0,0001$) e a densidade volumétrica das células musculares lisas foi reduzida nos grupos C/HF e HF/C ($P=0,0013$), comparados ao grupo C/C. Conclui-se que a dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal promoveu poucas alterações metabólicas, porém reduziu a próstata, alterou a morfologia testicular e os parâmetros espermáticos. Esses dados sugerem que a programação metabólica por dieta hiperlipídica comprometeu a atividade secretora e a contratilidade da próstata e ocasionou distúrbios na espermatogênese.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Período pós-natal. Programação fetal. Próstata.

Rato Wistar. Testículo.

ABSTRACT

SILVA, Pamella Campos. **The influence of the high-fat diet prenatal and/or postnatal on the prostatic morphology, testicular morphology and sperm parameters of adult Wistar rats.** 2018. 132 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

This study aimed to evaluate the effects of the prenatal and/or postnatal high-fat diet on the metabolic parameters, ventral prostate morphology, morphology and testicular function of 4-month-old Wistar rats. Twenty female were fed a control diet (C) or high-fat diet (HF), during gestation and lactation. After weaning, male pups were divided into 4 experimental groups: C/C (n=8), C/HF (n=8), HF/C (n=9) and HF/HF (n=8), the first letter/initials indicates the maternal diet and the second letter/initials indicates the offspring diet. The biometric parameters, lipid metabolism, glycemic profile, testosterone levels, the gonadosomatic index, genital fat deposits, sperm parameters, testes and ventral prostate were evaluated. The biometric parameters and measurements of gonads were similar among the groups. The prenatal high-fat diet increased triacylglycerol levels and the postnatal high-fat diet decreased HDL-c levels ($P=0.0005$ and $P=0.0100$, respectively). The HF diet, regardless of its administration period, induced a hyperglycemia ($P=0.0064$). The sperm concentration was lower in the HF/HF group than in the HF/C ($P=0.0072$) and sperm viability was lower in all groups receiving a high-fat diet compared to the C/C group ($P<0.0001$). The tubular compartment was smaller in the HF/HF group ($P<0.0001$) and the seminiferous tubule diameter was higher in the HF/C group ($P<0.0001$), compared to the other groups. The seminiferous epithelium height was lower in all groups than that in the C/C ($P<0.0001$). Serum testosterone levels and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression were lower in the C/HF group compared to the C/C ($P=0.0218$ and $P=0.0215$, respectively). The acinar area was reduced in all groups that received the high-fat diet compared to the C/C group ($P<0.0001$). The epithelium height of prostate was lower in the HF/C and HF/HF groups compared to the C/C and C/HF groups ($P<0.0001$) and the epithelium area density was lower in the HF/C group than in the C/C and C/HF groups ($P=0.0024$). The connective tissue area density was lower in the HF/C and HF/HF groups ($P<0.0001$) and the smooth muscle cells area density was lower in the C/HF and HF/C groups ($P=0.0013$), compared to the C/C group. It was concluded that the prenatal and/or postnatal high-fat diet caused few metabolic changes, however reduced prostate, altered testicular morphology and sperm parameters. These data suggest that the metabolic programming by high-fat diet compromised the secretory activity and contractility of the prostate and caused disturbances in spermatogenesis.

Keywords: High-fat diet. Postnatal period. Fetal programming. Prostate. Wistar rats. Testes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Anatomia funcional da próstata humana.....	24
Figura 2 –	Anatomia da próstata de rato.....	25
Figura 3 –	Corte esquemático mostrando os lóbulos testiculares contendo os túbulos seminíferos.....	27
Figura 4 –	Corte esquemático contendo o túbulo seminífero e o tecido conjuntivo frouxo.....	28
Figura 5 –	Espermatogênese (fase proliferativa, fase meiótica e fase espermiogênica).....	31
Figura 6 –	Identificação dos gêneros dos filhotes ao nascimento.....	38
Figura 7 –	Esquema representativo da formação dos diferentes grupos experimentais.....	39
Figura 8 –	Aferição da pressão arterial sistólica.....	41
Figura 9 –	Imagem mostrando o passo-a-passo do TOTG.....	42
Figura 10 –	Dissecção da próstata aos 4 meses de idade.....	43
Figura 11 –	Dissecção dos testículos e dos depósitos de gordura epididimária aos 4 meses de idade.....	44
Figura 12 –	Secção da cauda do epidídimo para preparo da solução espermática.....	45
Figura 13 –	Mensuração do diâmetro do túbulo seminífero (100×).....	50
Figura 14 –	Mensuração da altura do epitélio seminífero (200×).....	51
Figura 15 –	Quantificação das células de Sertoli (600×).....	52
Figura 16 -	Avaliação da densidade volumétrica do compartimento tubular e do compartimento intertubular (400×).....	53
Figura 17 –	Mensuração da área acinar (200×).....	54
Figura 18 –	Mensuração da altura do epitélio prostático (600×).....	54
Figura 19 –	Avaliação da densidade volumétrica do epitélio, do lúmen acinar, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas (200×).....	55
Figura 20 –	Imagens mostrando a concentração espermática dos grupos experimentais.....	61

Figura 21 –	Fotomicrografias mostrando o diâmetro dos túbulos seminíferos dos grupos experimentais.....	64
Figura 22 –	Fotomicrografias mostrando a altura do epitélio seminífero dos grupos experimentais.....	66
Figura 23 –	Expressão da proteína StAR e bandas representativas da proteína dos grupos experimentais.....	68
Figura 24 –	Fotomicrografias mostrando a área acinar dos grupos experimentais.....	70
Figura 25 –	Fotomicrografias mostrando a altura do epitélio prostático dos grupos experimentais.....	71
Figura 26 –	Fotomicrografias mostrando a densidade volumétrica do epitélio, do lúmen acinar, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas dos grupos experimentais.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Diâmetro do túbulo seminífero dos grupos experimentais.....	63
Gráfico 2 –	Altura do epitélio seminífero dos grupos experimentais.....	65
Gráfico 3 –	Contagem do número de células de Sertoli dos grupos experimentais.....	67
Gráfico 4 –	Área acinar dos grupos experimentais.....	69
Gráfico 5 –	Altura do epitélio prostático dos grupos experimentais.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais. Mix de minerais* e mix de vitaminas** segundo a recomendação da AIN-93G e AIN-93M (Reeves, Nielsen et al. 1993).....	40
Tabela 2 – Parâmetros metabólicos das progenitoras.....	58
Tabela 3 – Ingestão alimentar, ingestão energética, eficiência alimentar, biometria, medições das gônadas, bioquímica sérica e níveis hormonais dos grupos experimentais.....	60
Tabela 4 – Parâmetros espermáticos e parâmetros testiculares dos grupos experimentais.....	62
Tabela 5 - Parâmetros prostáticos dos grupos experimentais.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1N	Haploide
2N	Diploide
4N	Tetraploide
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AGS	Ácido graxo saturado
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ASC	Área sob a curva
BSA	Albumina sérica bovina
C	Controle
CO ₂	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Colesterol total
DAB	Diaminobenzidina
DG	Dias de gestação
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DP	Desvio padrão
DPN	Dias pós-natal
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FCR	Força centrífuga relativa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina
HF	<i>High-fat</i>
I/G	Insulina/glucose
IGS	Índice gonadossomático
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante

LHS	Lipase hormônio sensível
MS	Ministério da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PSA	Antígeno prostático específico
RA	Receptor androgênico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SG	Semanas de gestação
SRY	<i>Sex-determining region Y</i>
StAR	Proteína reguladora aguda esteroidogênica
TACs	Células <i>transit-amplify</i>
TAG	Triacilgliceróis
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
T-TBS	<i>Tween – tris buffered saline</i>
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1	Programação fetal.....	18
1.2	Ácidos graxos saturados.....	20
1.3	Estrutura da próstata.....	22
1.4	Estrutura dos testículos.....	26
1.5	Espermatogênese.....	29
1.6	Ontogênese dos testículos e da próstata.....	31
1.6.1	<u>Testículo.....</u>	33
1.6.1.1	Humano.....	33
1.6.1.2	Rato.....	33
1.6.2	<u>Próstata.....</u>	34
1.6.2.1	Humano.....	34
1.6.2.2	Rato.....	35
2	OBJETIVO.....	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Animais e dieta.....	37
3.2	Biometria e ingestão alimentar dos animais.....	40
3.3	Pressão arterial sistólica.....	41
3.4	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	42
3.5	Eutanásia dos animais.....	43
3.6	Análise bioquímica sérica.....	44
3.7	Avaliações dos espermatozoides.....	45
3.7.1	<u>Concentração dos espermatozoides.....</u>	45
3.7.2	<u>Motilidade dos espermatozoides.....</u>	46
3.7.3	<u>Viabilidade dos espermatozoides.....</u>	46
3.8	Índice gonadossomático (IGS).....	47
3.9	Microscopia de luz.....	48
3.9.1	<u>Análises histológicas.....</u>	48
3.9.2	<u>Imunohistoquímica</u>	48

3.9.3	<u>Avaliações morfométricas</u>	49
3.9.3.1	Testículo.....	49
3.9.3.2	Próstata.....	53
3.10	Western blot (WB)	56
3.11	Análise estatística	56
4	RESULTADOS	58
4.1	Dados das progenitoras	58
4.2	Dados da prole	58
4.2.1	<u>Ingestão alimentar, ingestão energética, eficiência alimentar, biometria e medições das gônadas</u>	58
4.2.2	<u>Bioquímica sérica e níveis hormonais</u>	59
4.2.3	<u>Parâmetros espermáticos</u>	61
4.2.4	<u>Parâmetros testiculares</u>	62
4.2.5	<u>Parâmetros prostáticos</u>	68
5	DISCUSSÃO	75
	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE - Protocolo de histoquímica.....	94
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	95
	ANEXO B - Formato final do 1 ^o artigo científico publicado.....	96
	ANEXO C - Comprovação de submissão do 2 ^o artigo científico.....	106

INTRODUÇÃO

Mudanças no estado nutricional materno durante a gestação e a lactação podem resultar em adaptações permanentes na estrutura, fisiologia e metabolismo de vários órgãos dos seus filhos na vida adulta (Jackson, Alexander et al. 2012, Rodriguez-Gonzalez, Reyes-Castro et al. 2014). Este fenômeno denominado de programação fetal é um conceito proveniente de um estudo epidemiológico desenvolvido por David Barker, em 1986 (Barker and Osmond 1986). Modelos experimentais de programação nutricional são bastante estudados nos dias atuais (Bezpalko, Gavriluk et al. 2015, Maruyama, Kagota et al. 2015, Tain, Hsu et al. 2015).

Os padrões dietéticos sofreram diversas transformações na sociedade ocidental, com o aumento no consumo de alimentos hiperenergéticos e ricos em lipídios, em detrimento do consumo de alimentos saudáveis e nutritivos (Sheehy and Sharma 2010, Austin, Ogden et al. 2011), susceptibilizando o desenvolvimento do sobrepeso e/ou obesidade não só em países desenvolvidos, mas também em populações de baixa e média renda (Okreglicka 2015). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2017), a obesidade é mais frequente em mulheres e atinge progressivamente as faixas reprodutivas, na proporção de 8,8% (18 - 24 anos), 15,4% (25 - 34 anos) e 22,9% (35 - 44 anos) (Ministério da Saúde 2017). Segundo Desai e colaboradores (2016), a supernutrição e a obesidade materna programam o desenvolvimento da obesidade nos filhos. Os pesquisadores observaram que ratos adultos, que foram amamentados por mães obesas, apresentaram aumento da massa corporal e da adiposidade (Desai, Han et al. 2016).

Há um crescente interesse no entendimento das consequências da obesidade sobre a função reprodutora. Estudos clínicos e experimentais têm associado a obesidade e a qualidade da dieta ingerida ao comprometimento da fertilidade e à redução da qualidade e quantidade do esperma (Vigueras-Villasenor, Rojas-Castaneda et al. 2011, Chavarro, Minguez-Alarcon et al. 2014, Thomsen, Humaidan et al. 2014). Hamilton e colaboradores (2013) observaram que em paralelo ao consumo de dieta hiperenergética e ao estilo de vida sedentário houve uma diminuição de 2% nas taxas de fertilidade nos países desenvolvidos, atingindo os valores mais baixos já registrados (Hamilton, Hoyert et al. 2013). Também foi

observado que a obesidade e o consumo de dieta hiperlipídica promoveram o remodelamento estromal da próstata, a liberação de fatores que desencadeiam distúrbios proliferativos na glândula e o aumento do risco de desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (HPB) e do câncer de próstata (Shankar, Bhaskaran et al. 2015, Silva, Gobbo et al. 2015). Porém, pouco se discute sobre as implicações da obesidade materna / excesso de lipídios da dieta sobre a morfologia da próstata, dos testículos e a função espermática dos filhos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Programação fetal

Da concepção até a amamentação, o feto e posteriormente o recém-nascido são totalmente dependentes da mãe para a sua nutrição, crescimento e desenvolvimento. Inicialmente, o feto é nutrido por meio da placenta e posteriormente a nutrição do bebê é realizada através do leite materno. Portanto, todo o consumo materno (alimentos, aditivos químicos, álcool, cigarro, drogas, medicamentos e suplementos) afeta diretamente a saúde dos filhos (Dupont, Cordier et al. 2012, Grant, Petroff et al. 2017, King, Campbell et al. 2017, Mannucci, Dante et al. 2017). Ao longo das últimas décadas, evidências epidemiológicas mostraram que as condições de vida intra-uterina e durante o início da vida pós-natal influenciaram os padrões de crescimento, a composição corporal e o risco do aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis nos descendentes (Uauy, Kain et al. 2011).

A programação fetal é um conceito proveniente de um estudo epidemiológico desenvolvido por David Barker. Barker foi um dos epidemiologistas clínicos mais influentes do nosso tempo (1938 - 2013) e pioneiro da área, com a concepção da hipótese de Barker. Ele observou forte correlação positiva entre o baixo peso ao nascer de bebês nascidos na época da 2ª guerra mundial e o surgimento de eventos cardiovasculares nesses indivíduos na vida adulta, na década de 70. Nesse sentido, a má alimentação materna, decorrente da escassez alimentar na guerra, foi o principal fator relacionado à alta mortalidade por doença arterial coronariana (Barker and Osmond 1986). A programação fetal ocorre em decorrência da exposição a estímulos ambientais durante uma janela crítica do desenvolvimento (gestação e/ou lactação), que promove um efeito permanente na estrutura, na fisiologia e no metabolismo da prole na vida adulta (Lucas 1991).

A alimentação fetal e o aleitamento podem ocorrer sob condições de desequilíbrio nutricional materno como: restrição protéica, ingestão de alimentos hiperenergéticos, distúrbios alimentares e hiperêmese gravídica (Barrand, Crowley et al. 2017, Dean, Bannigan et al. 2017, Larsen, Sando-Pedersen et al. 2017, Watson, Zerwas et al. 2017). Por questões éticas e razões óbvias, os estudos em

seres humanos são observacionais e fornecem sugestões aparentemente vinculadas a um estímulo prévio. Com base nisso, a fim de testar uma determinada hipótese, modelos animais de programação nutricional são bastante estudados nos dias atuais (Bezpalko, Gavriluk et al. 2015, Maruyama, Kagota et al. 2015, Tain, Hsu et al. 2015).

O rato é um animal amplamente utilizado para o estudo da programação fetal, pois é um mamífero prolífero (8 - 12 animais por ninhada) e os períodos de gestação e lactação são curtos (aproximadamente 21 dias de gestação e 21 dias de lactação) (Perraud 1976, Yu, Zheng et al. 2016). Estas características são de suma importância, visto que num curto período de tempo facilmente é obtida uma quantidade considerável de animais, para a formação dos grupos experimentais. Outra característica relevante é o pequeno porte do rato, o que facilita a sua acomodação, manutenção e manipulação, uma vez que diversos parâmetros biométricos como a massa corporal, o comprimento nasoanal e o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) são avaliados em estudos nutricionais (Hallam and Reimer 2016).

Os efeitos da programação fetal por dieta hiperlipídica no metabolismo dos descendentes já estão bem caracterizados, de maneira que a ingestão materna de dieta rica em gordura está vinculada à dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina nos filhotes (Desai, Jellyman et al. 2014, Umekawa, Sugiyama et al. 2015). No entanto, estudos que vinculam esta programação nutricional e possíveis alterações na próstata, nos testículos e na função espermática da prole adulta são escassos.

Christante e colaboradores, em 2013, observaram que a obesidade materna, induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação, alterou o desenvolvimento dos gonócitos e a esteroidogênese em ratos, durante os primeiros dias de vida, de 0,5 a 14,5 dias pós-parto (Christante, Taboga et al. 2013). Além disso, a exposição ao ambiente obesogênico, induzido pelo consumo de dieta hiperlipídica no período pré-natal, diminuiu a produção diária de espermatozoides (Reame, Pytlowanciv et al. 2014) e promoveu a hipertrofia da próstata de ratos adultos (Pytlowanciv, Pinto-Fochi et al. 2016). Sendo assim, foi observado que alguns parâmetros do sistema urogenital foram modificados por influência da dieta materna rica em ácidos graxos saturados (AGSs).

1.2 Ácidos graxos saturados

Os AGSs são componentes substanciais dos lipídios, que assim como os carboidratos e as proteínas são macronutrientes (Carreiro, Dhillon et al. 2016). Os macronutrientes são os nutrientes que constituem a maior parte da nossa alimentação, sendo que o lipídio contém a maior quantidade de energia por grama (Ruiz-Nunez, Dijck-Brouwer et al. 2016). Os lipídios são necessários para diversas funções básicas dos animais, como: fonte energética para a manutenção celular (Chiu, Karmon et al. 2018); isolante térmico, sendo o principal combustível responsável pela produção de calor (50%) (Iwen, Backhaus et al. 2017) e componente estrutural, sendo parte dos fosfolipídios presentes nas membranas celulares (Perona 2017). A qualidade da gordura dietética afeta as funções vitais da célula e a sua capacidade de resistir a uma determinada disfunção (Ruiz-Nunez, Dijck-Brouwer et al. 2016). A mudança no tipo de gordura consumida, com o aumento no consumo de gordura saturada em detrimento da gordura poliinsaturada, tem sido observada nos padrões dietéticos (Sheehy and Sharma 2010, Austin, Ogden et al., 2011).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com uma típica estrutura RCOOH , que contém uma extremidade metil, uma cadeia de hidrocarboneto (R) e um grupamento terminal carboxílico (Tvrzicka, Kremmyda et al. 2011). De acordo com a presença de insaturações, os ácidos graxos são classificados, mediante a sua estrutura, em ácidos graxos saturados (sem dupla ligação na molécula), monoinsaturados (uma dupla ligação na molécula) ou poliinsaturados (duas ou mais duplas ligações na molécula). Além disso, os ácidos graxos diferem no tamanho da cadeia carbônica e podem ser classificados em ácidos graxos de cadeia curta (de 2 a 4 átomos de carbono), cadeia média (de 6 a 10 átomos de carbono) e cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono) (Castro and Cardoso 2010).

Os AGSs são caracterizados por apresentarem cadeia retilínea com um número variável de átomos de carbono (cadeias de 8 a 18 átomos de carbono) e maior ponto de fusão quando comparados aos ácidos graxos insaturados (Castro and Cardoso, 2010). Os AGSs são metabolizados pelas células por meio da beta-oxidação, um processo que permite a produção mitocondrial de grandes quantidades de acetil coenzima A (acetil-CoA), que entra no ciclo do ácido cítrico.

No fígado, a acetil-CoA citoplasmática é a precursora para a síntese de novos AGSs e colesterol, que em conjunto com os triacilgliceróis (TAG), são utilizados para a formação de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Sendo assim, uma dieta rica em AGSs contribui para aumentar a produção hepática dessas lipoproteínas (Cascio, Schiera et al. 2012).

Os AGSs representam 30 - 40% do total de ácidos graxos nos tecidos humanos, distribuídos entre ácido palmítico – 16:0 (15 - 25%), ácido esteárico – 18:0 (10 - 20%), ácido mirístico – 14:0 (0.5 - 1%) e ácido láurico – 12:0 (menos de 0,5%) (Legrand and Rioux 2010). O tecido adiposo e o fígado sintetizam e armazenam os AGSs, particularmente o ácido palmítico (Hellerstein 1999, Carta, Murru et al. 2017). A glândula mamária produz o ácido palmítico, o ácido mirístico e o ácido láurico, que atuam como fontes de energia facilmente disponíveis, com propriedades antivirais e antimicrobianas, que viabilizam o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência da prole de mamíferos (Ruiz-Nunez, Dijck-Brouwer et al. 2016).

O ácido palmítico é o principal componente do óleo de palma, sendo também encontrado no leite, seus derivados e na carne bovina. O ácido esteárico está presente em óleos e gorduras animais e vegetais. O ácido láurico é encontrado de forma abundante no óleo de coco e no óleo da semente de palma. As principais fontes do ácido mirístico são o leite, seus derivados, a noz-moscada, o óleo de coco e o óleo da semente de palma (Ruiz-Nunez, Dijck-Brouwer et al. 2016, Panchal, Carnahan et al. 2017). Na maioria dos países ocidentais a principal fonte dietética de AGSs são os laticínios ricos em gordura e a carne vermelha (Ruiz-Nunez, Dijck-Brouwer et al. 2016).

O aumento da ingestão de gordura saturada, e também colesterol, aumenta os níveis sanguíneos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL ou “mau” colesterol), que está relacionado ao maior risco de doença cardíaca coronariana, diabetes e mortalidade (Li, Hruby et al. 2015, Chen, Du et al. 2017). Ademais, pode potencializar a peroxidação lipídica, danificar macromoléculas (enzimas, DNA) e promover alterações testiculares e prostáticas (Rani, Deep et al. 2016). Por essas razões, as indústrias agrícolas e alimentícias são orientadas a diminuir a disponibilidade de AGSs para “tão baixo quanto possível” (Ruiz-Nunez, Dijck-Brouwer et al. 2016).

No estudo de Campos-Silva e colaboradores (2015) foi observado que em ratos Wistar adultos, o consumo de dieta rica em AGSs alterou a morfologia

testicular, promovendo a diminuição do diâmetro do túbulo seminífero, da altura do epitélio seminífero e da proliferação celular do túbulo seminífero, parâmetros que podem estar relacionados a distúrbios na espermatogênese (Campos-Silva, Furriel et al. 2015). Yan e colaboradores (2015) observaram que o consumo de dieta hiperlipídica à base de banha de porco promoveu a diminuição no número de células de Leydig, o que pode comprometer os níveis de testosterona (Yan, Mu et al. 2015). A redução nos níveis de testosterona afeta o comportamento sexual e, portanto, a reprodução (Pintana, Chattipakorn et al. 2015). Na próstata de ratos Wistar, Furriel e colaboradores (2014) observaram que os AGSs promoveram o aumento da proliferação celular estromal, que pode ser considerado um fator de risco para o remodelamento adverso da próstata ventral (Furriel, Campos-Silva et al. 2014). Portanto estes estudos mostram que os AGSs atuam na estrutura dos testículos e da próstata.

1.3 Estrutura da próstata

A próstata é uma glândula exócrina, encontrada exclusivamente nos mamíferos. No homem, este órgão está localizado abaixo da bexiga, anteriormente ao reto, circundando a porção inicial da uretra e pesa aproximadamente 20g (Price 1963). A principal função da próstata é secretar o fluído prostático, um fluído incolor e ligeiramente alcalino ($\text{pH} = 7,29$), que constitui $1/5 - 1/3$ do volume do fluído seminal (Verze, Cai et al. 2016). O fluído seminal fornece energia, atua na defesa dos espermatozoides e contribui para a sua motilidade e capacitação. Essas características oferecem condições ideais de sobrevivência e viabilidade aos espermatozoides, durante e após a ejaculação (Price 1963, Hopkins, Sepil et al. 2017). Composto o fluído prostático encontra-se o antígeno prostático específico (PSA). O PSA é um marcador funcional da próstata, níveis sanguíneos elevados deste antígeno podem ser um dos indicativos do câncer de próstata (Stamey and Kabalin 1989, Pepe and Aragona 2014).

A próstata é constituída por ácinos e ductos excretores, contendo um componente epitelial e um componente estromal (McNeal, Redwine et al. 1988). No epitélio secretor há seis tipos de células, que apresentam fenótipos distintos e

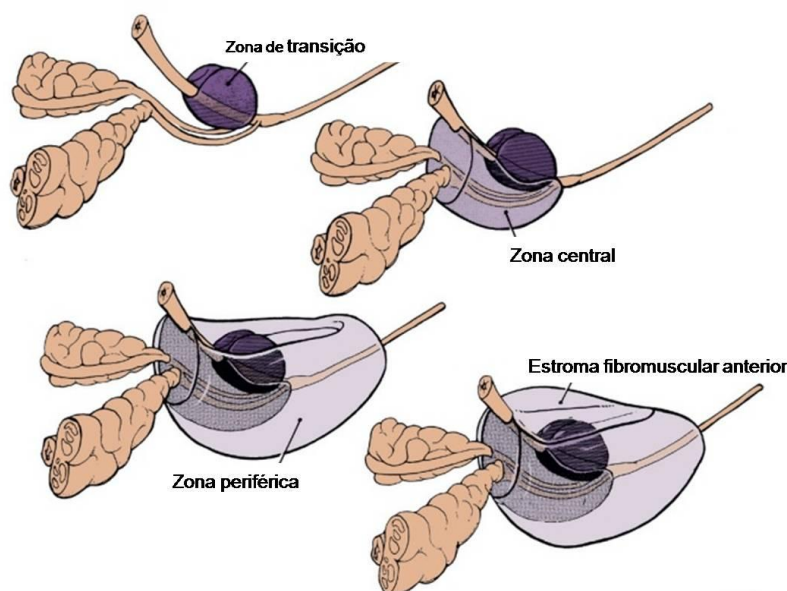
funções específicas: células-tronco, células basais, células *transit-amplify* (TACs), células intermediárias, células luminais secretoras e células neuroendócrinas (Schalken and van Leenders 2003, Singh, Uzgare et al. 2006). As células-tronco e as células basais atuam como o *pool* de renovação celular do epitélio e acredita-se que sejam precursoras das células secretoras (Lang, Frame et al. 2009). As células intermediárias e as TACs exibem uma intensa capacidade de proliferação. As células luminais secretoras, as principais do epitélio prostático, são responsáveis pela produção da enzima fosfatase ácida e do PSA (Miki 2010). As células neuroendócrinas estão presentes em menor número e secretam peptídeos e hormônios, cuja função é controlar a proliferação, a diferenciação e a secreção das células epiteliais (Srougi, Antunes et al. 2010).

O estroma contribui com 45 - 54% do peso da próstata. O componente estromal é formado por uma região subepitelial contendo fibroblastos e fibras colágenas, seguida de uma região rica em células musculares lisas que rodeiam os ácinos secretores (Lin and Bissell 1993). Os fibroblastos sintetizam os componentes da matriz extracelular e as células musculares lisas são responsáveis pela contração da glândula e pela interação epitélio-estroma (Thomson, Cunha et al. 2008, Kruslin, Ulamec et al. 2015, Levesque and Nelson 2017). A matriz extracelular é constituída por um complexo arranjo de proteínas fibrilares, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, como a laminina e a fibronectina. Associados a esses elementos da matriz encontram-se também fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias das atividades celulares (Harmelin, Danon et al. 2005, Kruslin Ulamec et al., 2015).

A próstata humana é subdividida em três zonas, segundo denominação proposta por McNeal (1988): zona periférica, zona central e zona de transição (McNeal, Redwine et al. 1988). Além destas regiões, existe uma área não glandular denominada estroma fibromuscular anterior (McNeal, Redwine et al. 1988, Srougi, Antunes et al. 2010) (Figura 1). A zona periférica está localizada na face lateral e posterior da próstata, ao redor das zonas central e de transição. Esta zona representa a maior porção da próstata normal, abrange aproximadamente 75% de todo o tecido glandular, e nessa região ocorrem a maior parte dos adenocarcinomas prostáticos. A zona central circunda o ducto ejaculatório, compreendendo o espaço onde o ducto se conecta a uretra. Esta região constitui 20% do tecido prostático, sendo a zona onde se originam 5% dos carcinomas prostáticos. Os outros 5% do tecido prostático remanescentes formam a zona de transição, localizada ao redor da

porção proximal da uretra, sendo contornada totalmente pelas zonas central e periférica. Apesar do seu pequeno volume, é nessa região que se origina a HPB e alguns casos de câncer de próstata (20%). O estroma fibromuscular se estende anterior e lateralmente formando uma cápsula, que separa a próstata da gordura periprostática (McNeal, Redwine et al. 1988, Srougi, Antunes et al. 2010).

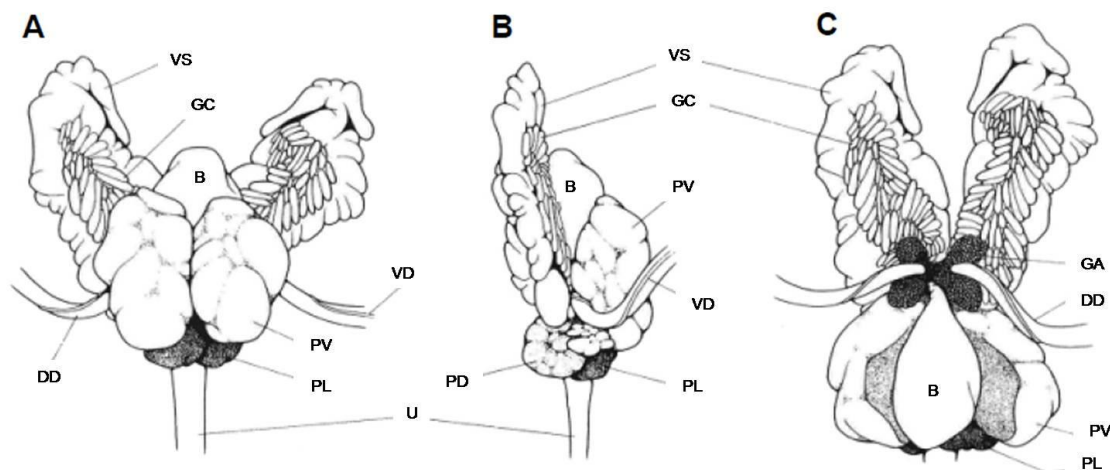
Figura 1 – Anatomia funcional da próstata humana



Legenda: Regiões da próstata humana descritas por McNeal (1988): zona de transição, zona central, zona periférica e estroma fibromuscular anterior.
 Fonte: McDougal 2011.

A próstata de rato não tem uma estrutura anatômica compacta como a próstata humana. No rato, esta glândula é formada por quatro pares de lobos bilateralmente simétricos, situados ao redor da uretra e distalmente à bexiga urinária, denominados: próstata anterior ou glândula de coagulação, próstata dorsal, próstata lateral e próstata ventral (Figura 2). Os lobos dorsais e os lobos laterais compartilham um sistema de ductos, por isso alguns estudos consideram estes lobos como um único bloco, denominado de próstata dorsolateral (Marker, Donjacour et al. 2003, Roy-Burman, Wu et al. 2004, Timms 2008).

Figura 2 – Anatomia da próstata de rato



Legenda: Órgãos sexuais acessórios masculinos de um rato adulto. A: vista anterior, B: vista lateral, C: vista anterior com a bexiga defletida caudalmente. Glândula ampular do ducto deferente (GA); bexiga (B); glândula de coagulação (GC); próstata dorsal (PD), próstata lateral (PL); vesícula seminal (VS); próstata ventral (PV); ducto deferente (DD); veia deferente (VD); uretra (U).

Fonte: Timms 2008.

A próstata anterior está situada lateralmente às vesículas seminais e cranialmente aos outros lobos prostáticos. O produto de secreção deste lobo é abundante e homogêneo (Roy-Burman, Wu et al. 2004). A próstata dorsolateral tem origem na base das vesículas seminais e envolve ventralmente a uretra. A próstata ventral constitui cerca da metade da massa de todo o complexo prostático (Hayashi, Sugimura et al. 1991). Cada lobo ventral é constituído por 2-3 ductos delgados principais que penetram a uretra, ventralmente, logo abaixo da bexiga. Cada ducto principal estende-se por uma curta distância da uretra e origina 8-12 ductos secundários que se encontram intimamente associados. Dos ductos secundários, originam-se os ductos terminais, que são numerosos na próstata ventral (Roy-Burman, Wu et al. 2004).

Os diferentes lobos da próstata de rato apresentam uma heterogeneidade quanto à histologia e a sensibilidade androgênica. O lobo ventral é o mais utilizado em estudos translacionais, por ser a região mais responsiva à ação dos androgênios. Esta é a região que mais sofre influências fisiológicas e morfológicas desses hormônios, portanto é a mais semelhante à próstata humana (Bruchovsky, Lesser et al. 1975, Prins 1992). A próstata de homem e de rato tem tipos de células epiteliais semelhantes, que parecem efetuar as mesmas ações fisiológicas, apesar

da proporção destas células variarem entre as espécies. A próstata humana tem um estroma fibromuscular abundante, enquanto a próstata de rato apresenta um estroma escasso (Roy-Burman, Wu et al., 2004).

A próstata é um órgão andrógeno – dependente, altamente sensível aos distúrbios hormonais e que apresenta alta capacidade responsiva a hormônios, principalmente aos andrógenos (Marker, Donjacour et al. 2003, Antoniassi et al., 2017). O principal andrógeno circulante no homem é a testosterona (Kim, Yun et al. 2011), sendo a maior parte produzida nos testículos e apenas 5% produzida pelo precursor de andrógenos, a dehidroepiandrosterona (DHEA) nas glândulas adrenais (Labrie, Luu-The et al. 2001). Na próstata, o andrógeno biologicamente ativo é a dihidrotestosterona (DHT), produzido pela conversão local da testosterona pela enzima 5-alfa-redutase (Hayward and Cunha 2000, McNamara, Nakamura et al. 2013). A privação de andrógenos resulta numa acentuada regressão e altera a fisiologia normal do órgão. Alterações nas secreções prostáticas podem ser refletidas em distúrbios reprodutivos.

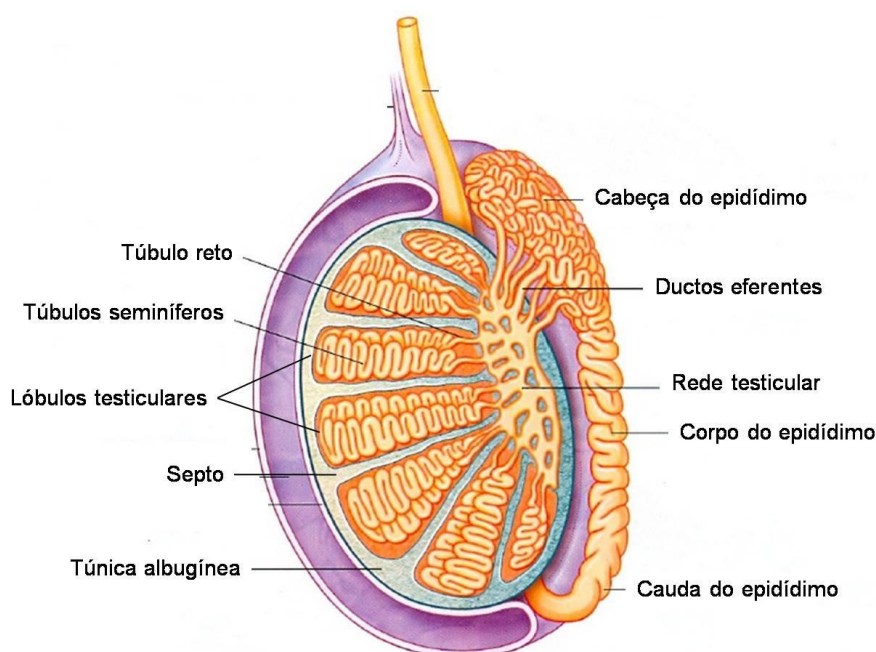
1.4 Estrutura dos testículos

Os testículos são órgãos pares localizados no escroto, fora da cavidade abdominal, e apresentam funções exócrina e endócrina (Goossens and Tournaye 2013). Estes órgãos são formados durante o período gestacional e estão localizados inicialmente no interior da cavidade abdominal. Durante o desenvolvimento embrionário, o testículo migra por meio da parede abdominal, passando pelo canal inguinal e chega até o escroto. No escroto, a manutenção dos testículos a uma temperatura de 2 a 3°C abaixo da temperatura corporal torna-se ideal para a eficácia da espermatogênese (Kierszenbaum 2008). O testículo apresenta duas extremidades, uma superior e uma inferior, duas margens laterais e duas superfícies, uma anterior e uma posterior, coberta pelo epidídimo (Favorito and Sampaio 2014).

Histologicamente, este órgão é envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea, que emite septos para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, que o divide em 250 - 300 compartimentos piramidais,

intercomunicantes, que constituem os lóbulos do testículo humano (Kierszenbaum 2008). Cada lóbulo é ocupado por um a quatro túbulos seminíferos contorcidos. Os túbulos seminíferos se comunicam com a rede testicular através de ductos curtos, denominados túbulos retos. Da rede testicular partem os ductos eferentes, que se fundem com a cabeça do epidídimo (Figura 3) (Gardner, Gray et al. 1972).

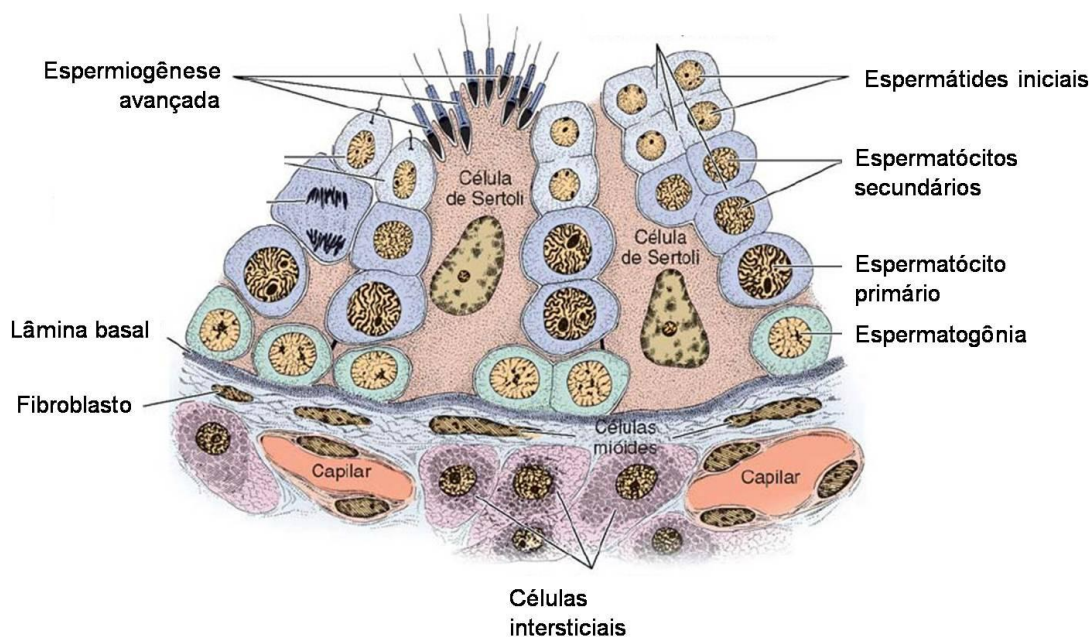
Figura 3 - Corte esquemático mostrando os lóbulos testiculares contendo os túbulos seminíferos



Fonte: Junqueira & Carneiro 2013.

Os túbulos seminíferos são ocos, altamente contorcidos, com 30-70 cm de comprimento e 150-200 μm de diâmetro, em humanos (Russell, Ettlin et al. 1990). Estes se alojam dentro de um tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos, canais linfáticos, nervos, células intersticiais (células de Leydig) e uma população celular variável, constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell, Ettlin et al. 1990, Setchell 1991). O túbulo seminífero consiste em um lúmen central revestido por um epitélio especializado contendo duas populações distintas de células: as células de Sertoli e as células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) (Figura 4) (Griswold 2016).

Figura 4 – Corte esquemático contendo o túbulo seminífero e o tecido conjuntivo frouxo



Fonte: Junqueira & Carneiro 2013.

As células de Leydig, sob estímulo do hormônio luteinizante (LH) secretado pela hipófise, são responsáveis pela produção de testosterona e estradiol nos testículos. Estas células ocupam a maior parte do espaço entre os túbulos seminíferos (Davidson, Millar et al. 2015). Com o início da puberdade, o aumento da secreção de gonadotrofinas induz a produção de testosterona, que resulta na maturação das células dos túbulos seminíferos e na produção de espermatozoides (Grinspon, Habib et al. 2016).

O epitélio seminífero é circundado por uma lâmina basal e por uma bainha de tecido conjuntivo, constituída principalmente por delicados feixes entrelaçados de fibras de colágeno tipo I, várias camadas de fibroblastos e células mióides contráteis (Holstein, Maekawa et al. 1996). As células mióides contráteis são responsáveis pela contração do túbulo, propulsão do fluido testicular contendo espermatozoides e liberação destes durante a espermição (Losinno, Sorrivas et al. 2016). A contração das células mióides peritubulares é regulada pela ação direta da angiotensina II, através de receptores específicos encontrados nestas células (Rossi, Ferraresi et al. 2002).

As células de Sertoli são fundamentais para a eficiência do desenvolvimento e da manutenção da espermatogênese. A estrutura destas células, as junções especializadas entre elas e as células germinativas vizinhas criam um microambiente sofisticado que proporciona a captura dos nutrientes necessários para o desenvolvimento completo das células germinativas e o suprimento dos espermatozoides em desenvolvimento (Maekawa, Kamimura et al. 1996). As células de Sertoli secretam o fluído testicular, através do transporte de água do espaço intersticial para o lúmen, sendo este fluído utilizado no transporte dos espermatozoides, do testículo para o epidídimo (Setchell, Scott et al. 1969). Além disso, oferecem suporte físico para as células da linhagem espermatogênica e proteção contra agentes externos (Mital, Hinton et al. 2011, Rato, Alves et al. 2012).

As células da linhagem espermatogênica são responsáveis pela produção das células reprodutoras masculinas, os espermatozoides. Este processo fisiológico é denominado espermatogênese (Russell, Saxena et al. 1989). O volume dos testículos, palpados clinicamente, está relacionado à atividade funcional da espermatogênese, de modo que durante a puberdade esse volume alcança maior proporcionalidade (Bronson 2011). O testículo ainda pode ser dividido funcionalmente em dois compartimentos: o compartimento intertubular ou intersticial e o compartimento tubular, constituído pelos túbulos seminíferos (Russell, Ettlin et al. 1990). Sabe-se que a maior parte do parênquima testicular (95%), na maioria dos mamíferos, é preenchido pelo compartimento tubular (Morais, Balarini et al. 2014).

1.5 Espermatogênese

Todo o processo espermatogênico ocorre ao longo de aproximadamente 10 semanas em humanos (Russell, Saxena et al., 1989). Este processo pode ser dividido didaticamente em três fases, de acordo com as diferentes características morfológicas e funcionais (Russell, Ettlin et al. 1990) (Figura 5):

(a) Fase proliferativa

A espermatogênese inicia-se com as espermatogônias, células germinativas primitivas, situadas próximas a lâmina basal do epitélio e que apresentam 46 cromossomos e 4N de DNA (tetraploide). Durante a puberdade, as espermatogônias

começam a se dividir por mitose e a produzir sucessivas gerações de células. Essas células-filhas podem continuar se dividindo, mantendo-se como células-tronco de outras espermatogônias, sendo estas denominadas espermatogônias do tipo A; ou podem se diferenciar durante sucessivos ciclos de divisão e se tornarem espermatogônias do tipo B. As espermatogônias do tipo B são células progenitoras que se diferenciam em espermatócitos primários, sendo estes as maiores células da linhagem espermatogênica e que apresentam 46 cromossomos e 4N de DNA.

(b) Fase meiótica

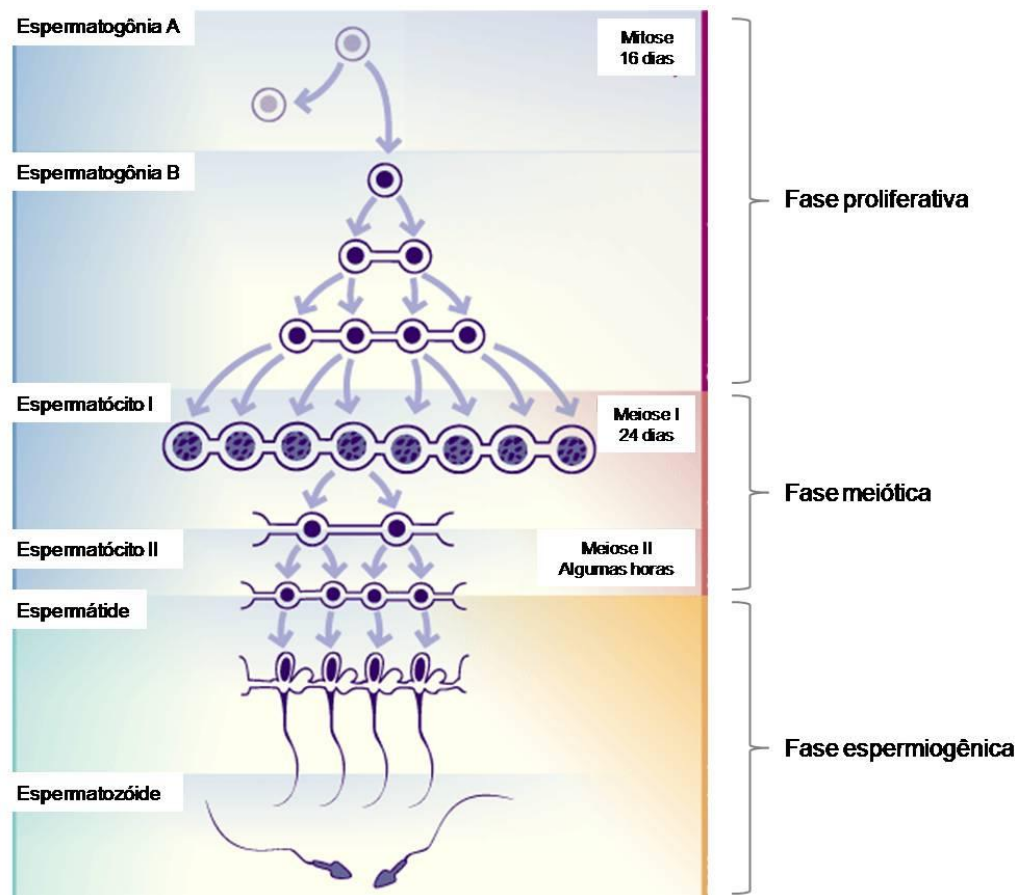
Os espermatócitos primários entram na primeira divisão meiótica, resultando em duas células menores chamadas de espermatócitos secundários, que possuem 23 cromossomos e 2N de DNA (diploide). Os espermatócitos secundários entram na segunda divisão meiótica, originando duas células denominadas espermátides, que contêm 23 cromossomos e 1N de DNA (haploide).

(c) Fase de diferenciação ou espermiogênica

As espermátides arredondadas passam por drásticas alterações morfológicas e funcionais, como a formação do acrossoma e do flagelo, e a condensação nuclear, resultando em células altamente especializadas, os espermatozoides maduros.

No interior dos túbulos seminíferos, as células germinativas estão organizadas em condições celulares distintas, denominadas estádios (Berndtson 1977). À medida que as células da linhagem espermatogênica são diferenciadas, suas sucessoras deslocam-se em direção ao lúmen do túbulo seminífero. Desta maneira, os espermatozoides ao serem formados são projetados para o lúmen, seguindo em direção aos túbulos retos (Amann and Schanbacher 1983). A integridade funcional da membrana basal e a interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente as células de Sertoli e as células de Leydig, são fatores fundamentais para que a espermatogênese ocorra de maneira adequada (Iliadou, Tsametis et al. 2015, Potter and DeFalco 2017).

Figura 5 - Espermatogênese (fase proliferativa, fase meiótica e fase espermiogênica)



Fonte: Junqueira & Carneiro 2013.

1.6 Ontogênese dos testículos e da próstata

O desenvolvimento do sistema reprodutor masculino inicia-se com a determinação do sexo e a formação dos testículos. Esta gônada programa o desenvolvimento dos órgãos genitais internos e externos, durante a janela de programação da masculinização na vida pré-natal, e posteriormente masculiniza o cérebro. O eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal amadurece antes do início da puberdade e passa a controlar a espermatogênese até a idade adulta (Picut, Ziejewski et al. 2018).

A sequência de eventos que ocorre durante o desenvolvimento testicular é morfológicamente igual em todos os mamíferos, porém com diferenças temporais significativas, eventos que ocorrem em dias nos ratos, nos humanos ocorrem em

anos. Sendo assim, a maturação dos testículos, tanto em ratos quanto em humanos, ocorre na seguinte ordem cronológica: (i) formação pré-natal do cordão espermático contendo gonócitos (precursores das células germinativas masculinas); (ii) transformação dos gonócitos em espermatogônias; (iii) proliferação das células de Sertoli e espermatogônias; (iv) maturação das células de Sertoli e formação da barreira hemato-testicular; (v) desenvolvimento dos espermatócitos (meiose); e (vi) espermiogênese (formação das espermátides redondas e alongadas) (Picut, Ziejewski et al. 2018).

No homem, a janela de programação da masculinização ocorre com 8 semanas de gestação (SG) e no rato de 14.5 - 15.5 dias de gestação (DG) (Scott, Mason et al. 2009, Picut, Ziejewski et al. 2018). Os componentes do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, tanto no homem quanto no rato, estão presentes na vida pré-natal. Porém ao contrário do rato, o desenvolvimento inicial das gônadas pré-natal em humanos é dependente de gonadotrofinas placentárias e hipofisárias (Picut, Ziejewski et al. 2018). O homem apresenta um período quiescente, antes do período pré-púbere, no qual ocorre uma interrupção da secreção de gonadotrofinas, caracterizado pela escassez de células de Sertoli e diminuição da proliferação de espermatogônias. Além disso, no homem, a maturação dos testículos ocorre num padrão lobular, não uniforme, enquanto que no rato a maturação testicular é uniforme e não há quiescência. O desenvolvimento completo da próstata e das vesículas seminais, a deiscência inguino-escrotal do testículo e o surgimento das espermatogônias ocorrem durante a vida pré-natal no homem, porém são eventos pós-natais no rato (Picut, Ziejewski et al. 2018).

Devido às diferenças temporais no desenvolvimento, as janelas de oportunidades, períodos em que o sistema reprodutor masculino é mais vulnerável a um determinado insulto, variam entre as espécies. Estas janelas são: (i) o período de proliferação dos gonócitos (14,5 - 18 DG em ratos, 7 SG - nascimento em humanos); (ii) o período de transformação dos gonócitos (0 - 9 dias pós-natal - DPN em ratos, 22 SG - 9 meses de idade em humanos); (iii) janela de programação da masculinização (15,5 - 17,5 DG em ratos, 9 - 14 SG em humanos); (iv) masculinização cerebral (18 DG - 10 DPN em ratos, perinatal em humanos); (v) mini-puberdade (0 - 6 h em ratos, 3 - 6 meses em humanos) e; (vi) período de proliferação das células de Sertoli e das espermatogônias (5 - 15 DPN em ratos, 9 - 11 anos em humanos) (Picut, Ziejewski et al. 2018).

Diante das diferenças temporais na sequência de eventos (no homem e no rato), as principais alterações histológicas e hormonais nos testículos e na próstata durante os estádios de desenvolvimento pré e pós-natais serão abordadas a seguir.

1.6.1 Testículo

1.6.1.1 Humano

No homem, o testículo torna-se um órgão endocrinologicamente ativo no primeiro trimestre de gestação e as células de Leydig já são observadas na 6ª SG. De 7 a 8 SG, o gene *sex-determining region Y* (SRY) inicia o desenvolvimento das células de Sertoli, ocorre a diferenciação sexual, o surgimento do cordão espermático contendo os gonócitos e inicia-se a produção de testosterona (Picut, Ziejewski et al. 2018). O pico de testosterona fetal ocorre em torno de 11 a 14 SG e diminui em torno de 17 semanas (Scott, Mason et al. 2009).

A proliferação das espermatogônias e das células de Sertoli ocorre aproximadamente dos 9 aos 11 anos de idade, seguida da maturação das células de Sertoli e da formação da barreira hemato-testicular, que ocorre dos 12 aos 14 anos. O número máximo de células de Sertoli é observado dos 12 aos 13 anos, com aproximadamente 1800×10^6 / testículos (Cortes, Muller et al. 1987). O aumento da produção de testosterona ocorre durante a puberdade, dos 12 aos 14 anos, semelhante ao que ocorre em ratos durante o seu período pré-púbere. O aumento deste hormônio ocorre em decorrência do aumento da população de células de Leydig maduras. Os níveis de testosterona de um adulto são alcançados aproximadamente 2 anos após o início da puberdade, e dentro de 3 anos, o volume testicular de um adulto é observado (Picut, Ziejewski et al. 2018).

1.6.1.2 Rato

O desenvolvimento pré-natal inicia-se quando o gene SRY determina o sexo, por volta dos 12 DG. Aos 13,5 DG já se observam os testículos contendo túbulos seminíferos rudimentares (Picut, Ziejewski et al. 2018). Durante a gestação, dentro

dos túbulos seminíferos, os gonócitos e as células de Sertoli se proliferam ativamente, com exceção de um período de suspensão da atividade mitótica nos gonócitos, dos 18 DG até o nascimento ou poucos dias depois (Picut, Remick et al. 2015). Este período não é observado nos gonócitos humanos. As células de Leydig começam a produzir testosterona por volta de 14,5 a 15,5 DG (Scott, Mason et al. 2009). O pico de produção deste hormônio ocorre de 18 a 19 DG e declina antes do nascimento (Scott, Mason et al. 2009, Picut, Ziejewski et al. 2018).

O período entre 5 - 36 DPN corresponde ao período crítico de proliferação e maturação das células de Sertoli e das células germinativas (Rodriguez-Gonzalez, Viguera-Villasenor et al. 2012). Durante a puberdade (33 - 50 DPN), as células intersticiais são as últimas a completarem a diferenciação celular, originando as células de Leydig maduras. Estas células são maiores, apresentam mais organelas para secreção de testosterona e mais receptores de LH (Mendis-Handagama and Ariyaratne 2001, Teerds and Huhtaniemi 2015).

1.6.2 Próstata

1.6.2.1 Humano

A próstata humana surge como um órgão de lóbulo único, dividido em zonas histologicamente distintas. No homem, a próstata se desenvolve mais rápido que no rato e durante a vida pré-natal já produz secreção. O desenvolvimento inicial da próstata ocorre de 10 a 12 SG, os grânulos secretores das células epiteliais surgem de 14 a 18 SG, sendo a secreção mediada por andrógenos (Scott, Mason et al. 2009, Prins and Lindgren 2015). Antes de 20 SG, a próstata do feto apresenta cinco "lóbulos" anatômicos. Posteriormente dois desses "lóbulos" regridem e passam a existir três "lóbulos", conhecidos como zonas: zona periférica, zona central e zona de transição (Prins and Lindgren 2015, Picut, Ziejewski et al. 2018).

Ao nascimento, a próstata já está bem desenvolvida e a glândula permanece adormecida até a puberdade, quando ocorre um rápido crescimento devido à elevada produção de testosterona. A secreção da próstata aumenta no período pós-

natal. A diferenciação do epitélio das zonas prostáticas também ocorre durante a puberdade, de maneira que a zona central e a zona periférica tornam-se histologicamente distintas e heterogêneas (Prins and Lindgren 2015).

1.6.2.2 Rato

A formação da próstata no rato começa aos 18,5 DG, quando as células prostáticas começam a se desenvolver a partir do seio urogenital (Picut, Ziejewski et al. 2018). A próstata passa por três grandes modificações durante o seu desenvolvimento: o estágio broto, o estágio broto-tubular e o estágio ácino-tubular. As duas primeiras etapas ocorrem inteiramente durante o período pré-natal, enquanto que o estágio final ácino-tubular começa no período pré-natal e termina no período pós-natal, quando ocorre a maturação histológica aos 28 DPN (Picut and Remick 2016).

Ao nascimento, a próstata está no estágio ácino-tubular de desenvolvimento. A atividade secretora e o aumento de tamanho continuam a progredir até atingir os níveis de adulto, por volta de 43 - 46 DPN (Marty, Chapin et al. 2003). O desenvolvimento prostático progride em paralelo ao aumento de testosterona durante o período pós-natal. Em roedores assim como em humanos, importantes eventos pós-natais têm impacto no desenvolvimento final da próstata. Este desenvolvimento inclui crescimento epitelial, ramificação e canalização. A canalização ocorre simultaneamente com a diferenciação do epitélio (Picut, Ziejewski et al. 2018).

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da administração de dieta hiperlipídica durante a gestação/lactação e ao longo do período pós-natal no perfil lipídico, no perfil glicêmico, na morfologia da próstata ventral, na morfologia e na função testicular de ratos Wistar aos 4 meses de idade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

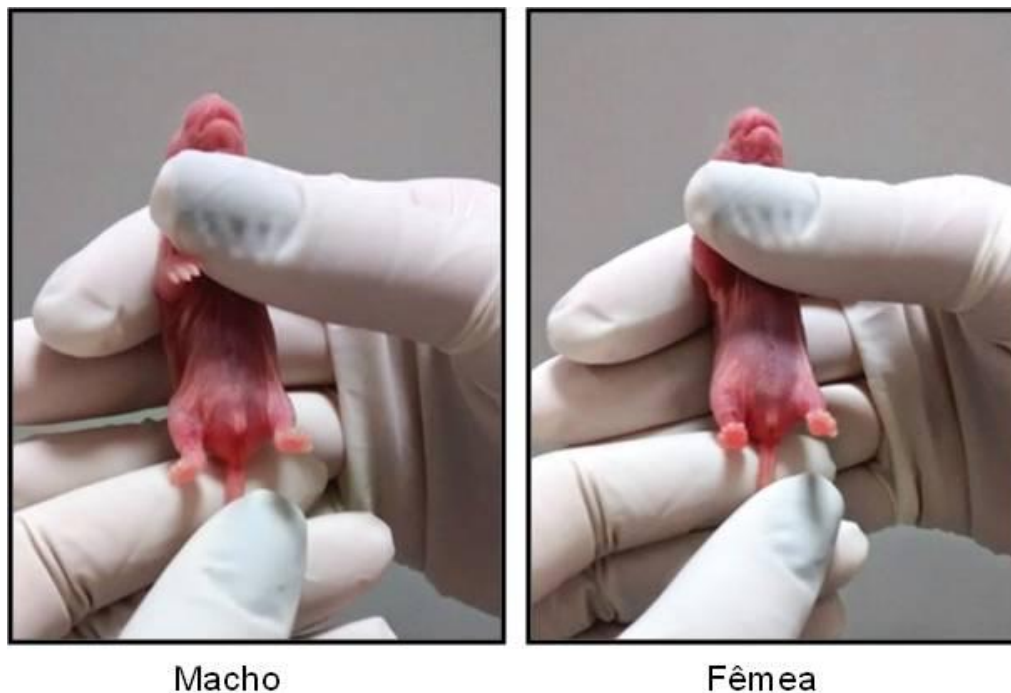
Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NIH Nº. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo Nº 0072014), e seguiu as orientações propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos Wistar provenientes da colônia mantida no biotério da Unidade de Pesquisa Urogenital, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60 \pm 10\%$), com ciclo de luz controlado (12-12h claro/escuro) e ciclo de exaustão de ar (15 min./hora). Todos os animais do estudo receberam água e ração *ad libitum*.

Fêmeas núlparas com 3 meses de idade foram colocadas para acasalar. Durante o período de acasalamento, as fêmeas foram mantidas com os machos durante 7 dias, e diariamente foi realizado o esfregaço vaginal para verificar a presença do plug vaginal. Após a confirmação da gestação (plug vaginal), as fêmeas foram acondicionadas em gaiolas individuais e divididas em 2 grupos nutricionais: grupo controle (C, n=10) e grupo *high-fat* (HF, n=10). Os animais do grupo C receberam dieta normolipídica (17% lipídios/Kg dieta) e o grupo HF recebeu dieta hiperlipídica (49% lipídios/Kg dieta), durante a gestação e a lactação.

Ao nascimento, o sexo dos filhotes foi identificado através da distância anogenital e os mesmos foram pesados separadamente (Figura 6). O tamanho da ninhada foi estipulado em 6 animais, sendo 3 fêmeas e 3 machos, a fim de padronizar o processo de lactação (Langley-Evans, Gardner et al. 1996). Após o desmame, as fêmeas (progenitoras e prole) foram eutanasiadas e os filhotes machos foram mantidos para formação dos grupos experimentais, que foram acompanhados até os 4 meses de idade.

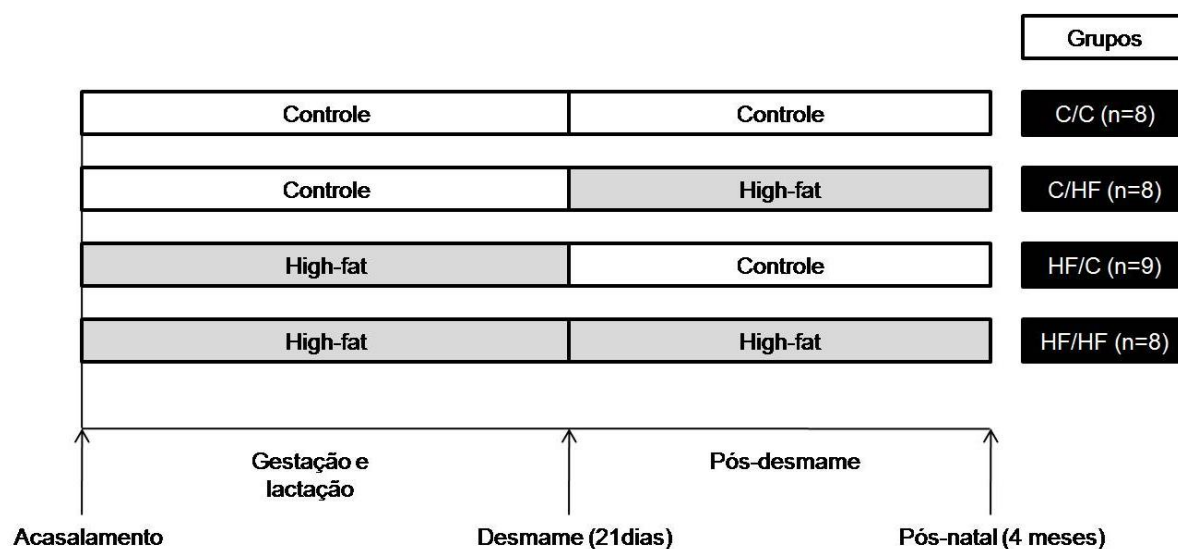
Figura 6 – Identificação dos gêneros dos filhotes ao nascimento



Fonte: A autora, 2017.

Os grupos de estudo foram: C/C (filhotes oriundos de mães que receberam dieta controle durante a gestação e a lactação e permaneceram com a mesma dieta após o desmame, n=8); C/HF (filhotes oriundos de mães que receberam dieta controle durante a gestação e a lactação e consumiram dieta *high-fat* após o desmame, n=8); HF/C (filhotes oriundos de mães que receberam dieta *high-fat* durante a gestação e a lactação e consumiram a dieta controle após o desmame, n=9) e HF/HF (filhotes oriundos de mães que receberam dieta *high-fat* durante a gestação e a lactação e permaneceram com a mesma dieta após o desmame, n=8), configurando 4 grupos de estudo (Figura 7).

Figura 7 – Esquema representativo da formação dos diferentes grupos experimentais



Legenda: Os grupos C/C, C/HF, HF/C e HF/HF foram eutanasiados aos 4 meses de idade.

Fonte: A autora, 2017.

O conteúdo de vitaminas e minerais foi o mesmo em todas as dietas e seguiu as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93G) (gestação, lactação e desmame - até 3 meses de idade) e AIN-93M (3 - 4 meses de idade) (Reeves, Nielsen et al. 1993). As dietas foram confeccionadas pela empresa Pragsoluções e a composição encontra-se demonstrada na tabela 1. O óleo de soja foi utilizado nas dietas experimentais para evitar a deficiência de ácidos graxos essenciais, sendo as dietas hiperlipídicas acrescidas de banha de porco.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais. Mix de minerais* e mix de vitaminas** segundo a recomendação da AIN-93G e AIN-93M (Reeves, Nielsen et al. 1993)

Ingredientes (g/kg)	AIN-93G		AIN-93M	
	C	HF	C	HF
Amido de milho	539,49	299,49	465,70	192,60
Caseína	190,00	230,00	140,00	175,00
Sacarose	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de soja	70,00	70,00	40,00	40,00
Banha de porco	0,00	200,00	0,00	238,00
Fibra	50,00	50,00	50,00	50,00
L-cistina	3,00	3,00	1,80	1,80
Cloretocolina	2,50	2,50	2,50	2,50
BHT	0,014	0,014	0,008	0,060
Mix de minerais*	35,00	35,00	35,00	35,00
Mix de vitaminas**	10,00	10,00	10,00	10,00
TOTAL (g)	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
Energia (Kcal/Kg)	3960,0	4960,0	3190,0	4380,0
Hidrato de carbono (%)	64,00	32,00	76,00	36,00
Proteína (%)	19,00	19,00	14,00	14,00
Lípídeo (%)	17,00	49,00	10,00	50,00

Legenda: C (controle) e HF (*high-fat*).

Fonte: A autora, 2017.

3.2 Biometria e ingestão alimentar dos animais

Ao longo do experimento, a massa corporal dos animais foi aferida semanalmente, por meio de balança digital de precisão 0,1g (Urano). A ingestão alimentar foi estimada diariamente, mediante a subtração entre a quantidade total de ração ofertada e a quantidade remanescente na caixa no dia seguinte, no mesmo horário. Em caso de sobra, devido ao alto teor lipídico, a ração hiperlipídica era desprezada. Posteriormente, a ingestão energética da prole foi calculada com base

no valor energético das dietas. A eficiência alimentar da prole foi calculada como ganho de massa corporal (g) / consumo alimentar (KJ) ($\times 100$).

3.3 Pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica da prole foi aferida semanalmente, dos 3 meses aos 4 meses de idade. Previamente, foi realizado um período de adaptação ao procedimento, dos 2 aos 3 meses de idade. As aferições foram realizadas utilizando o método não-invasivo de pletismografia da artéria caudal (Pletismógrafo, Insight, São Paulo, Brasil) (Figura 8). Anteriormente a cada aferição, os animais foram aquecidos em caixa de acrílico por 10 minutos para dilatação da artéria caudal. O procedimento foi realizado sempre no mesmo horário (entre 18 e 20 horas), sendo feitas 3 aferições para cada animal. O resultado utilizado foi a média das 3 aferições, registrada em mmHg.

Figura 8 - Aferição da pressão arterial sistólica



Legenda: Animal contido para aferição da pressão arterial sistólica, a partir do método de pletismografia da artéria caudal.

Fonte: A autora, 2017.

3.4 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

As progenitoras foram submetidas ao TOTG em 2 momentos: antes do acasalamento e após o desmame. Na prole, o teste foi realizado aos 4 meses de idade, antes da eutanásia. Para a realização do TOTG, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e foi administrada uma quantidade conhecida (2g/Kg de massa corporal) de soro glicosado hipertônico (glicose à 50%) por gavagem, com cânula apropriada para ratos. O sangue foi coletado da veia da cauda, nos tempos 0 (antes da administração da glicose), 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da mesma. A determinação dos níveis de glicose no sangue (em mg/dL) foi realizada com o auxílio de glicosímetro (Accu-Chek Performa, Roche, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 9). Para a avaliação do comportamento glicêmico foi considerada a área sob a curva, mensurada a partir da utilização do *software* Prisma (versão 5.03 para Windows, *software* GraphPad, San Diego, CA, EUA) (Gallou-Kabani, Vige et al. 2007a).

Figura 9 - Imagem mostrando o passo-a-passo do TOTG



Legenda: (a) – corte na porção distal da cauda do rato para coleta de sangue; (b) – aferição da glicemia no tempo 0; (c) – gavagem do animal com soro glicosado para a determinação dos níveis glicêmicos nos diferentes tempos.

Fonte: A autora, 2017.

3.5 Eutanásia dos animais

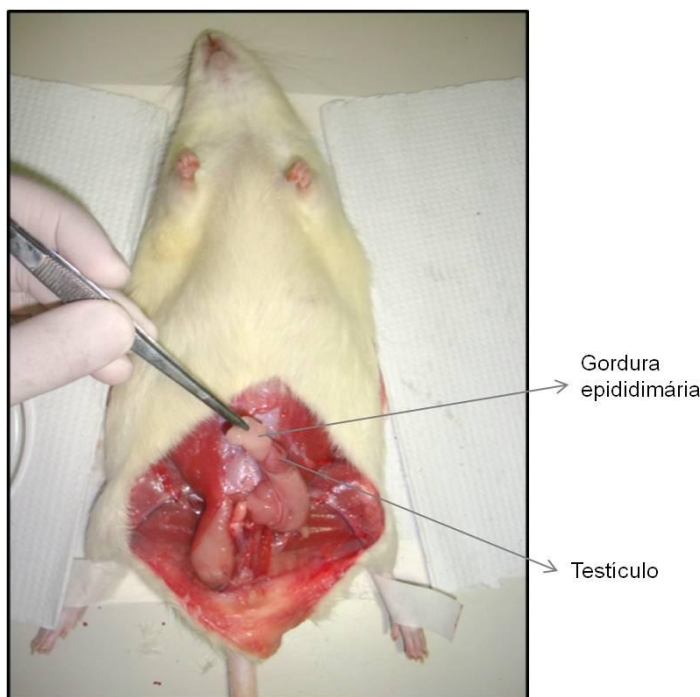
Os animais dos grupos experimentais foram eutanasiados aos 4 meses de idade. Após 12 horas de jejum (8 p.m. – 8 a.m.) eles foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂). O tórax foi aberto e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca (átrio direito) e a glicemia foi aferida imediatamente utilizando o glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brasil). Parte do sangue foi centrifugado à 2260 força centrífuga relativa (FCR × g) por 5 min e armazenado à -80°C para avaliação dos perfis glicêmico, lipídico e dos níveis hormonais. Posteriormente, a próstata, os testículos e os depósitos de gordura epididimária foram dissecados (Figura 10 e 11), pesados e submetidos a diferentes métodos de fixação. Os depósitos de gordura epididimária foram fixados em formaldeído a 4% (1,27 mol/L formaldeído em 0,1M tampão fosfato, pH 7,2). Parte dos testículos foi fixada em nitrogênio líquido para análises moleculares e outra parte foi fixada em solução de bouin e formalina tamponada, para microscopia ótica. A próstata foi fixada em formalina tamponada para microscopia ótica.

Figura 10 – Dissecção da próstata aos 4 meses de idade



Fonte: A autora, 2017.

Figura 11 – Dissecção dos testículos e dos depósitos de gordura epididimária aos 4 meses de idade



Fonte: A autora, 2017.

3.6 Análise bioquímica sérica

O soro foi separado por centrifugação à $2260 \text{ FCR} \times g$ por 5 min em centrífuga Excelsa® II modelo 206BL (Fanem, São Paulo, Brasil), à temperatura ambiente e armazenado à -80°C até a realização das análises bioquímicas. As dosagens séricas de insulina e testosterona foram analisadas pelo método ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) a partir dos kits comercialmente disponíveis: insulina para ratos/camundongos (Millipore® - Cat. EZRMI-13 k – St Charles, Missouri, EUA) e testosterona (Uscn® - Cat. E90458Ge – Wuhan, China). As amostras foram analisadas em duplicata, com um coeficiente de variação de 1,4%. Para avaliar a resistência à insulina o índice insulina/glicose (I/G) foi calculado (Deisl, Anderegg et al. 2016).

O perfil lipídico (colesterol total - CT, lipoproteínas de alta densidade - HDL-c e TAG) foi determinado por meio de espectrofotometria, ensaio colorimétrico, a partir de kit disponível comercialmente (BioSystems® - Cat. 11506 – Barcelona, Espanha).

3.7 Avaliações dos espermatozoides

No momento da eutanásia, a cauda do epidídimo foi seccionada (5 cortes), para coleta dos espermatozoides. Esta foi submetida a 5mL de solução tampão fosfato salino (PBS) com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) (A9647, Sigma, Frederick, EUA) à 37°C e posteriormente foi levemente agitada para difusão dos espermatozoides, do interior do tecido para o meio líquido (Motrich, Ponce et al. 2007) (Figura 12). Esta solução, denominada de solução espermática, foi utilizada para todas as análises espermáticas e todo o material auxiliar utilizado nessas análises foi mantido à 37°C.

Figura 12 – Secção da cauda do epidídimo para preparo da solução espermática



Fonte: A autora, 2017.

3.7.1 Concentração dos espermatozoides

Para a realização desta análise foram utilizados 60µl da solução espermática, diluídos em uma nova solução contendo PBS com 0,5% de BSA, de 1 a 3 vezes conforme a sua turbidez, a fim de facilitar a contagem dos espermatozoides. Esta

diluição foi anotada e utilizada no cálculo final para determinação da concentração de espermatozoides (Motrich, Ponce et al. 2007).

Após a diluição, 10 µl foram transferidos para uma câmara de Neubauer espelhada e coberta com lamínula. Esta amostra foi visualizada em contraste de fase e gravada em vídeo por uma câmera Basler (Vision TechnologieTM, Ahrensburg, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz H550S (Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 100x. A contagem dos espermatozoides foi realizada posteriormente, nos arquivos de vídeo gerados, onde foi contabilizado o número de espermatozoides em 5 quadrantes da câmara de Neubauer (gravados separadamente), perfazendo um volume total de 2×10^{-5} mL. Este valor encontrado foi corrigido para a diluição da solução espermática e convertido para espermatozoides / mL, unidade em que os resultados foram expressos (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

3.7.2 Motilidade dos espermatozoides

A motilidade dos espermatozoides foi determinada como porcentagem de células com movimento, sendo ele progressivo ou não (Motrich, Ponce et al. 2007). Esta análise foi realizada com os mesmos arquivos de vídeo utilizados para a observação da concentração de espermatozoides. Nestas imagens foi contado o número de células imóveis, e subtraído do número total de espermatozoides em cada campo. O resultado dessa subtração foi dividido pelo número total de espermatozoides e multiplicado por 100 para determinação da porcentagem de espermatozoides móveis (Ribeiro, Milhomem et al. 2014).

3.7.3 Viabilidade dos espermatozoides

A viabilidade dos espermatozoides foi determinada através do teste hiposmótico, que avalia a integridade funcional da membrana plasmática desta célula, e foram analisados 200 espermatozoides / animal (Jeyendran, Van der Ven et al. 1984, Ribeiro, Milhomem et al. 2014). A solução espermática foi diluída na

proporção 1:3 em uma solução aquosa contendo citrato de sódio à 0,74% e frutose à 1,35%, de maneira que esta solução tenha uma osmolaridade de 100 mOsm/L menor que a osmolaridade do meio intracelular e portanto considerada hiposmótica. Os espermatozoides foram mantidos nestas condições por 30 minutos à temperatura de 37°C. Após este período, 10 µl da solução foram utilizados para confecção de lâmina histológica. Esta amostra foi observada em microscópio de luz BH-2 (Olympus, Tóquio, Japão), com aumento de 200x.

Os espermatozoides foram considerados viáveis quando apresentaram dobramento de cauda. Tal alteração morfológica é verificada devido a entrada de líquido para o meio intra-celular (mais concentrado), de forma que ocorre o ingurgitamento do tecido e o dobramento da cauda. O resultado foi expresso pela porcentagem de espermatozoides viáveis, que exibiram dobramento de cauda, em relação ao número total de células analisadas.

3.8 Índice gonadossomático (IGS)

Com base na massa corporal e na massa testicular foi obtido o IGS, parâmetro utilizado para avaliar a maturação sexual e estimar o período reprodutivo (Uno, Kato et al. 2014). O IGS foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = (\text{MG} / \text{MC}) \times 100$$

Onde:

MG = massa total das gônadas

MC = massa corporal

3.9 Microscopia de luz

3.9.1 Análises histológicas

Após a eutanásia, os testículos foram dissecados e pesados. Posteriormente, a extremidade capitata do órgão foi removida, para melhor impregnação pelo fixador, e a porção remanescente do testículo foi fixada em solução de Bouin por 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi clivado em fatias de aproximadamente 2mm de espessura e imerso em formaldeído a 4% (1.27mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) durante 48 horas à temperatura ambiente. A próstata inteira (glândula de coagulação, lobos dorsal, lateral e ventral) foi dissecada e fixada em formaldeído a 4% durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a próstata ventral foi dissecada, separada dos demais lobos, o material foi clivado e seus fragmentos foram imersos em formaldeído a 4% durante 48 horas à temperatura ambiente.

Posteriormente, os fragmentos testiculares e prostáticos foram desidratados em alcoóis com concentrações crescentes até alcançar o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Isofar, 740, CAS 8002 -74 -2, RJ, Brasil). Os materiais foram seccionados com 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE). Uma parte dos cortes de próstata foi utilizada para a realização da imunohistoquímica para imunomarcção de α -actina para músculo liso.

3.9.2 Imunohistoquímica

Após a dissecação, a próstata foi submetida ao procedimento histológico de rotina e foi seccionada com 5µm de espessura. Foi realizada a desparafinização e a recuperação antigênica com tripsina por 15 minutos à 37°C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol durante 15 minutos e as reações inespecíficas foram inibidas com

PBS / BSA 3% durante 10 minutos. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal *anti - Alpha Smooth Muscle Actin* (08-0106, Invitrogen, Camarillo, EUA) durante 12 horas (*overnight*). Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (K0679; Universal DakoCytomation LSAB Kit, Peroxidase, Glostrup, Dinamarca) e a reação foi amplificada com o sistema biotina-estreptavidina (Kit Invitrogen, Ref: 859643, Frederick, EUA). A imunomarcação foi visualizada após a incubação das secções com 3,3 diaminobenzidina tetracloreto-DAB (Ref: 859643, Invitrogen, Frederick, EUA) e contra-coradas com Hematoxilina de Mayer. Simultaneamente, foram confeccionadas as secções controle negativo, onde o anticorpo primário foi substituído por PBS / BSA 1%.

3.9.3 Avaliações morfométricas

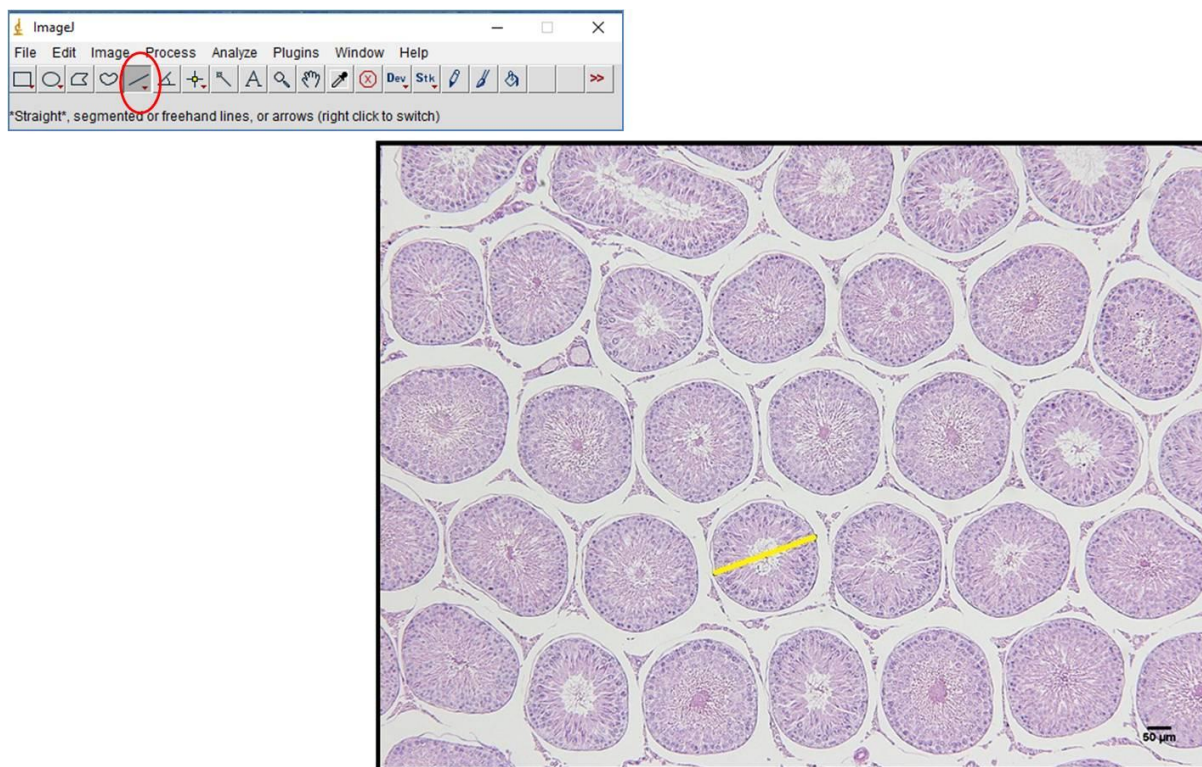
Para a realização das análises morfométricas e quantitativas do testículo e da próstata foi utilizado um sistema de vídeo-microscopia com microscópio de luz Olympus BX51 (Tóquio, Japão) acoplado a uma câmara digital Olympus DP70 (Tóquio, Japão). As imagens foram capturadas com o auxílio do *software* ImageProplus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver spring, MD, EUA). As avaliações quantitativas foram realizadas através do *software* Image J[®], versão 1.44.

3.9.3.1 Testículo

Após a calibração do sistema, para mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foi utilizada a ferramenta "*straight line*". Para avaliar o diâmetro dos túbulos seminíferos, traçou-se uma linha reta que passou pelo centro de cada secção transversal do túbulo seminífero. Para essa análise os túbulos com formato irregular foram excluídos (Ribeiro, De Souza et al. 2013) (Figura 13). Quanto à altura do epitélio seminífero, 3 porções equidistantes de cada secção transversal do túbulo seminífero foram mensuradas e foi determinada a

distância da túnica própria até a célula germinativa interna, excluindo os espermatozoides, sendo a média calculada (Ribeiro, De Souza et al. 2013) (Figura 14). As análises morfométricas foram realizadas com aumento de 100× (diâmetro do túbulo seminífero) e aumento de 200× (altura do epitélio seminífero). Para cada análise, foram avaliados 25 campos / animal.

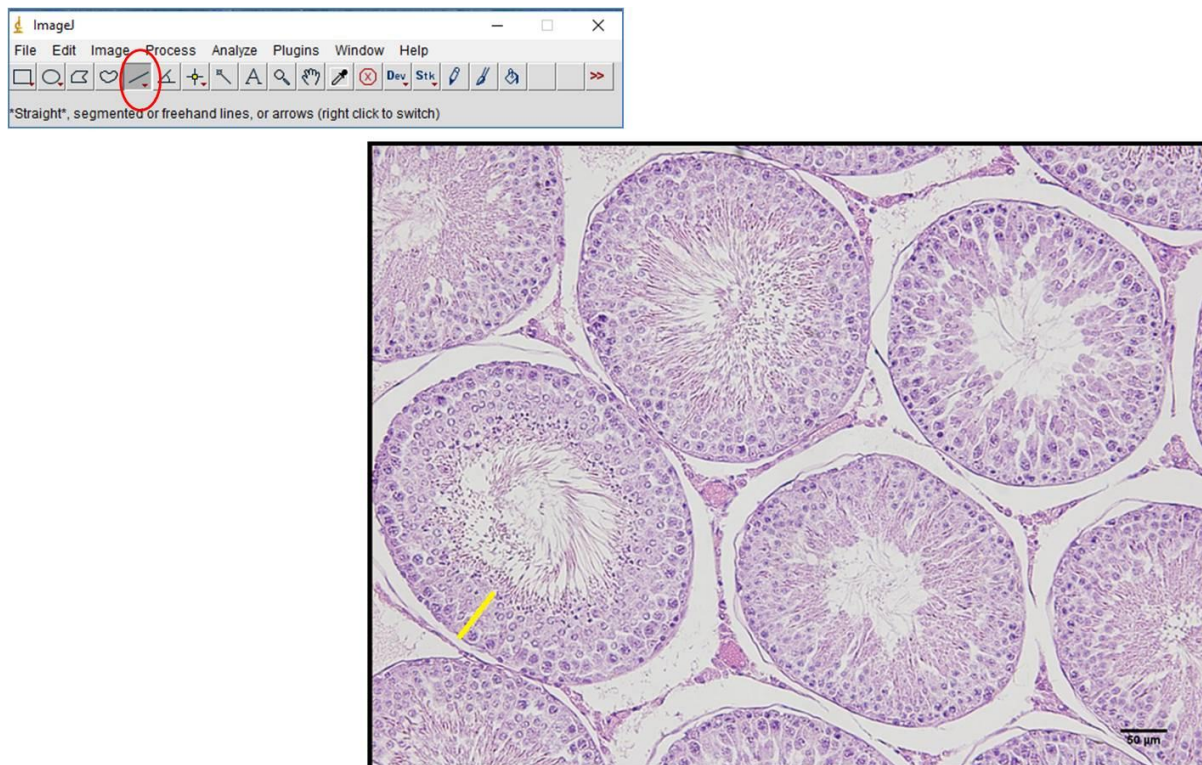
Figura 13 – Mensuração do diâmetro do túbulo seminífero (100×)



Legenda: Aplicabilidade da ferramenta “*straigh line*”, disponível no *software* Image J®, que permite traçar uma linha reta de um pólo ao outro do túbulo seminífero, passando pelo centro.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 14 – Mensuração da altura do epitélio seminífero (200×)

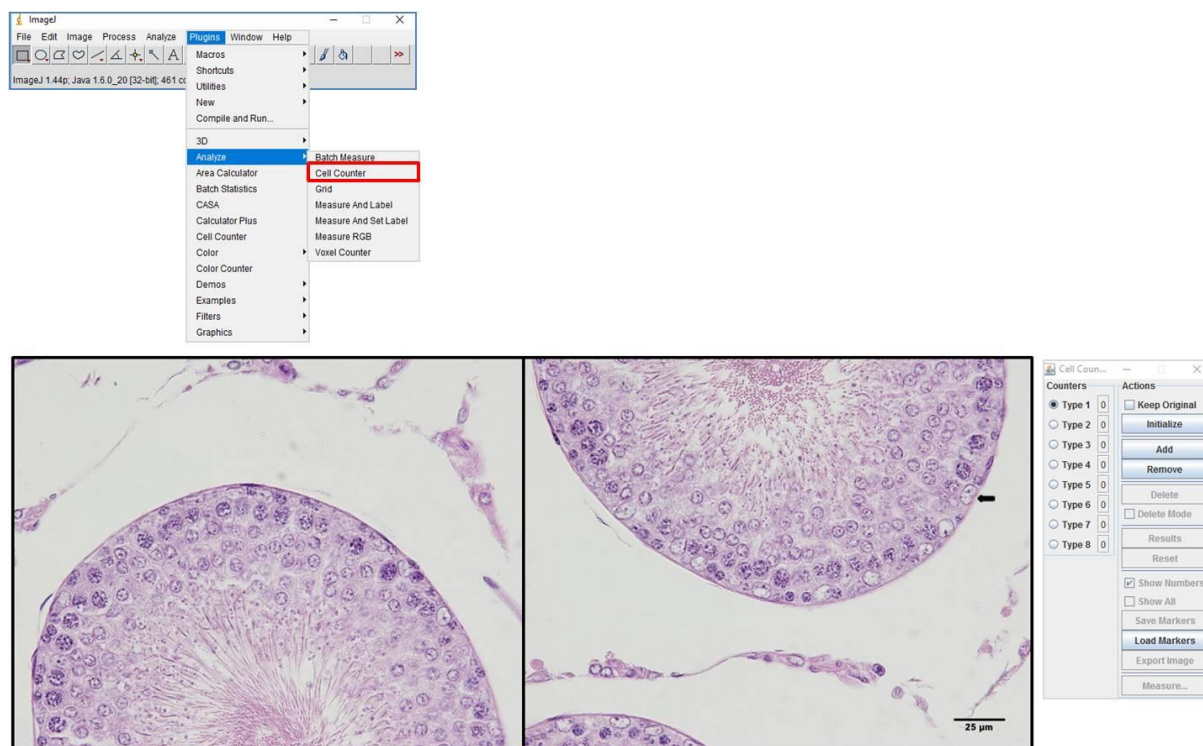


Legenda: Aplicabilidade da ferramenta “*straight line*”, disponível no *software* Image J®, que permite traçar uma linha reta da célula mais basal até a mais próxima do lúmen.

Fonte: A autora, 2017.

A quantificação das células de Sertoli foi realizada com o auxílio da ferramenta “*cell counter*” por contagem direta, com aumento de 600× e imersão em óleo (Figura 15). Quando uma secção transversal do túbulo seminífero não coube num único campo, foram feitas 2 fotomicrografias complementares da mesma secção transversal do túbulo seminífero. Apenas as células de Sertoli com os núcleos visíveis foram contabilizadas (Kotsampasi, Balaskas et al. 2009). Foram avaliadas 30 secções do túbulo seminífero / animal.

Figura 15 – Quantificação das células de Sertoli (600×)

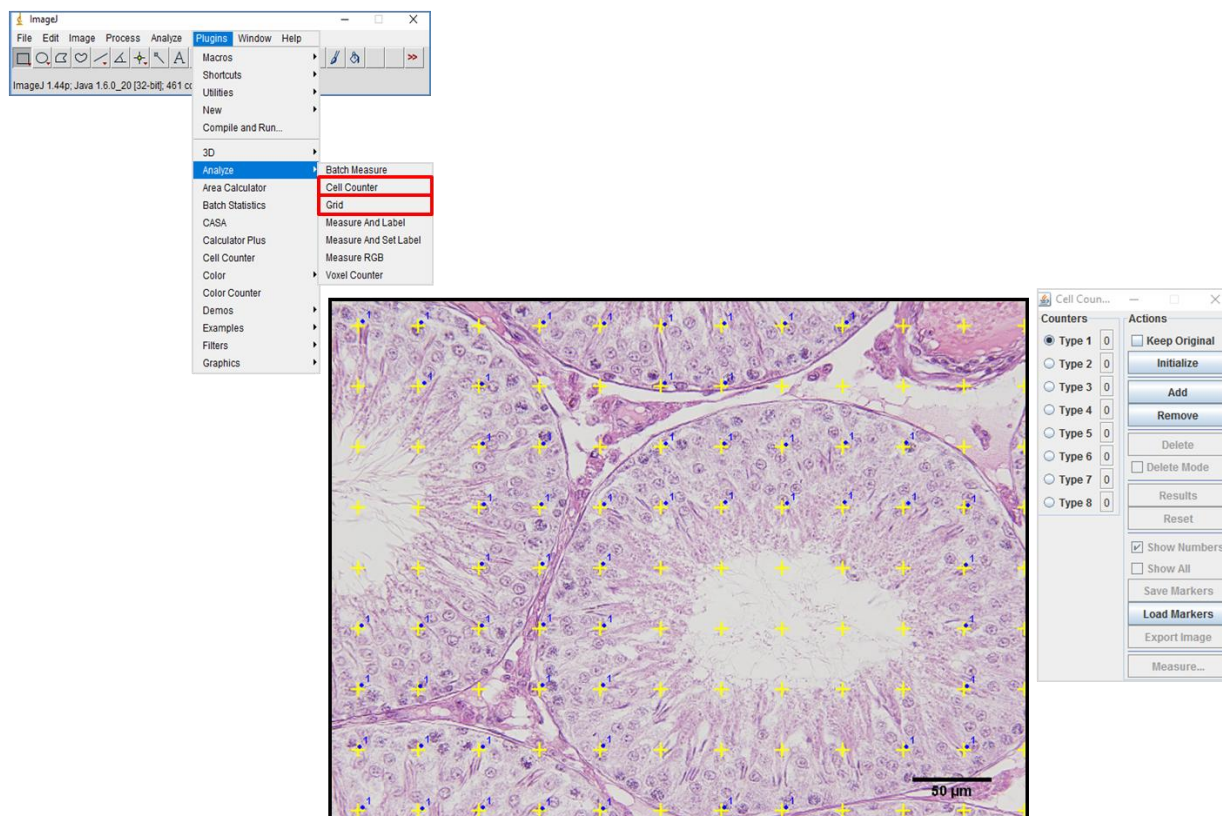


Legenda: A seta evidencia a célula de Sertoli, quantificada por contagem direta através da ferramenta “cell counter”, disponível no software Image J®.

Fonte: A autora, 2017.

A avaliação da densidade volumétrica (Vv) do compartimento tubular e do compartimento intertubular foi realizada com o auxílio da ferramenta “cell counter”. A grade de 99 cruzeiros foi utilizada como parâmetro, sendo sobreposta à fotomicrografia através da ferramenta “grid” (Figura 16). O quadrante superior direito de cada cruz foi padronizado como referencial para a realização da contagem. O número de cruzeiros sobrepostos às estruturas quantificadas no compartimento tubular (epitélio seminífero, lúmen e túnica própria) e no compartimento intertubular (células intersticiais, vasos e nervos), foi dividido por 99 e multiplicado por 100, a fim de corrigir a porcentagem para as 99 cruzeiros utilizadas como sistema de teste. Desta forma, estes resultados foram considerados como a densidade de volume de cada uma das estruturas analisadas, expressa em porcentagem (de Souza, Silva et al. 2012). A análise foi realizada com aumento de 400×, onde foram avaliados 25 campos / animal.

Figura 16 – Avaliação da densidade volumétrica do compartimento tubular e do compartimento intertubular (400×)



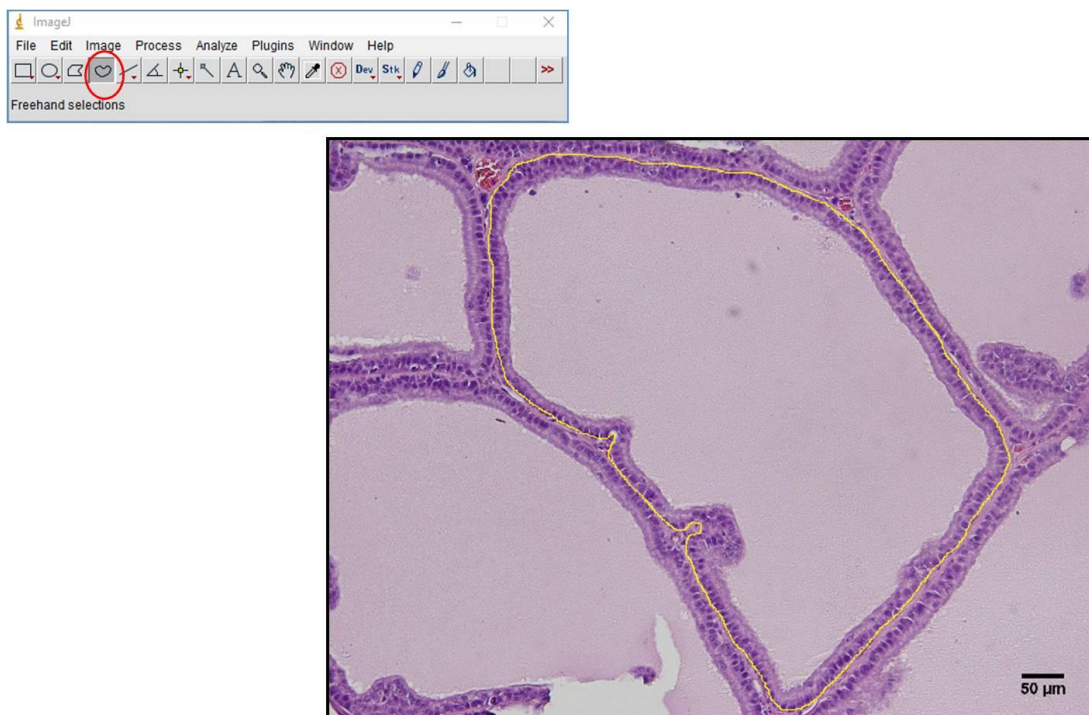
Legenda: Aplicabilidade das ferramentas “grid” e “cell counter” disponíveis no software Image J®, que permitem a contagem das estruturas do compartimento tubular e do compartimento intertubular, (ex.:contagem do epitélio seminífero).

Fonte: A autora, 2017.

3.9.3.2 Próstata

Após a calibração do sistema, para mensurar a área acinar foi utilizada a ferramenta “*freehand selections*”, contornou-se os ácinos inteiros presentes num campo (Figura 17). A altura do epitélio foi mensurada com a ferramenta “*straight line*”, em que foram traçadas linhas retas (10 por campo) sobre o eixo central das células epiteliais, estendendo-se do seu pólo basal ao pólo apical (Figura 18) (Furriel, Campos-Silva et al. 2014). As análises morfométricas foram realizadas com aumento de 200× (área acinar) e aumento de 600× (altura do epitélio). Para cada análise, foram avaliados 25 campos / animal.

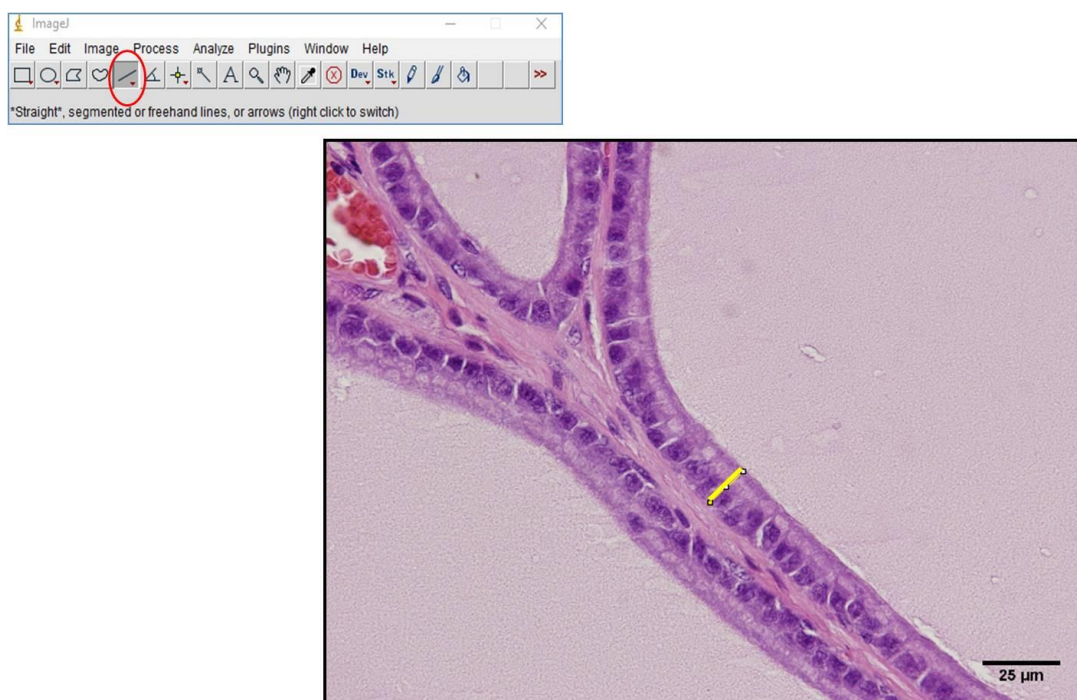
Figura 17 – Mensuração da área acinar (200×)



Legenda: Aplicabilidade da ferramenta “*freehand selections*”, disponível no *software* Image J®, que permite contornar o ácino prostático.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 18 – Mensuração da altura do epitélio prostático (600×)

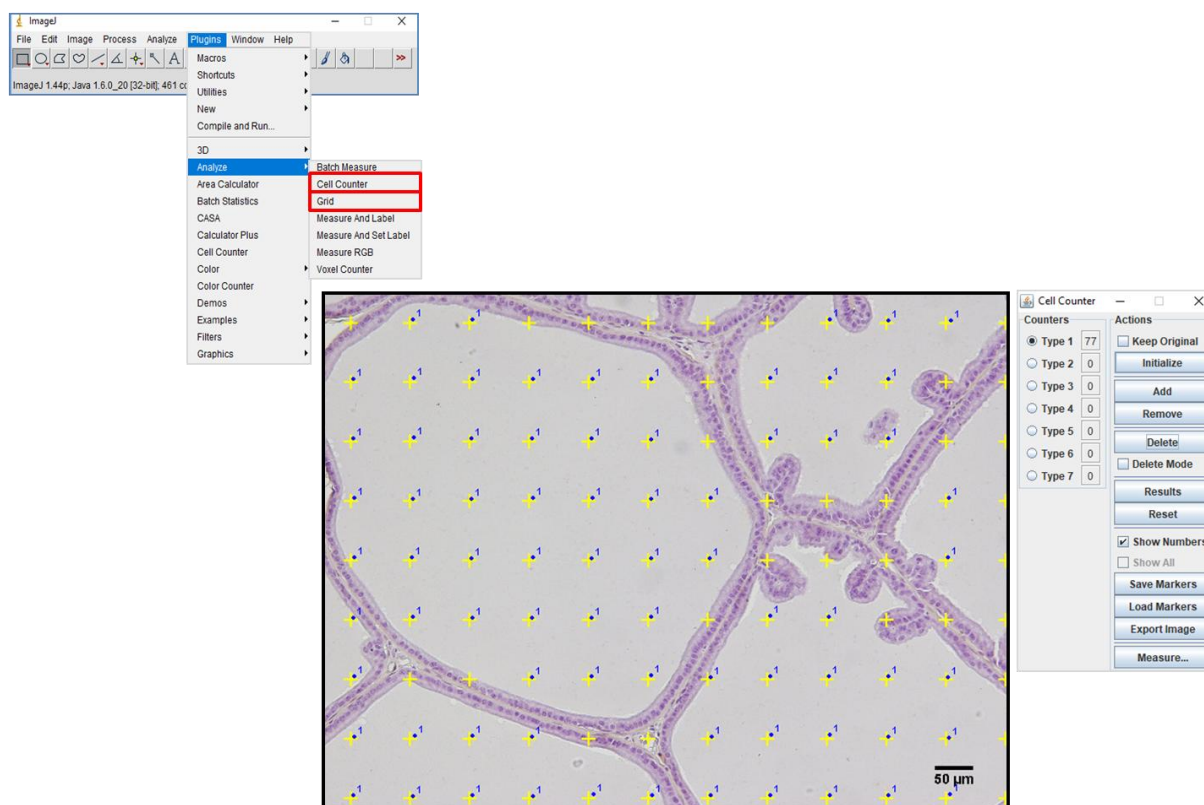


Legenda: Aplicabilidade da ferramenta “*straigh line*”, disponível no *software* Image J®, que permite traçar uma linha reta no epitélio prostático.

Fonte: A autora, 2017.

Para a avaliação da densidade volumétrica do epitélio, do lúmen acinar, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas (imunomarcadas) a grade de 99 cruces foi sobreposta às fotomicrografias através da ferramenta “*grid*”. E com o auxílio da ferramenta “*cell counter*”, cada estrutura tocada por uma cruz foi contada (Figura 19). O quadrante superior direito de cada cruz foi padronizado como referencial para a realização da contagem. O número de cruces sobrepostas às estruturas quantificadas foi multiplicado por 100 e dividido por 99, a fim de corrigir a porcentagem para as 99 cruces utilizadas como sistema de teste. Os valores da densidade volumétrica foram expressos em porcentagem (Furriel, Campos-Silva et al. 2014). A análise foi realizada com um aumento de 200× e foram avaliados 25 campos / animal.

Figura 19 – Avaliação da densidade volumétrica do epitélio, do lúmen acinar, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas (200×)



Legenda: Aplicabilidade das ferramentas “*grid*” e “*cell counter*” disponíveis no software Image J®, que permitem a contagem do epitélio, do lúmen, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas, (ex.:contagem do lúmen).

Fonte: A autora, 2017.

3.10 Western blot (WB)

As amostras de testículo foram armazenadas em freezer à -80°C. A técnica do WB foi realizada para a análise da expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR). A amostra (100 mg) foi homogeneizada em tampão de lise RIPA contendo inibidores de protease. O homogenato obtido foi centrifugado por vinte minutos à 4°C, e o sobrenadante foi coletado. Quantidades similares de proteína total foram ressuspensas em tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), aquecidas por cinco minutos à 100°C e separadas pelo método de SDS - electroforese em gel de poliacrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). A eficiência da transferência foi visualizada com a aplicação do corante *Ponceau* sobre a membrana. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com BSA (diluição de 3% em *tween* – *tris buffered saline* - T-TBS), incubada com os anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemanha): anticorpo policlonal anti-rabbit StAR 1:200 (30 kDa, SC-25806) ou anticorpo monoclonal anti-mouse β -actina – 1:200 (43 kDa, SC-81178), lavada, bloqueada com leite desnatado (diluição de 5% em T-TBS) e incubada com os anticorpos secundários goat-anti-rabbit ou goat-anti-mouse, respectivamente. A expressão das proteínas foi observada a partir da utilização de um sistema detector de quiluminescência ECL kit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia). Os sinais foram visualizados por autorradiografia e a quantificação das bandas foi realizada por densitometria, com o auxílio do *software* Image J[®].

3.11 Análise estatística

Todos os dados foram testados para a curva de distribuição normal e homogeneidade de variância, sendo reportados como média e desvio padrão (DP) da média. As diferenças entre os grupos foram estabelecidas por Teste-t não pareado (dados das progenitoras) e *one-way* análise de variância (ANOVA) com *post-hoc test* de Bonferroni (dados da prole). Em todos os casos, as diferenças

foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$ (Zar 1999) e todas as análises foram realizadas no *software* de análise estatística *GraphPadPrism* versão 5.03 para *Windows* (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Dados das progenitoras

Durante a gestação e a lactação, a ingestão alimentar (g) foi maior nas progenitoras que receberam a dieta controle (C) em comparação as progenitoras alimentadas com a dieta *high-fat* (HF) ($P=0,0163$). No entanto, o ganho de massa corporal foi igual entre o grupo C e o grupo HF ($P=0,2388$). A área sob a curva (ASC) avaliada antes do acasalamento e após o desmame não diferiu entre os grupos C e HF ($P=0,6276$ e $P=0,0534$, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros metabólicos das progenitoras

Dados	C	HF
Ingestão alimentar - g/dia/animal (g)	26,47 ± 4,11	22,63 ± 2,45 ^[a]
Ganho de massa corporal (g)	98,65 ± 10,14	92,50 ± 11,82
TOTG – pré-dieta (ASC - u.a.)	255147 ± 26032,00	260901 ± 15552,00
TOTG – pós-dieta (ASC - u.a.)	236911 ± 35542,00	273671 ± 23158,00

Legenda: C (dieta controle) e HF (dieta *high-fat*). Os dados foram expressos como média ± DP. As diferenças foram testadas por Teste-t não pareado, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C.

4.2 Dados da prole

4.2.1 Ingestão alimentar, ingestão energética, eficiência alimentar, biometria e medições das gônadas

A ingestão alimentar, a ingestão energética, a eficiência alimentar e a massa corporal foram similares entre os grupos C/C, C/HF, HF/C e HF/HF ($P=0,5747$; $P=0,6729$; $P=0,0911$ e $P=0,9339$, respectivamente). A pressão arterial sistólica dos

grupos que receberam a dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal não diferiu do grupo C/C ($P=0,3554$) (Tabela 3).

A tabela 3 mostra que não houve diferença nos depósitos de gordura epididimária, na massa testicular e no índice gonadossomático entre os diferentes grupos experimentais ($P=0,3144$; $P=0,9001$; $P=0,0921$, respectivamente).

4.2.2 Bioquímica sérica e níveis hormonais

A concentração de colesterol total foi igual entre os grupos experimentais ($P=0,3616$). No entanto, os níveis de HDL-c foram inferiores no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica no período pós-natal (C/HF) quando comparado aos grupos C/C e HF/C ($P=0,0100$). Além disso, os níveis de triacilgliceróis foram superiores no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica no período pré-natal (HF/C) em comparação aos demais grupos ($P=0,0005$) (Tabela 3).

Os grupos alimentados com a dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal não apresentaram diferença na ASC e nos valores plasmáticos de insulina quando comparados ao grupo C/C ($P=0,0503$; $P=0,0505$, respectivamente). A glicemia de jejum foi maior nos grupos que receberam a dieta HF, independentemente do seu período de administração, em comparação ao grupo C/C ($P=0,0064$). O índice I/G não diferiu entre os grupos ($P=0,0571$). O nível de testosterona sérica no grupo C/HF foi menor que no grupo C/C ($P=0,0218$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Ingestão alimentar, ingestão energética, eficiência alimentar, biometria, medições das gônadas, bioquímica sérica e níveis hormonais dos grupos experimentais

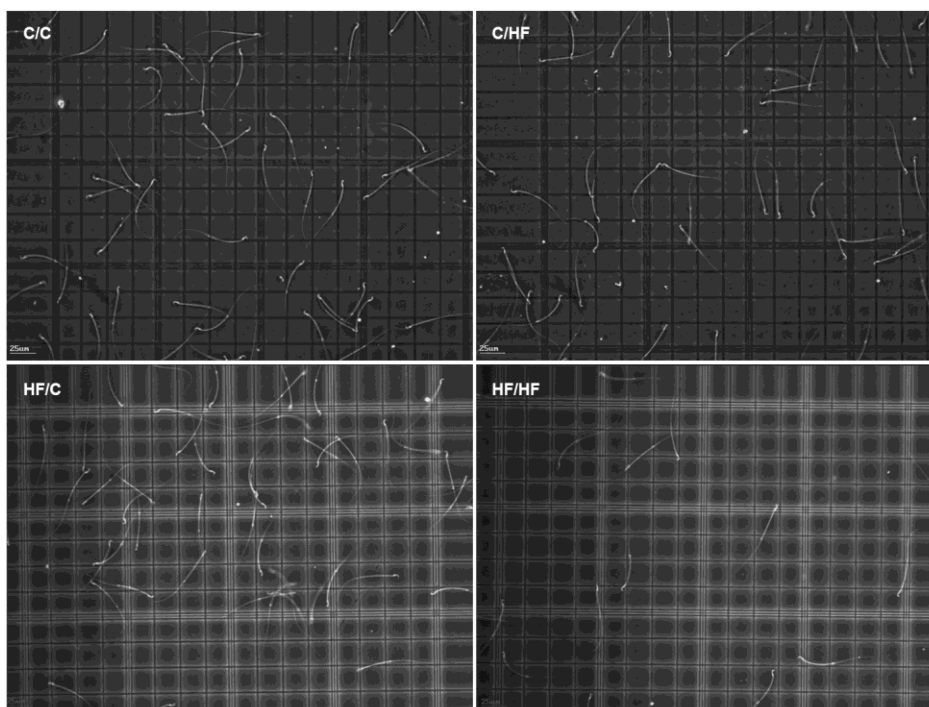
Dados	C/C	C/HF	HF/C	HF/HF
Ingestão alimentar - g/dia/animal (g)	17,35 ± 4,30	15,05 ± 4,56	15,77 ± 5,91	14,78 ± 6,38
Ingestão energética - KJ/dia/animal (KJ)	260,20 ± 55,54	296,60 ± 82,57	279,20 ± 86,32	288,70 ± 116,60
Eficiência alimentar (g/KJ)	0,51 ± 0,13	0,55 ± 0,05	0,43 ± 0,10	0,51 ± 0,05
Massa corporal (g)	423,90 ± 48,85	415,90 ± 58,92	421,10 ± 55,58	409,10 ± 58,16
Pressão arterial sistólica (mmHg)	167,00 ± 12,36	160,10 ± 25,00	182,80 ± 14,13	163,60 ± 28,44
Massa da gordura epididimária (g)	6,47 ± 2,87	6,35 ± 1,26	4,45 ± 0,20	6,65 ± 2,68
Massa testicular (g)	1,72 ± 0,10	1,74 ± 0,14	1,76 ± 0,15	1,74 ± 0,18
Índice gonadossomático (%)	0,39 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,43 ± 0,03
Colesterol total (mg/dL)	54,00 ± 9,63	51,14 ± 4,38	63,75 ± 17,04	53,71 ± 9,21
HDL-c (mg/dL)	41,43 ± 6,24	33,29 ± 2,87 ^[a]	41,57 ± 5,80 ^[b]	35,80 ± 3,49
Triacilgliceróis (mg/dL)	92,50 ± 24,00	83,86 ± 13,95	146,80 ± 37,03 ^[a,b]	87,43 ± 20,82 ^[c]
TOTG (ASC – u.a.)	268986 ± 16385,00	282388 ± 12534,00	251442 ± 19400,00	250158 ± 32170,00
Insulina (ng/mL)	1,11 ± 0,86	1,03 ± 0,60	2,04 ± 0,77	1,69 ± 0,53
Glicemia de jejum (mmol/L)	5,68 ± 1,61	12,62 ± 7,40 ^[a]	12,82 ± 6,95 ^[a]	13,60 ± 1,70 ^[a]
I/G (ng/mL/mmol/L)	0,20 ± 0,07	0,12 ± 0,09	0,20 ± 0,12	0,12 ± 0,03
Testosterona (ng/mL)	11,39 ± 2,13	7,85 ± 1,30 ^[a]	9,34 ± 1,69	10,43 ± 0,85

Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média ± DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C; [b] indica diferença estatística para o grupo C/HF; [c] indica diferença estatística para o grupo HF/C.

4.2.3 Parâmetros espermáticos

A concentração espermática no grupo HF/HF, cujos animais receberam a dieta hiperlipídica durante toda a vida, foi 73% menor que no grupo HF/C ($P=0,0072$) (Figura 20). A viabilidade dos espermatozoides foi menor nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica, independentemente do seu período de administração, quando comparado ao grupo C/C (C/HF: $\downarrow 28\%$; HF/C: $\downarrow 49\%$; HF/HF: $\downarrow 57\%$). Além disso, em ratos HF/HF, a viabilidade espermática foi 39% menor que no grupo C/HF, que recebeu a dieta HF apenas no período pós-natal ($P<0,0001$). A motilidade espermática não diferiu significativamente entre os grupos ($P=0,5217$) (Tabela 4).

Figura 20 - Imagens mostrando a concentração espermática dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. C/C, C/HF e HF/C, produção normal; HF/HF, menor concentração espermática. A figura contém a barra de escala de 25µm gerada pelo *software sperm class analyzer (SCA)*. Óptica de contraste de fase, 100 $\times$.

Fonte: A autora, 2017.

4.2.4 Parâmetros testiculares

Corroborando os parâmetros espermáticos, a densidade volumétrica do compartimento tubular no grupo HF/HF foi 19% menor quando comparado aos demais grupos experimentais ($P < 0,0001$). No grupo HF/HF, a densidade volumétrica do compartimento intertubular foi aumentada em 276%, 280% e 296% em comparação aos grupos C/C, C/HF e HF/C, respectivamente ($P < 0,0001$) (Tabela 4).

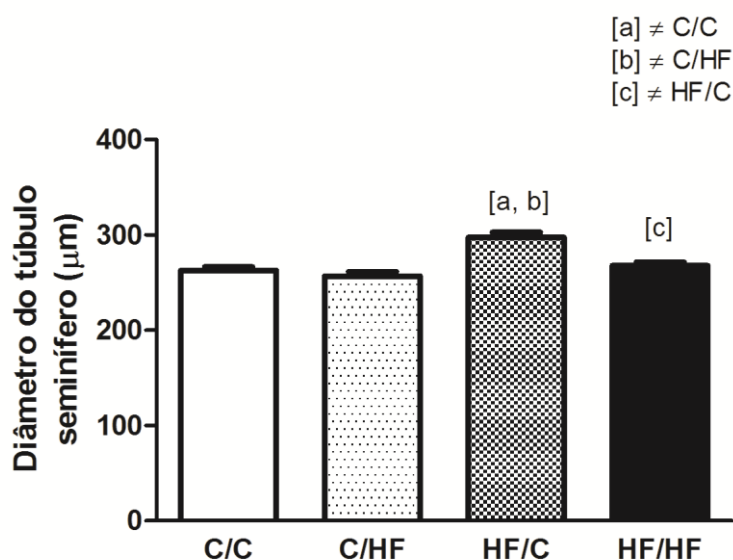
Tabela 4 – Parâmetros espermáticos e parâmetros testiculares dos grupos experimentais

Dados	C/C	C/HF	HF/C	HF/HF
Concentração espermática (sptz/mL)	$1,71 \times 10^6 \pm 4,05 \times 10^5$	$1,29 \times 10^6 \pm 6,70 \times 10^5$	$2,10 \times 10^6 \pm 5,61 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5 \pm 2,46 \times 10^{5[c]}$
Viabilidade espermática (%)	$19,57 \pm 2,94$	$14,00 \pm 2,37^{[a]}$	$9,92 \pm 1,93^{[a]}$	$8,50 \pm 2,63^{[a,b]}$
Motilidade espermática (%)	$47,36 \pm 19,09$	$40,40 \pm 14,49$	$52,35 \pm 13,54$	$52,68 \pm 3,68$
Vv [compartimento tubular] (%)	$93,97 \pm 0,96$	$94,05 \pm 0,93$	$94,20 \pm 0,85$	$75,91 \pm 2,24^{[a,b,c]}$
Vv [compartimento intertubular] (%)	$6,14 \pm 0,84$	$6,08 \pm 0,94$	$5,83 \pm 0,79$	$23,09 \pm 2,24^{[a,b,c]}$

Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C; [b] indica diferença estatística para o grupo C/HF; [c] indica diferença estatística para o grupo HF/C.

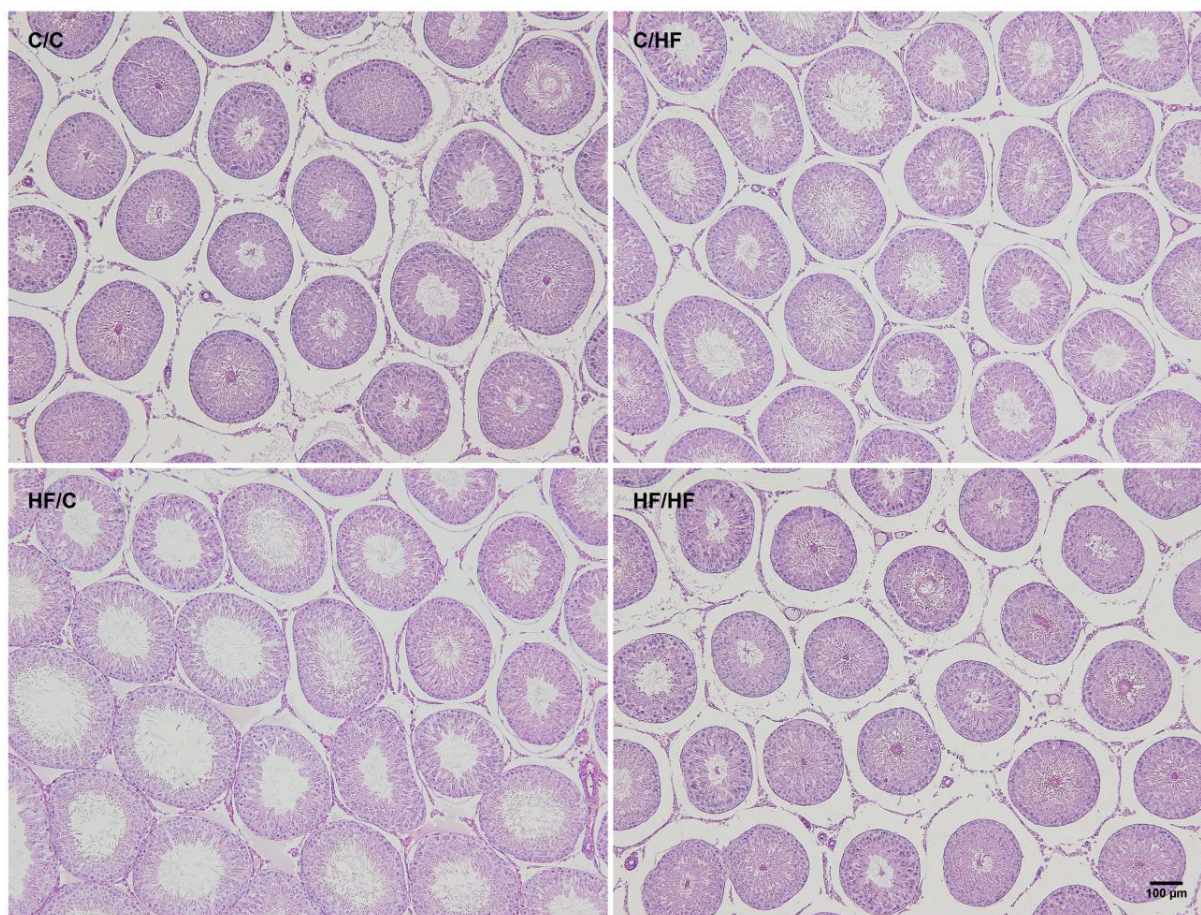
O diâmetro do túbulo seminífero no grupo HF/C foi maior que nos grupos C/C, C/HF e HF/HF, em 13%, 16% e 11%, respectivamente (C/C: $262,90 \pm 9,83\mu\text{m}$; C/HF: $256,80 \pm 13,19\mu\text{m}$; HF/C: $297,60 \pm 11,91\mu\text{m}$; HF/HF: $267,90 \pm 8,31\mu\text{m}$; $P < 0,0001$) (Gráfico 1; Figura 21).

Gráfico 1 – Diâmetro do túbulo seminífero dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C; [b] indica diferença estatística para o grupo C/HF; [c] indica diferença estatística para o grupo HF/C.

Figura 21 - Fotomicrografias mostrando o diâmetro dos túbulos seminíferos dos grupos experimentais

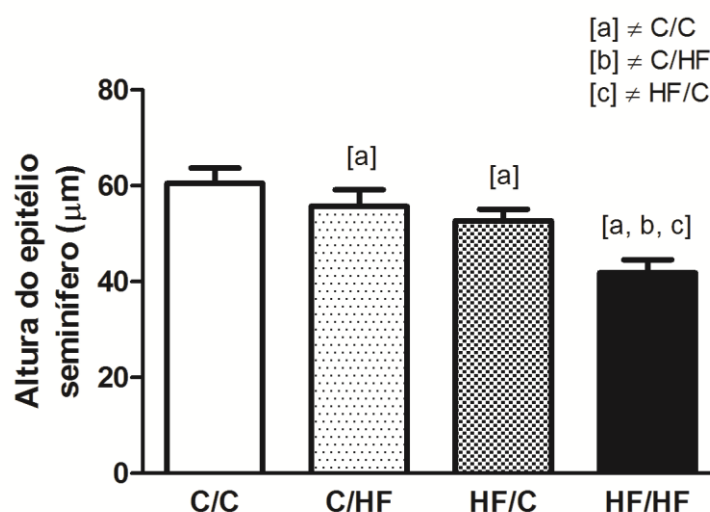


Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). HF/C, testículos com maior diâmetro dos túbulos seminíferos; os outros grupos preservaram a histoarquitetura normal. Coloração H-E, 100×.

Fonte: A autora, 2017.

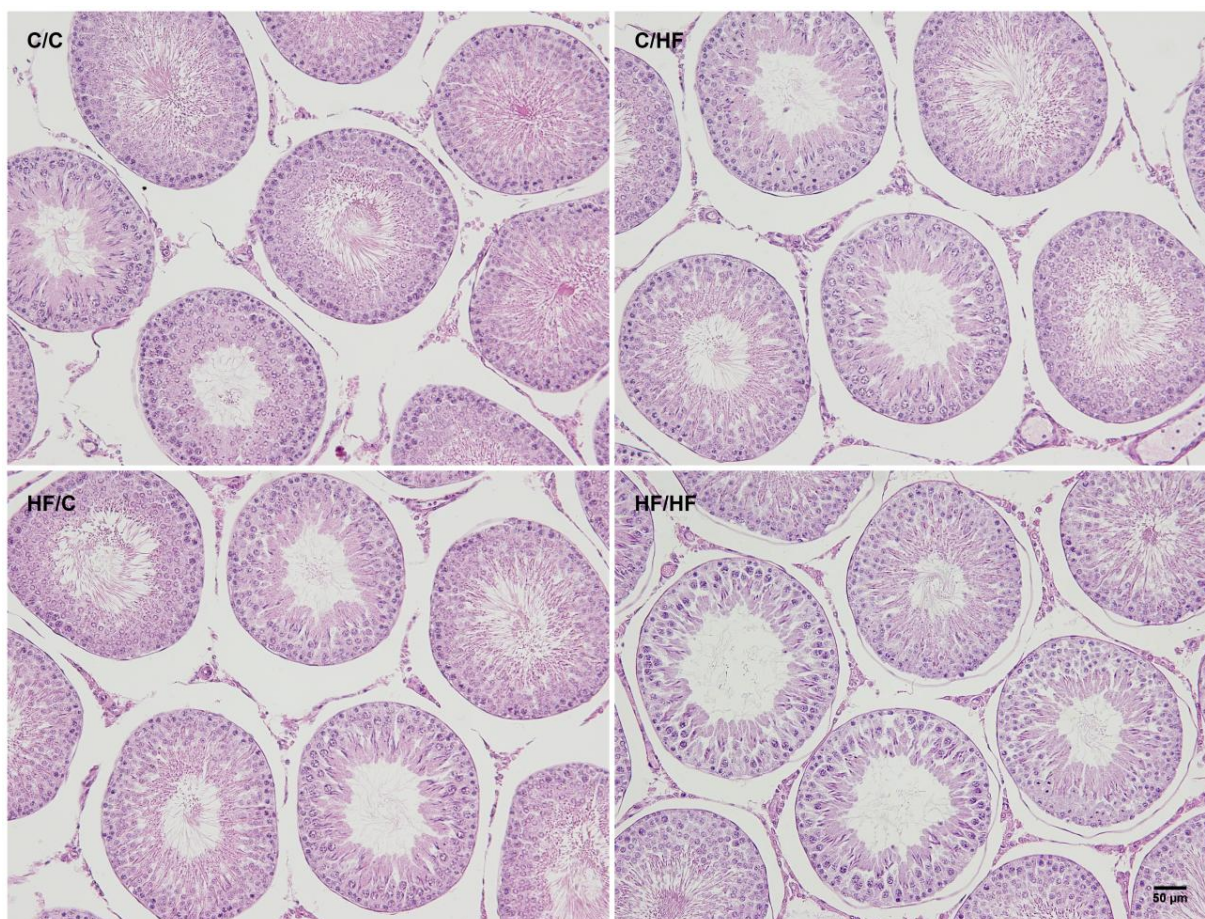
A altura do epitélio seminífero foi 8%, 13% e 31% menor nos grupos C/HF, HF/C e HF/HF, respectivamente, quando comparados ao grupo C/C. Além disso, o grupo HF/HF exibiu o epitélio seminífero mais baixo, que foi 25% e 21% menor que nos grupos C/HF e HF/C, respectivamente (C/C: $60,52 \pm 3,18\mu\text{m}$; C/HF: $55,68 \pm 3,46\mu\text{m}$; HF/C: $52,70 \pm 2,37\mu\text{m}$ e HF/HF: $41,87 \pm 2,69\mu\text{m}$; $P < 0,0001$) (Gráfico 2; Figura 22).

Gráfico 2 – Altura do epitélio seminífero dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C; [b] indica diferença estatística para o grupo C/HF; [c] indica diferença estatística para o grupo HF/C.

Figura 22 - Fotomicrografias mostrando a altura do epitélio seminífero dos grupos experimentais

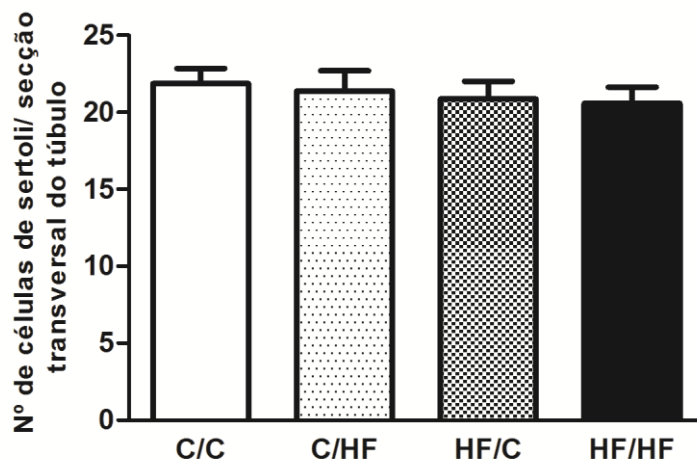


Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). C/C, histoarquitetura dos testículos preservada; C/HF, diminuição da altura do epitélio seminífero; HF/C, diminuição da altura do epitélio seminífero; HF/HF, menor epitélio seminífero. Coloração H-E, 200×.

Fonte: A autora, 2017.

O número de células de Sertoli em uma secção transversal do túbulo seminífero foi similar entre os grupos (C/C: $21,86 \pm 0,98$; C/HF: $20,68 \pm 0,15$; HF/C: $20,86 \pm 1,16$ e HF/HF: $20,56 \pm 1,07$; $P=0,0509$) (Gráfico 3).

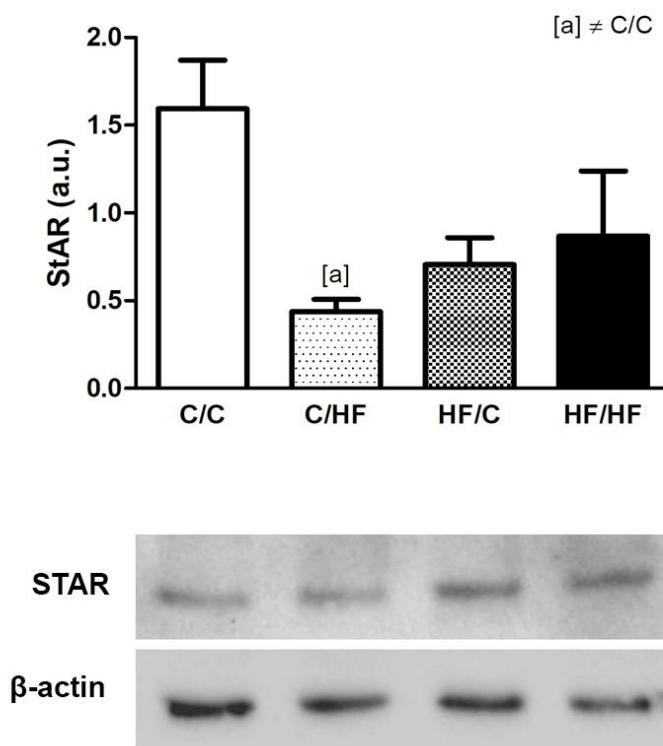
Gráfico 3 – Contagem do número de células de Sertoli dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$.

Além disso, a expressão da proteína StAR em ratos C/HF, que receberam a dieta hiperlipídica no período pós-natal, foi menor que no grupo C/C (C/C: $1,59 \pm 0,62$ u.a.; C/HF: $0,44 \pm 0,18$ u.a.; HF/C: $0,71 \pm 0,38$ u.a. e HF/HF: $0,87 \pm 0,83$ u.a.; $P=0,0215$) (Figura 23).

Figura 23 - Expressão da proteína StAR e bandas representativas da proteína dos grupos experimentais



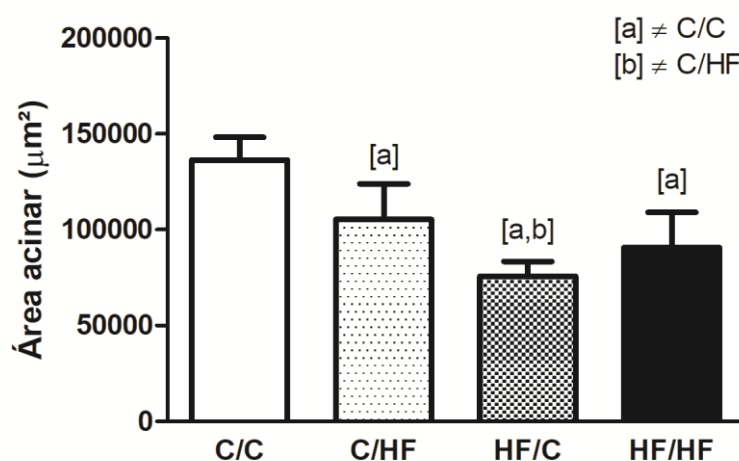
Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C.
 Fonte: A autora, 2017.

4.2.5 Parâmetros prostáticos

A área acinar foi diminuída em 23%, 45% e 33% nos grupos C/HF, HF/C e HF/HF respectivamente, em comparação ao grupo C/C. Além disso, o grupo HF/C apresentou uma redução de 28% na área acinar quando comparado ao grupo C/HF

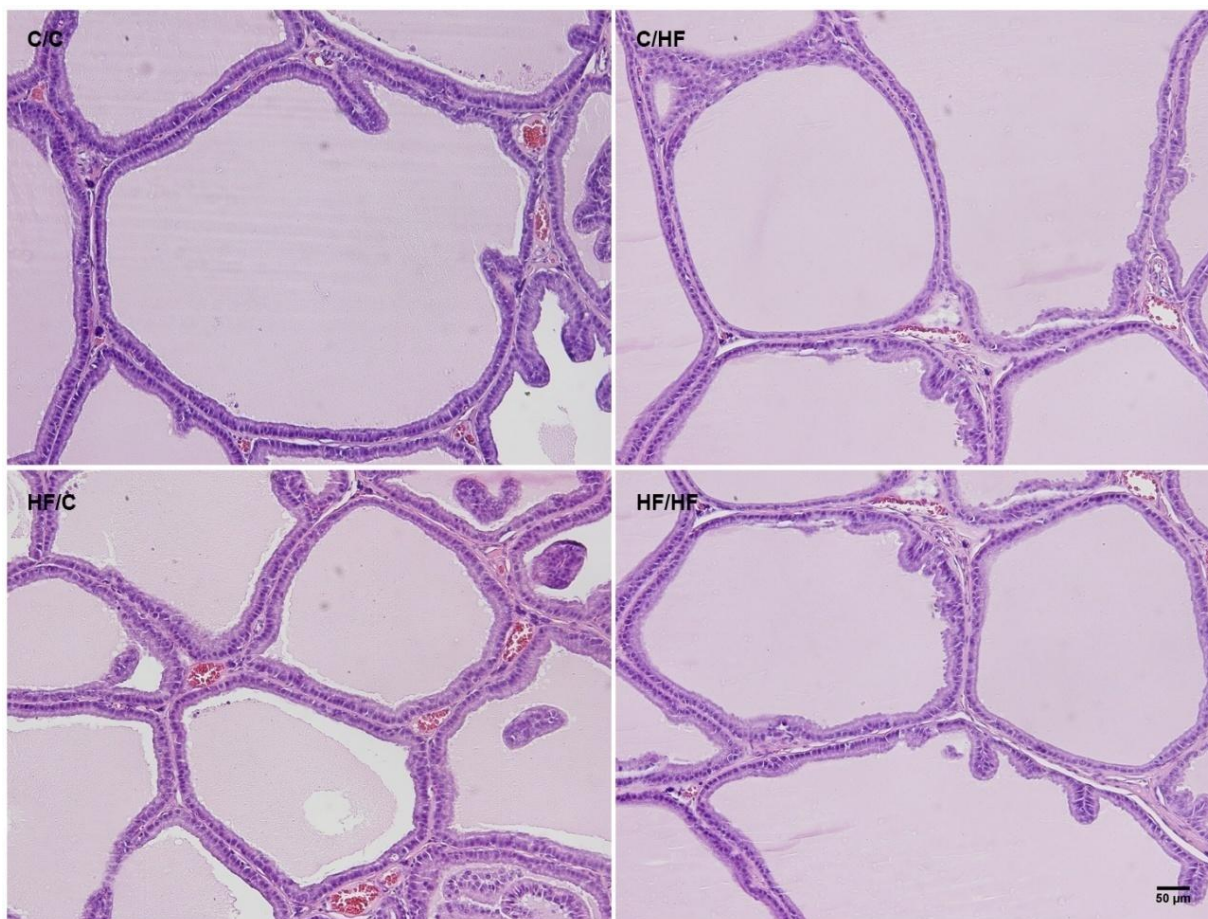
(C/C: $136340 \pm 11847,00 \mu\text{m}^2$; C/HF: $105398 \pm 18511,00 \mu\text{m}^2$; HF/C: $75670 \pm 7671,00 \mu\text{m}^2$ e HF/HF: $90812 \pm 18230,00 \mu\text{m}^2$; $P < 0,0001$) (Gráfico 4; Figura 24)

Gráfico 4 – Área acinar dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C; [b] indica diferença estatística para o grupo C/HF.

Figura 24 - Fotomicrografias mostrando a área acinar dos grupos experimentais

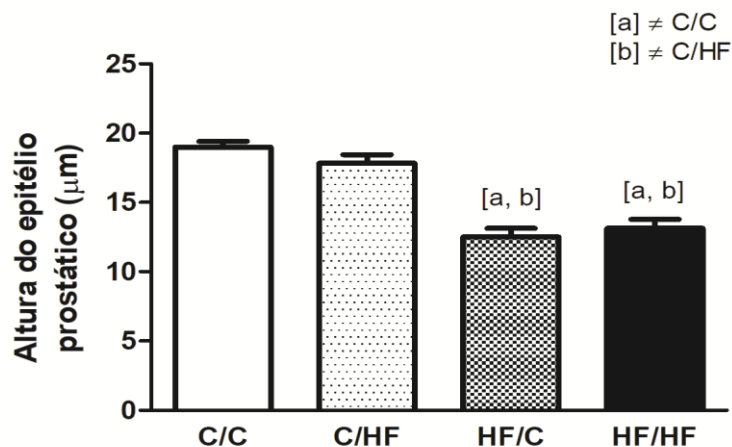


Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). C/C, área acinar preservada; C/HF, diminuição da área acinar; HF/C, menor área acinar; HF/HF, diminuição da área acinar. Coloração H-E, 200×.

Fonte: A autora, 2017.

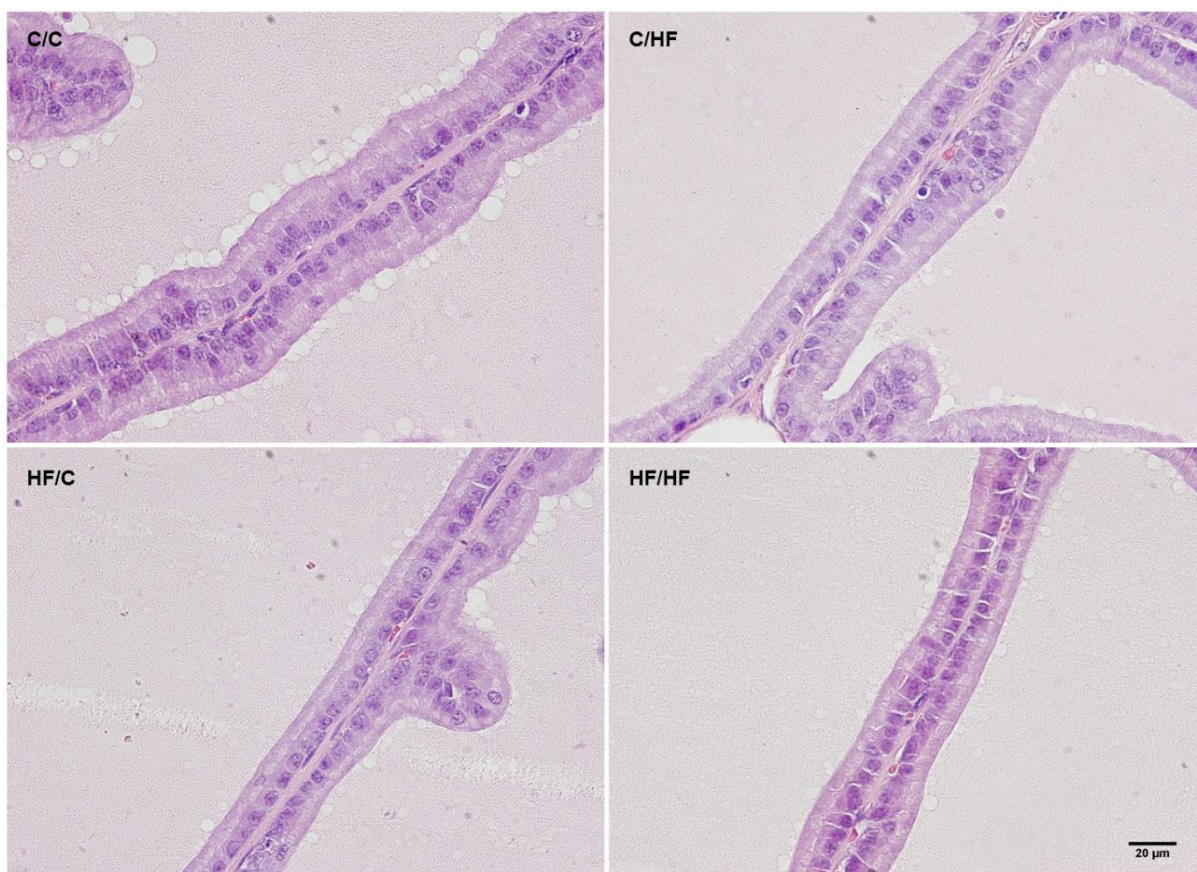
A altura do epitélio nos grupos HF/C e HF/HF foi 31% e 27% menor que no grupo C/C, e 32% e 29% menor que no grupo C/HF (C/C: $18,98 \pm 0,97 \mu\text{m}$; C/HF: $17,82 \pm 1,39 \mu\text{m}$; HF/C: $12,50 \pm 1,92 \mu\text{m}$ e HF/HF: $13,14 \pm 1,85 \mu\text{m}$; $P < 0,0001$) (Gráfico 5; Figura 25).

Gráfico 5 – Altura do epitélio prostático dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média $\pm$ DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C; [b] indica diferença estatística para o grupo C/HF.

Figura 25 - Fotomicrografias mostrando a altura do epitélio prostático dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). C/C, histoarquitetura da próstata preservada; C/HF, histoarquitetura da próstata preservada; HF/C, diminuição da

altura do epitélio prostático; HF/HF, diminuição da altura do epitélio prostático. Coloração H-E, 600×.

Fonte: A autora, 2017.

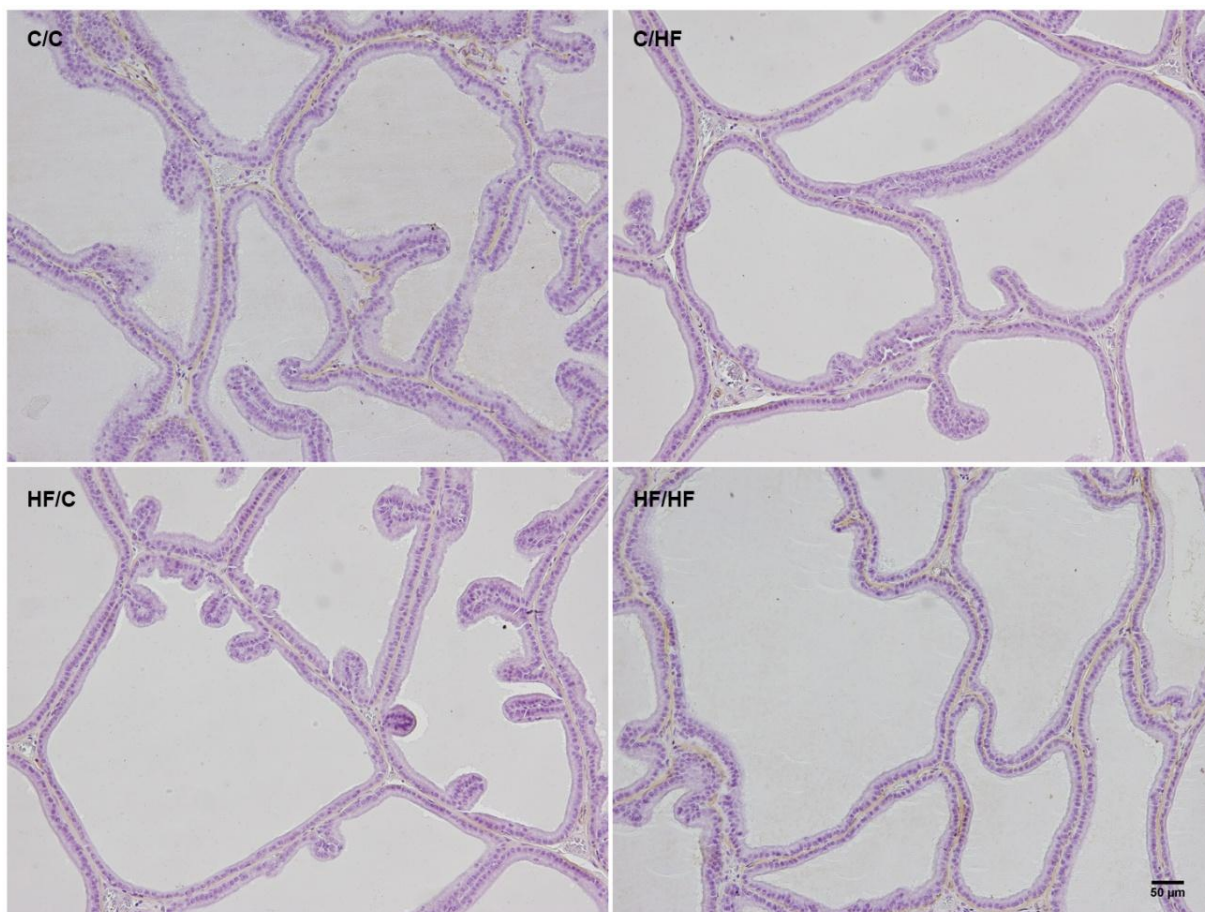
A densidade volumétrica do epitélio em ratos HF/C foi 30% e 29% menor que nos animais C/C e C/HF, respectivamente ($P=0,0024$). A densidade volumétrica do lúmen acinar não diferiu significativamente entre os grupos ($P=0,0110$). Quanto à densidade volumétrica do tecido conjuntivo, os grupos HF/C e HF/HF mostraram uma diminuição de 60% e 74% em comparação ao grupo C/C ($P<0,0001$). Além disso, a densidade volumétrica das células musculares lisas nos grupos C/HF e HF/C foi 40% e 28% menor que no grupo C/C ($P=0,0013$) (Tabela 5, Figura 26).

Tabela 5 - Parâmetros prostáticos dos grupos experimentais

Dados	C/C	C/HF	HF/C	HF/HF
Vv [epitélio] (%)	29,21 ± 5,60	28,78 ± 5,66	20,54 ± 4,65 ^[a,b]	22,10 ± 2,50
Vv [lúmen acinar] (%)	58,65 ± 6,78	57,00 ± 15,95	70,43 ± 5,86	70,45 ± 3,42
Vv [tecido conjuntivo] (%)	4,99 ± 1,61	3,54 ± 1,33	2,01 ± 1,42 ^[a]	1,28 ± 0,51 ^[a]
Vv [músculo liso] (%)	7,70 ± 1,42	4,66 ± 1,64 ^[a]	5,53 ± 1,51 ^[a]	6,17 ± 0,99

Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). Os dados foram expressos como média ± DP. As diferenças foram testadas por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni, $p \leq 0,05$. [a] indica diferença estatística para o grupo C/C; [b] indica diferença estatística para o grupo C/HF.

Figura 26 - Fotomicrografias mostrando a densidade volumétrica do epitélio, do lúmen acinar, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas dos grupos experimentais



Legenda: C/C, HF/HF (filhotes que ingeriram a mesma dieta que as suas mães após o desmame), C/HF, HF/C (filhotes que trocaram a dieta após o desmame). C/C, preservação da densidade volumétrica do epitélio, do lúmen acinar, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas; C/HF, diminuição da densidade volumétrica das células musculares lisas; HF/C, diminuição da densidade volumétrica do epitélio, do tecido conjuntivo e das células musculares lisas; HF/HF, diminuição da densidade volumétrica do tecido conjuntivo. Coloração H-E, 200×.

Fonte: A autora, 2017.

5. DISCUSSÃO

Nossos achados mostram que a administração de dieta HF durante a gestação e a lactação não alterou o metabolismo materno nem a massa corporal, o que exclui a interferência desses fatores em nossos resultados. De maneira que a prole foi programada pela dieta hiperlipídica, conforme foi o objetivo do estudo. Estudos prévios mostraram que esse tipo de dieta não está intimamente correlacionado a obesidade materna (Gregorio, Souza-Mello et al. 2010). Da mesma forma, observou-se que a programação fetal por dieta hiperlipídica não alterou a massa corporal, os depósitos de gordura epididimária e a massa testicular da prole. Uma vez que a ingestão alimentar foi semelhante entre os grupos experimentais, supõe-se que o aumento de energia após a administração de dieta HF ocasionou maior saciedade nesses animais.

No presente trabalho foi observado que a dieta hiperlipídica pré-natal e/ou pós-natal promoveu o aumento da glicemia na prole. Estudos mostram que a hiperglicemia altera a expressão de receptores androgênicos (RA), interfere na proliferação e apoptose de células epiteliais, promove a remodelação estromal e causa drástica atrofia na próstata de ratos (Arcolino, Ribeiro et al. 2010, Gobbo, Taboga et al. 2012, Damasceno, Carvalho et al. 2014). Além disso, é sabido que a hiperglicemia compromete o funcionamento do sistema hipofisário-gonadal e causa distúrbios na secreção dos hormônios que estimulam a síntese de testosterona pelos testículos (Morelli, Comeglio et al. 2013).

Além das modificações na glicemia, a dieta HF reduziu os níveis plasmáticos de HDL-c no grupo C/HF e aumentou os níveis séricos de TAG na prole oriunda de progenitoras que receberam a dieta HF durante a gestação e a lactação. As dietas obesogênicas aumentam os níveis plasmáticos de CT e LDL-c no sangue e diminuem os níveis de HDL-c, a lipoproteína fundamental no transporte reverso do colesterol (Ramirez and Hu 2015). É sabido que a dislipidemia está vinculada à infertilidade (Schisterman, Mumford et al. 2014). Estudos experimentais mostraram que camundongos hiperlipidêmicos, alimentados com dieta HF, exibiram alterações histopatológicas nos testículos (Zhang, Lv et al. 2012).

Concomitante a hipertrigliceridemia, a dieta hiperlipídica pré-natal promoveu modificações estruturais nos testículos, que podem comprometer a produção de

espermatozoides. Em animais que receberam a dieta HF pré-natal, a viabilidade espermática e a altura do epitélio seminífero foram diminuídas, quando comparado ao grupo C/C. Esses achados mostram o efeito deletério do consumo de dieta HF durante a gestação e a lactação. Estudos experimentais (Louei Monfared 2013) e clínicos (Ergun, Kose et al. 2007) já mostraram essa relação entre os níveis séricos de TAG e os parâmetros espermáticos e morfométricos dos testículos.

Apesar dos achados, o mecanismo de associação direta entre os níveis séricos de TAG e o testículo não é claro. É sabido que a lipase hormônio sensível (LHS) é uma enzima responsável pela liberação dos ácidos graxos e ésteres de colesterol da molécula de TAG, para produção de energia. A LHS é amplamente expressa no sistema reprodutor masculino e pode desempenhar um papel importante na regulação de processos fisiopatológicos nos testículos (Wang and Xu 2015). Estudos prévios observaram que camundongos que não apresentavam o gene que codifica a LHS eram inférteis, apresentavam anormalidades morfológicas nos testículos, espermatogênese deficiente e azoospermia (Wang, Chung et al. 2004, Wang, Wu et al. 2014). Embora não tenhamos analisado os níveis de LHS, a possível redução desta enzima pode ter influenciado negativamente a viabilidade dos espermatozoides e a morfologia do testículo.

Neste estudo, observamos que a dieta HF, independentemente do período de administração, promoveu a redução da viabilidade espermática, o que sugere o comprometimento da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide (Ribeiro, Milhomem et al. 2014). É sabido que a dieta hiperlipídica influencia a composição lipídica da membrana plasmática em células animais (Perona 2017) e o excesso de colesterol diminui a fluidez da membrana (De Craene, Bertazzi et al. 2017). A concentração espermática diminuiu no grupo que recebeu a dieta HF durante toda a vida, em comparação com o grupo HF/C, mostrando que o consumo de dieta controle após o desmame minimizou os danos causados pela administração de dieta HF durante o período pré-natal. A motilidade espermática não foi alterada por este modelo de programação fetal. Corroborando esses dados, a densidade volumétrica do compartimento tubular foi reduzida no grupo HF/HF. O compartimento tubular, fundamental para a produção de espermatozoides, representa a maior parte do testículo, ocupando 95% do parênquima testicular (Morais, Balarini et al. 2014).

Os parâmetros morfométricos do testículo, como o diâmetro do túbulo seminífero e a altura do epitélio seminífero, também são indicadores da atividade espermatogênica (Ribeiro, Milhomem et al. 2014). O diâmetro do túbulo seminífero foi maior em ratos que foram expostos a dieta hiperlipídica durante o período pré-natal. Os níveis elevados de colesterol na dieta podem aumentar os níveis de peroxidação lipídica em vários tecidos, comprometendo seriamente a integridade das células (Rani, Deep et al. 2016). Portanto, suspeita-se que o lipídeo perpassado pela placenta e/ou através do leite materno possa ter provocado a descamação do epitélio seminífero, que ocasionou o aumento na quantidade de detritos celulares no lúmen. Esta condição pode ter causado a obstrução dos ductos eferentes e prejudicado a passagem do fluido dos testículos para o epidídimo, resultando no aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos (Moffit, Bryant et al. 2007).

O grupo que recebeu a dieta HF pré-natal também exibiu uma diminuição na altura do epitélio seminífero. Da mesma forma, este parâmetro foi reduzido no grupo alimentado com a dieta HF pós-natal. A maior diminuição foi observada no grupo HF/HF, que recebeu a dieta hiperlipídica durante toda a vida, confirmando a influência negativa da dieta rica em gordura na espermatogênese. O excesso de colesterol promove a rigidez da membrana plasmática e altera as suas propriedades físico-químicas (Perona 2017). No entanto, não existem informações a respeito da programação fetal por dieta rica em colesterol e seus efeitos na morfologia testicular em animais adultos. Foi relatado que a obesidade materna, induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica, altera o desenvolvimento dos gonócitos e diminui os níveis de esteróides sexuais em filhotes de ratos, nos primeiros dias de vida (0,5 a 14,5 dias pós-parto) (Christante, Taboga et al. 2013). Os gonócitos são precursores das células germinativas masculinas (espermatogônias), portanto a sua redução pode prejudicar a produção de espermatozoides da prole adulta.

As células de Sertoli são as estruturas mais resistentes nos testículos e as últimas a serem modificadas quando expostas a insultos. É sabido que as alterações no número de células de Sertoli raramente são observadas (Stumpp, Freymuller et al. 2008). Nosso estudo é o primeiro a avaliar o efeito da programação fetal por dieta HF no número de células de Sertoli. Este parâmetro não diferiu entre os grupos, é possível que o tempo de exposição à dieta hiperlipídica foi insuficiente para causar alterações neste parâmetro.

Os níveis séricos de testosterona foram menores nos grupos que receberam a dieta HF, sendo estatisticamente significativo apenas no grupo em que a dieta foi administrada no período pós-natal. A testosterona é um hormônio produzido pelas células de Leydig, presentes nos testículos. Neste órgão, a testosterona regula a maturação testicular, atua na diferenciação das células da linhagem espermatogênica, que constituem o epitélio seminífero e são responsáveis pela produção dos espermatozoides (Martin 2016). Corroborando a diminuição dos níveis séricos de testosterona e os dados publicados por Li e colaboradores (2013), a expressão da proteína StAR foi reduzida no grupo C/HF (Li, Liu et al. 2013). Tal redução não foi observada no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica durante toda a vida (HF/HF), este fato pode ter ocorrido devido a um processo de adaptação. A resposta adaptativa preditiva ocorre quando a exposição à insultos durante o período pré-natal provoca adaptações metabólicas no descendente, que asseguram a sua sobrevivência em condições semelhantes durante o período pós-natal (Gallou-Kabani, Vige et al. 2007b, Bateson, Gluckman et al. 2014).

Nas células intersticiais do testículo, a proteína StAR é responsável por iniciar a conversão do colesterol em testosterona. A proteína StAR facilita o transporte do colesterol livre para a membrana mitocondrial interna da célula de Leydig e em decorrência a sucessivas etapas da via esteroidogênica catalisadas por diferentes proteínas, a testosterona é sintetizada (Manna, Stetson et al. 2016). Sebokova e colaboradores (1988) observaram que o lipídio presente na dieta pode afetar a organização da membrana plasmática no testículo. De maneira que altera a disponibilidade de receptores de LH, localizados nas células de Leydig, e consequentemente a produção de testosterona é comprometida (Sebokova, Garg et al. 1988).

Na próstata, a testosterona após se difundir para o interior das células é convertida por ação da enzima 5 alfa-redutase em um composto mais funcional, a DHT. Tanto a testosterona quanto a DHT podem se ligar ao RA, localizado no núcleo das células epiteliais e estromais da próstata. Assim, estes hormônios estimulam a atividade mitogênica, a proliferação celular e a secreção da glândula. A DHT forma um complexo mais estável com o RA e a sua atuação é mais potente que a atuação da testosterona (Grino, Griffin et al. 1990, McNamara, Nakamura et al. 2013). Embora os níveis de DHT não tenham sido avaliados no presente estudo, este hormônio é sintetizado a partir da testosterona e a redução nos níveis séricos

de testosterona pode ter sido um dos fatores responsáveis pela atrofia da próstata em nosso estudo.

Quanto à morfometria da próstata, foi observado que a programação metabólica por dieta hiperlipídica promoveu a redução do estroma, constituído por tecido conjuntivo e músculo liso. A densidade volumétrica do tecido conjuntivo foi menor nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica ao longo de toda a vida e no período pré-natal. O tecido conjuntivo da próstata é constituído por fibras colágenas e fibroblastos, que sintetizam os componentes da matriz extracelular (Harmelin, Danon et al. 2005). É sabido que fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias das atividades celulares estão associados à matriz extracelular (Kruslin, Ulamec et al. 2015). Assim, na ausência ou carência desses componentes, a homeostase prostática pode ser afetada e ocorrer o comprometimento da maturação da glândula. A densidade volumétrica do músculo liso foi reduzida tanto no grupo que recebeu a dieta HF no período pré-natal quanto no período pós-natal, mostrando o efeito negativo do consumo da dieta tanto pela mãe quanto pela prole. As células musculares lisas encontram-se no entorno dos ácinos prostáticos. Estas células são necessárias para a manutenção da função reprodutiva da próstata, pois proporcionam a contração necessária durante a ejaculação. Além disso, as células musculares lisas atuam na produção de fatores parácrinos e na síntese, degradação e reorganização da matriz extracelular, a partir de um mecanismo de interação com as células epiteliais (Thomson, Cunha et al. 2008, Levesque and Nelson 2017). Assim, o decréscimo das células musculares lisas pode comprometer diretamente a fisiologia do órgão.

Corroborando com os nossos resultados, Dasmaceno e colaboradores (2014) observaram que ratos expostos a um ambiente intrauterino adverso apresentaram modificações na morfologia prostática, com redução na expressão de α -actina de músculo liso, que indica indiretamente diminuição no volume das células musculares lisas (Damasceno, Carvalho et al. 2014). Além da diminuição do compartimento estromal, os mesmos autores observaram redução na proporção do lúmen (Damasceno, Carvalho et al. 2014). Similarmente, em nosso trabalho, a programação metabólica por dieta HF e/ou a própria dieta por si só, diminuíram o compartimento acinar, que associado à diminuição da densidade volumétrica do músculo liso podem levar à menor contratilidade da glândula, dificultando a liberação do fluido prostático.

Em consonância com as modificações encontradas no estroma da próstata, as proles que receberam a dieta HF durante toda a vida (intrauterina e extrauterina) e no período pré-natal, apresentaram redução na altura do epitélio. O epitélio prostático é constituído por seis tipos de células: células-tronco, células basais, células “*transit-amplify*” (TACs), células intermediárias, células lumbais secretoras e células neuroendócrinas (Schalken and van Leenders 2003, Singh, Uzgaré et al. 2006). As células lumbais secretoras são consideradas as principais e são responsáveis pela secreção do fluido prostático (Miki 2010). Nesse sentido, a diminuição na altura do epitélio ocasionada pela programação metabólica por dieta hiperlipídica pode comprometer a atividade secretora da próstata, e assim a sua funcionalidade. Em associação a esse resultado, observamos nos mesmos grupos o decréscimo da área acinar.

Não termos avaliado o sistema-renina-angiotensina-aldosterona foi uma das limitações do estudo, pois os componentes do sistema são observados nos testículos e na próstata (Scott-Emuakpor, Allot et al. 2017, Fang, Zhong et al. 2018). Além disso, a outra falha do trabalho foi não termos dosado as citocinas inflamatórias. É sabido que a obesidade está vinculada a um processo de inflamação sistêmica crônica, portanto seria interessante termos avaliado o efeito isolado da dieta hiperlipídica nesse parâmetro (Schmidt, Weschenfelder et al. 2015).

CONCLUSÕES

O consumo de dieta hiperlipídica na gestação/lactação e na vida pós-natal promoveu poucas alterações metabólicas. No entanto, a dieta HF promoveu a diminuição da próstata, o que poderia comprometer a sua atividade secretora e a sua contratilidade. Também foram observadas alterações morfométricas e funcionais nos testículos, o que mostra distúrbios na espermatogênese. Esses fatores poderiam comprometer a fertilidade na idade adulta.

REFERÊNCIAS

- Amann, R. P, B. D. Schanbacher. Physiology of male reproduction. J Anim Sci. 1983;57 Suppl 2:380-403.
- Antoniassi, J. Q., R. A. Fochi, R. M. Góes, P. S. L. Vilamaior; S. R. Taboga. Corticosterone influences gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostatic morphophysiology and alters its proliferation and apoptosis rates. Int J Exp Pathol. 2017;98(3):134-146.
- Arcolino, F. O., D. L. Ribeiro, M. G. Gobbo, S. R. Taboga, R. M. Goes. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. Int J Exp Pathol. 2010;91(2):144-154.
- Austin, G. L., L. G. Ogden, J. O. Hill. Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971-2006. Am J Clin Nutr. 2011;93(4):836-843.
- Barker, D. J., C. Osmond. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet. 1986;1(8489):1077-1081.
- Barrand, S., T. M. Crowley, R. J. Wood-Bradley, K. A. De Jong, J. A. Armitage. Impact of maternal high fat diet on hypothalamic transcriptome in neonatal Sprague Dawley rats. PLoS One. 2017;12(12):e0189492.
- Bateson, P., P. Gluckman, M. Hanson. The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. J Physiol. 2014;592(11):2357-2368.
- Berndtson, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. J Anim Sci. 1977;44(5):818-833.
- Bezpalko, L., O. Gavriluk, O. Zayachkivska. Inflammatory response in visceral fat tissue and liver is prenatally programmed: experimental research. J Physiol Pharmacol. 2015;66(1):57-64.
- Bronson, R. Biology of the male reproductive tract: its cellular and morphological considerations. Am J Reprod Immunol. 2011;65(3):212-219.
- Bruchovsky, N., B. Lesser, E. Van Doorn, S. Craven. Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. Vitam Horm. 1975;33:61-102.
- Campos-Silva, P., A. Furriel, W. S. Costa, F. J. Sampaio, B. M. Gregorio. Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats. Int Braz J Urol. 2015;41(3):569-575.
- Carreiro, A. L., J. Dhillon, S. Gordon, K. A. Higgins, A. G. Jacobs, B. M. McArthur et al. The Macronutrients, Appetite, and Energy Intake. Annu Rev Nutr. 2016;36:73-103.

- Carta, G., E. Murru, S. Banni, C. Manca. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front Physiol.* 2017;8:902.
- Cascio, G., G. Schiera, I. Di Liegro. Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Curr Diabetes Rev.* 2012;8(1):2-17.
- Castro, T. G., M. A. Cardoso. Lipídeos. *Nutrição Humana: nutrição e metabolismo.* V. H. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2010;p.36-42.
- Chavarro, J. E., L. Minguez-Alarcon, J. Mendiola, A. Cutillas-Tolin, J. J. Lopez-Espin, A. M. Torres-Cantero. Trans fatty acid intake is inversely related to total sperm count in young healthy men. *Hum Reprod.* 2014;29(3):429-440.
- Chen, Y., M. Du, J. Xu, D. Chen. The small dense LDL particle/large buoyant LDL particle ratio is associated with glucose metabolic status in pregnancy. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):244.
- Chiu, Y. H., A. E. Karmon, A. J. Gaskins, M. Arvizu, P. L. Williams, I. Souter et al. Serum omega-3 fatty acids and treatment outcomes among women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2018;33(1):156-165.
- Christante, C. M., S. R. Taboga, M. E. Pinto-Fochi, R. M. Goes. Maternal obesity disturbs the postnatal development of gonocytes in the rat without impairment of testis structure at prepubertal age. *Reproduction.* 2013;146(6):549-558.
- Cortes, D., J. Muller, N. E. Skakkebaek. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl.* 1987;10(4):589-596.
- Damasceno, A. A., C. P. Carvalho, E. M. Santos, F. V. Botelho, F. A. Araujo, S. R. Deconte et al. Effects of maternal diabetes on male offspring: high cell proliferation and increased activity of MMP-2 in the ventral prostate. *Cell Tissue Res.* 2014;358(1):257-269.
- Davidson, L. M., K. Millar, C. Jones, M. Fatum, K. Coward. Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility. *Hum Fertil (Camb).* 2015;18(3):184-193.
- De Craene, J. O., D. L. Bertazzi, S. Bar, S. Friant. Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3).
- de Souza, D. B., D. Silva, C. M. Cortez, W. S. Costa, F. J. Sampaio. Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J Androl.* 2012;33(4):735-739.
- Dean, C., K. Bannigan, M. O'Hara, R. Painter, J. Marsden. Recurrence rates of hyperemesis gravidarum in pregnancy: a systematic review protocol. *JBI Database System Rev Implement Rep.* 2017;15(11):2659-2665.

Deisl, C., M. Anderegg, G. Albano, B. P. Luscher, D. Cerny, R. Soria et al. Loss of Sodium/Hydrogen Exchanger NHA2 Exacerbates Obesity- and Aging-Induced Glucose Intolerance in Mice. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163568.

Desai, M., G. Han, M. G. Ross. Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: Altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators. *Appetite*. 2016;99:193-199.

Desai, M., J. K. Jellyman, G. Han, M. Beall, R. H. Lane, M. G. Ross. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(3):237 e231-237 e213.

Dupont, C., A. G. Cordier, C. Junien, B. Mandon-Pepin, R. Levy, P. Chavatte-Palmer. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology*. 2012;78(7):1405-1414.

Ergun, A., S. K. Kose, K. Aydos, A. Ata, A. Avci. Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. *Arch Androl*. 2007;53(1):21-23.

Fang, Y., R. Zhong, X. Sun, D. Zhou. High salt diet decreases reproductive performance in rams and down-regulates gene expression of some components of the renin-angiotensin system in the testis. *Theriogenology*. 2018;107:127-133.

Favorito, L. A., F. J. B. Sampaio. Morfologia aplicada do testículo e epidídimo. Morfologia urogenital aplicada à urologia pediátrica. Rio de Janeiro. 2014:130-142.

Furriel, A., P. Campos-Silva, P. C. Silva, W. S. Costa, F. J. Sampaio, B. M. Gregorio. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids induce morphological alterations in the rat ventral prostate. *PLoS One*. 2014;9(7):e102876.

Gallou-Kabani, C., A. Vige, M. S. Gross, C. Boileau, J. P. Rabes, J. Fruchart-Najib et al. Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007b;292(4):E1095-1100.

Gallou-Kabani, C., A. Vige, M. S. Gross, J. P. Rabes, C. Boileau, C. Larue-Achagiotis et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2007a;15(8):1996-2005.

Gardner, E., D. J. Gray, R. O'Rahilly. Anatomia – Estudo Regional do Corpo Humano. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1972.

Gobbo, M. G., S. R. Taboga, D. L. Ribeiro, R. M. Goes. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. *Micron*. 2012;43(2-3):326-333.

Goossens, E., H. Tournaye. Adult stem cells in the human testis. *Semin Reprod Med*. 2013;31(1):39-48.

Grant, K. S., R. Petroff, N. Isoherranen, N. Stella, T. M. Burbacher. Cannabis use during pregnancy: Pharmacokinetics and effects on child development. *Pharmacol Ther.* 2017;182:133-151.

Gregorio, B. M., V. Souza-Mello, J. J. Carvalho, C. A. Mandarim-de-Lacerda, M. B. Aguila. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(5):495 e491-498.

Grino, P. B., J. E. Griffin, J. D. Wilson. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology.* 1990;126(2):1165-1172.

Grinspon, R. P., C. Habib, P. Bedecarras, S. Gottlieb, R. A. Rey. Compensatory function of the remaining testis is dissociated in boys and adolescents with monorchidism. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(3):399-407.

Griswold, M. D. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016;96(1):1-17.

Hallam, M. C., R. A. Reimer. Impact of Diet Composition in Adult Offspring is Dependent on Maternal Diet during Pregnancy and Lactation in Rats. *Nutrients.* 2016;8(1).

Hamilton, B. E., D. L. Hoyert, J. A. Martin, D. M. Strobino, B. Guyer. Annual summary of vital statistics: 2010-2011. *Pediatrics.* 2013;131(3):548-558.

Harmelin, A., T. Danon, I. Kela, O. Brenner. Biopsy of the mouse prostate. *Lab Anim.* 2005;39(2):215-220.

Hayashi, N., Y. Sugimura, J. Kawamura, A. A. Donjacour, G. R. Cunha. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod.* 1991;45(2):308-321.

Hayward, S. W., G. R. Cunha. The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am.* 2000;38(1):1-14.

Hellerstein, M.K. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53(Suppl. 1):S53-65.

Holstein, A. F., M. Maekawa, T. Nagano, M. S. Davidoff. Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-inferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol.* 1996;59(2):109-125.

Hopkins, B. R., I. Sepil, S. Wigby. Seminal fluid. *Curr Biol.* 2017;27(11):R404-R405.

Iliadou, P. K., C. Tsametis, A. Kaprara, I. Papadimas, D. G. Goulis. The Sertoli cell: Novel clinical potentiality. *Hormones (Athens).* 2015;14(4):504-514.

Iwen, K. A., J. Backhaus, M. Cassens, M. Walth, O. C. Hedesan, M. Merkel et al. Cold-Induced Brown Adipose Tissue Activity Alters Plasma Fatty Acids and Improves Glucose Metabolism in Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(11):4226-4234.

Jackson, C. M., B. T. Alexander, L. Roach, D. Haggerty, D. C. Marbury, Z. M. Hutchens et al. Exposure to maternal overnutrition and a high-fat diet during early postnatal development increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(6):F774-783.

Jeyendran, R. S., H. H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. G. Crabo, L. J. Zaneveld. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984;70(1):219-228.

Junqueira, L. C., J. C. Carneiro. *Aparelho Reprodutor Masculino. Histologia Básica.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2013:411-426.

Kierszenbaum, A. L. *Espermatogênese. Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia.* Rio de Janeiro, Elsevier. 2008:573-600.

Kim, W. T., S. J. Yun, Y. D. Choi, G. Y. Kim, S. K. Moon, Y. H. Choi et al. Prostate size correlates with fasting blood glucose in non-diabetic benign prostatic hyperplasia patients with normal testosterone levels. *J Korean Med Sci.* 2011;26(9):1214-1218.

King, E., A. Campbell, A. Belger, K. Grewen. Prenatal Nicotine Exposure Disrupts Infant Neural Markers of Orienting. *Nicotine Tob Res.* 2017.

King, J. C. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:271-291.

Kotsampasi, B., C. Balaskas, G. Papadomichelakis, S. E. Chadio. Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim Reprod Sci.* 2009;114(1-3):135-147.

Kruslin, B., M. Ulamec, D. Tomas. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015;15(2):1-8.

Labrie, F., V. Luu-The, C. Labrie, J. Simard. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol.* 2001;22(3):185-212.

Lang, S. H., F. M. Frame, A. T. Collins. Prostate cancer stem cells. *J Pathol.* 2009;217(2):299-306.

Langley-Evans, S. C., D. S. Gardner, A. A. Jackson. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr.* 1996;126(6):1578-1585.

Larsen, L. H., S. Sando-Pedersen, L. K. H. Orstrup, N. Grunnet, B. Quistorff, O. H. Mortensen. Gestational Protein Restriction in Wistar Rats; Effect of Taurine

Supplementation on Properties of Newborn Skeletal Muscle. *Adv Exp Med Biol.* 2017;975:413-433.

Legrand, P., V. Rioux. The complex and important cellular and metabolic functions of saturated fatty acids. *Lipids.* 2010;45(10):941-946.

Levesque, C., P. S. Nelson. Cellular Constituents of the Prostate Stroma: Key Contributors to Prostate Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017.

Li, Y., A. Hruby, A. M. Bernstein, S. H. Ley, D. D. Wang, S. E. Chiuve et al. Saturated Fats Compared With Unsaturated Fats and Sources of Carbohydrates in Relation to Risk of Coronary Heart Disease: A Prospective Cohort Study. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(14):1538-1548.

Li, Y., L. Liu, B. Wang, J. Xiong, Q. Li, J. Wang et al. Impairment of reproductive function in a male rat model of non-alcoholic fatty liver disease and beneficial effect of N-3 fatty acid supplementation. *Toxicol Lett.* 2013;222(2):224-232.

Lin, C. Q., M. J. Bissell. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 1993;7(9):737-743.

Losinno, A. D., V. Sorrivas, M. Ezquer, F. Ezquer, L. A. Lopez, A. Morales. Changes of myoid and endothelial cells in the peritubular wall during contraction of the seminiferous tubule. *Cell Tissue Res.* 2016;365(2):425-435.

Louei Monfared, A. Correlation of Serum Lipid Profile with Histological and Seminal Parameters of Testis in The Goat. *Int J Fertil Steril.* 2013;7(2):122-129.

Lucas, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991;156:38-50;discussion 50-5.

Maekawa, M., K. Kamimura, T. Nagano. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol.* 1996;59(1):1-13.

Manna, P. R., C. L. Stetson, A. T. Slominski, K. Pruitt. Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine.* 2016;51(1):7-21.

Mannucci, C., G. Dante, M. Miroddi, F. Facchinetti, R. D'Anna, A. Santamaria et al. Vigilance on use of drugs, herbal products, and food supplements during pregnancy: focus on fosfomycin. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;1-4.

Marker, P. C., A. A. Donjacour, R. Dahiya, G. R. Cunha. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 2003;253(2):165-174.

Martin, L. J. Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. *Mol Reprod Dev.* 2016;83(6):470-487.

- Marty, M. S., R. E. Chapin, L. G. Parks, B. A. Thorsrud. Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003;68(2):125-136.
- Maruyama, K., S. Kagota, B. N. Van Vliet, H. Wakuda, K. Shinozuka. A maternal high salt diet disturbs cardiac and vascular function of offspring. *Life Sci*. 2015;136:42-51.
- McDougal, W., A. Wein, L. Kavoussi, A. Novick, A. Partin, C. Peters et al. *Campbell-Walsh Urology*. Philadelphia, Elsevier. 2011.
- McNamara, K. M., Y. Nakamura, H. Sasano, D. J. Handelsman, U. Simanainen. Prostate epithelial AR inactivation leads to increased intraprostatic androgen synthesis. *Prostate*. 2013;73(3):316-327.
- McNeal, J. E., E. A. Redwine, F. S. Freiha, T. A. Stamey. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol*. 1988;12(12):897-906.
- Mendis-Handagama, S. M., H. B. Ariyaratne. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod*. 2001;65(3):660-671.
- Miki, J. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. *Int J Urol*. 2010;17(2):139-147.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigitel Brasil 2016: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília. 2017.
- Mital, P., B. T. Hinton, J. M. Dufour. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod*. 2011;84(5):851-858.
- Moffit, J. S., B. H. Bryant, S. J. Hall, K. Boekelheide. Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis. *Toxicol Pathol*. 2007;35(5):719-727.
- Morais, A. C., M. K. Balarini, E. O. Lopes, T. P. Menezes, F. M. Quintela, D. B. Morais et al. The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). *Anim Reprod Sci*. 2014;149(3-4):249-258.
- Morelli, A., P. Comeglio, E. Sarchielli, I. Cellai, L. Vignozzi, G. B. Vannelli et al. Negative effects of high glucose exposure in human gonadotropin-releasing hormone neurons. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:684659.
- Motrich, R. D., A. A. Ponce, V. E. Rivero. Effect of tamoxifen treatment on the semen quality and fertility of the male rat. *Fertil Steril*. 2007;88(2):452-461.
- Okreglicka, K. Health effects of changes in the structure of dietary macronutrients intake in western societies. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2015;66(2):97-105.

Panchal, S. K., S. Carnahan, L. Brown. Coconut Products Improve Signs of Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2017;72(4):418-424.

Pepe, P., F. Aragona. Prostate biopsy: results and advantages of the transperineal approach--twenty-year experience of a single center. *World J Urol.* 2014;32(2):373-377.

Perona, J. S. Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1859(9 Pt B):1690-1703.

Perraud, J. Levels of spontaneous malformations in the CD rat and the CD-1 mouse. *Lab Anim Sci.* 1976;26(2 Pt 2):293-300.

Picut, C. A., A. K. Remick, E. P. de Rijk, M. L. Simons, D. G. Stump, G. A. Parker. Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol.* 2015;43(3):326-342.

Picut, C. A., A. K. Remick. Male reproductive system. *Atlas of histology of the juvenile rat.* New York, Elsevier. 2016:227–256.

Picut, C. A., M. K. Ziejewski, D. Stanislaus. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Res.* 2018;110(3):190-227.

Pintana, H., N. Chattipakorn, S. Chattipakorn. Testosterone deficiency, insulin-resistant obesity and cognitive function. *Metab Brain Dis.* 2015;30(4):853-876.

Potter, S. J., T. DeFalco. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction.* 2017;153(4):R151-R162.

Price, D. Comparative Aspects of Development and Structure in the Prostate. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1963;12:1-27.

Prins, G. S. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology.* 1992;130(6):3703-3714.

Prins, G.S., M. Lindgren. Accessory sex glands in the male. *Knobil and Neill's physiology of reproduction.* New York, Academic Press. 2015:773–804.

Pytlowanciv, E. Z., M. E. Pinto-Fochi, V. Reame, M. G. Gobbo, D. L. Ribeiro, S. R. Taboga et al. Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood. *Prostate.* 2016;76(7):662-678.

Ramirez, A., P. P. Hu. Low High-Density Lipoprotein and Risk of Myocardial Infarction. *Clin Med Insights Cardiol.* 2015;9:113-117.

Rani, V., G. Deep, R. K. Singh, K. Palle, U. C. Yadav. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016;148:183-193.

Rato, L., M. G. Alves, S. Socorro, A. I. Duarte, J. E. Cavaco, P. F. Oliveira. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol.* 2012;9(6):330-338.

Reame, V., E. Z. Pytlowanciv, D. L. Ribeiro, T. F. Pissolato, S. R. Taboga, R. M. Goes et al. Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatogenic efficiency of wistar rats at adulthood: correlations with metabolic status. *Biol Reprod.* 2014;91(6):151.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, G. C. Fahey, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-1951.

Ribeiro, C. T., D. B. De Souza, J. L. Medeiros, Jr., W. S. Costa, M. A. Pereira-Sampaio, F. J. Sampaio. Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. *Acta Cir Bras.* 2013;28(6):419-422.

Ribeiro, C. T., R. Milhomem, D. B. De Souza, W. S. Costa, F. J. Sampaio, M. A. Pereira-Sampaio. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J Urol.* 2014;191(5 Suppl):1578-1584.

Rodriguez-Gonzalez, G. L., L. A. Reyes-Castro, C. C. Vega, L. Boeck, C. Ibanez, P. W. Nathanielsz et al. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr).* 2014;36(6):9721.

Rodriguez-Gonzalez, G. L., R. M. Viguera-Villasenor, S. Millan, N. Moran, R. Trejo, P. W. Nathanielsz et al. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J Dev Orig Health Dis.* 2012;3(5):321-326.

Rossi, F., A. Ferraresi, P. Romagnoli, L. Silvestroni, V. Santemma. Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. *Endocrinology.* 2002;143(8):3096-3104.

Roy-Burman, P., H. Wu, W. C. Powell, J. Hagenkord, M. B. Cohen. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(2):225-254.

Ruiz-Nunez, B., D. A. Dijck-Brouwer, F. A. Muskiet. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* 2016;36:1-20.

Russell, L. D., N. K. Saxena, T. T. Turner. Cytoskeletal involvement in spermiogenesis and sperm transport. *Tissue Cell.* 1989;21(3):361-379.

Russell, L. D., R. A. Ettlin, A. P. Sinha Hikim, E. D Clegg. Mammalian spermatogenesis. Histological and histopathological evaluation of the testis. Bolesta, Cache River Press. 1990:1-40.

Schalken, J. A., G. van Leenders. Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology*. 2003;62(5 Suppl 1):11-20.

Schisterman, E. F., S. L. Mumford, Z. Chen, R. W. Browne, D. Boyd Barr, S. Kim et al. Lipid concentrations and semen quality: the LIFE study. *Andrology*. 2014;2(3):408-415.

Schmidt, F. M., J. Weschenfelder, C. Sander, J. Minkwitz, J. Thormann, T. Chittka et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121971.

Scott, H. M., J. I. Mason, R. M. Sharpe. Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev*. 2009;30(7):883-925.

Scott-Emuakpor J., E. Allot, S. A. Johnson, L. E. Howard, E. Macias, S. J. Freedland et al. Angiotensin receptor signaling and prostate tumor growth in mice. *J Exp Ther Oncol*. 2017;11(2):107-115.

Sebokova, E., M. L. Garg, M. T. Clandinin. Modulation of receptor-mediated gonadotropin action in rat testes by dietary fat. *Am J Physiol*. 1988;254(6 Pt 1):E708-712.

Setchell, B. P. Male reproductive organs and semen. *Reproduction in Domestic Animals*. San Diego, Academic Press. 1991:221-250.

Setchell, B. P., T. W. Scott, J. K. Voglmayr, G. M. Waites. Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis. *Biol Reprod*. 1969;1:Suppl 1:40-66.

Shankar, E., N. Bhaskaran, G. T. MacLennan, G. Liu, F. Daneshgari, S. Gupta. Inflammatory Signaling Involved in High-Fat Diet Induced Prostate Diseases. *J Urol Res*. 2015;2(1) .

Sheehy, T., S. Sharma. The nutrition transition in Barbados: trends in macronutrient supply from 1961 to 2003. *Br J Nutr*. 2010;104(8):1222-1229.

Silva, S. A., M. G. Gobbo, M. E. Pinto-Fochi, A. Rafacho, S. R. Taboga, E. A. Almeida et al. Prostate hyperplasia caused by long-term obesity is characterized by high deposition of extracellular matrix and increased content of MMP-9 and VEGF. *Int J Exp Pathol*. 2015;96(1):21-30.

Singh, P., A. Uzgare, I. Litvinov, S. R. Denmeade, J. T. Isaacs. Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(3):653-666.

Srougi, M., A. A. Antunes, M. Dall'Oglio. Hiperplasia prostática benigna. *Atheneu*. 2010.

- Stamey, T. A., J. N. Kabalin. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *J Urol*. 1989;141(5):1070-1075.
- Stumpp, T., E. Freymuller, S. M. Miraglia. Sertoli cell morphological alterations in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. *Microsc Microanal*. 2008;14(3):225-235.
- Tain, Y. L., C. N. Hsu, J. Y. Chan, L. T. Huang. Renal Transcriptome Analysis of Programmed Hypertension Induced by Maternal Nutritional Insults. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):17826-17837.
- Teerds, K. J., I. T. Huhtaniemi. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Hum Reprod Update*. 2015;21(3):310-328.
- Thomsen, L., P. Humaidan, L. Bungum, M. Bungum. The impact of male overweight on semen quality and outcome of assisted reproduction. *Asian J Androl*. 2014;16(5):749-754.
- Thomson, A. A., G. R. Cunha, P. C. Marker. Prostate development and pathogenesis. *Differentiation*. 2008;76(6):559-564.
- Timms, B. G. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*. 2008;76(6):565-577.
- Tvrzicka, E., L. S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011;155(2):117-130.
- Uauy, R., J. Kain, C. Corvalan. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *Am J Clin Nutr*. 2011;94(6 Suppl):1759S-1764S.
- Umekawa, T., T. Sugiyama, Q. Du, N. Murabayashi, L. Zhang, Y. Kamimoto et al. A maternal mouse diet with moderately high-fat levels does not lead to maternal obesity but causes mesenteric adipose tissue dysfunction in male offspring. *J Nutr Biochem*. 2015;26(3):259-266.
- Uno, T., T. Kato, Y. Seki, E. Kawakami, S. Hayama. Methods of evaluating the spermatogenic ability of male raccoons (*Procyon lotor*). *J Reprod Dev*. 2014;60(6):421-425.
- Verze, P., T. Cai, S. Lorenzetti. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol*. 2016;13(7):379-386.
- Vigueras-Villasenor, R. M., J. C. Rojas-Castaneda, M. Chavez-Saldana, O. Gutierrez-Perez, M. E. Garcia-Cruz, O. Cuevas-Alpuche et al. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. *Acta Histochem*. 2011;113(2):214-220.

Wang, S. P., S. Chung, K. Soni, H. Bourdages, L. Hermo, J. Trasler et al. Expression of human hormone-sensitive lipase (HSL) in postmeiotic germ cells confers normal fertility to HSL-deficient mice. *Endocrinology*. 2004;145(12):5688-5693.

Wang, S. P., J. W. Wu, H. Bourdages, J. F. Lefebvre, S. Casavant, B. R. Leavitt et al. The catalytic function of hormone-sensitive lipase is essential for fertility in male mice. *Endocrinology*. 2014;155(8):3047-3053.

Wang, W. Y., G. H. Xu. [The Integration and Regulation of Hormone-Sensitive Lipase in Reproductive System]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 2015;46(1):1-5.

Watson, H. J., S. Zerwas, L. Torgersen, K. Gustavson, E. W. Diemer, G. P. Knudsen et al. Maternal eating disorders and perinatal outcomes: A three-generation study in the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *J Abnorm Psychol*. 2017;126(5):552-564.

Yan, W. J., Y. Mu, N. Yu, T. L. Yi, Y. Zhang, X. L. Pang et al. Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(7):1097-1104.

Yu, F., A. Zheng, J. Qian, Y. Li, L. Wu, J. Yang et al. Prenatal nicotine exposure results in the myocardial fibrosis in the adult male offspring rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2016;68(8):445-450.

Zar, J. H. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, Prentice-Hall. 1999.

Zhang, K., Z. Lv, X. Jia, D. Huang. Melatonin prevents testicular damage in hyperlipidaemic mice. *Andrologia*. 2012;44(4):230-236.

APÊNDICE – Protocolo de histoquímica

Hematoxilina e eosina

- Desparafinar em estufa à 60°C (10 minutos)
- Desparafinar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Hidratar em duas mudas de álcool absoluto (5 minutos cada)
- Hidratar em álcool 90%, 80% e 70% (3 minutos cada)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Corar em hematoxilina de Delafeld (3 minutos)
- Lavar em água corrente (3 minutos)
- Corar em solução aquosa de eosina (1 minuto)
- Lavar em água destilada (1 minuto)
- Desidratar em álcool 70%, 80% e 90% (1 minuto cada)
- Desidratar em duas mudas de álcool absoluto (3 minutos cada)
- Clarificar em duas mudas de xilol (5 minutos cada)
- Montar com entellan e lamínula

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/033/2014 sobre "Administração de dieta hiperlipídica durante o período peri (gestação e lactação) e pós-natal e efeitos no testículo de ratos ao desmame e na vida adulta" sob a responsabilidade de Bianca Martins Gregório, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 30/09/2014. Este certificado expira em 30/09/2018.

Rio de Janeiro, 30 de Setembro de 2014.

Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ

f.888

ANEXO B - Formato final do 1º artigo científico publicado

Histol Histopathol (2018) 33: 407-416

<http://www.hh.um.es>

**Histology and
Histopathology**

From Cell Biology to Tissue Engineering

Prenatal and/or postnatal high-fat diet alters testicular parameters in adult Wistar Albino rats

Pamella Campos-Silva, Waldemar S. Costa, Francisco J.B. Sampaio and Bianca M. Gregorio

Urogenital Research Unit, Biomedical Center, Department of Anatomy, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Summary. Here, we evaluated the effects of a high-fat diet during the prenatal and/or postnatal period on the metabolic parameters and testes of 4-month-old Wistar rats. The experimental groups, composed of male Wistar rats, were: C/C (n=8), HF/HF (n=8) (pups with the same diet as their dams, after weaning), C/HF (n=8), and HF/C (n=9) (pups with a different diet after weaning, from that of their dams). The biometric parameters, blood glucose levels, serum levels, the gonadosomatic index, sperm parameters, testes, and genital fat deposits were evaluated. The HDL-c serum levels were significantly lower in the C/HF group ($P=0.0100$), whereas animals in the HF/C group presented hypertriglyceridemia ($P=0.0005$). The sperm concentration was lower in the HF/HF group than in the HF/C group ($P=0.0072$), and sperm viability was lower in all groups receiving a high-fat diet ($P<0.0001$). The tubular compartment was the smallest in the HF/HF group ($P<0.0001$). The diameter of the seminiferous tubule was the widest in the HF/C group ($P<0.0001$). The height of the seminiferous epithelium in all groups was lower than that in the C/C group ($P<0.0001$). Testosterone and steroidogenic acute regulatory protein (STAR) expression levels were lower in the C/HF group ($P=0.0218$ and $P=0.0215$, respectively). The HF diet, regardless of the administration period, induced a limited number of metabolic changes, and modifications in the histoarchitecture of the testes and sperm parameters.

These data suggest that a HF diet may cause disturbances in spermatogenesis and fertility impairment in adulthood.

Key words: Prenatal, Postnatal period; High-fat diet, Testes, Rats

Introduction

Changes in the nutritional status during the gestation and/or lactation periods may result in permanent adaptations in the structure, physiology, and metabolism of various organs of the offspring during adulthood (Barker and Osmond, 1986; Rodriguez-Gonzalez et al., 2014). Clinical (Chavarro et al., 2014) and experimental studies (Campos-Silva et al., 2015) have revealed associations between obesity and changes in testicular morphology, as well as impairments in fertility, particularly due to a decreasing sperm quality and quantity. As a result of these findings, experimental models of nutritional programming are widely studied nowadays. Christante et al. (2013) observed that maternal obesity negatively affected gonocyte development and steroidogenesis during the first days of life in rats (Christante et al., 2013).

However, little is known about the implications of an excessive lipid intake during critical periods of development for sperm function and testicular morphology, in the adult offspring. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of the administration of a high-fat diet during gestation, lactation, and/or the postnatal period on the glycaemia, lipid profile, testicular morphology, and sperm parameters in the adult

Offprint requests to: Bianca Martins Gregorio, Urogenital Research Unit, Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de setembro 87 (fds) 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. e-mail: biancamgregorio.uef@gmail.com
DOI: 10.14670/HH-11-941

offspring.

Materials and methods

Study design

This research project was approved by the Ethics Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Institute of Biology of the State University of Rio de Janeiro (Protocol No. 0072014), in accordance with the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation. The animals were kept under controlled temperature and lighting conditions ($21 \pm 2^\circ\text{C}$; 12/12 h light/dark cycle) and received water and food *ad libitum*.

Nulliparous 3-month-old female Wistar Albino rats bred in our laboratory were mated overnight. Pregnant rats were divided into two groups (10 per group): control (C) and high-fat (HF) groups that received, a normal lipid diet (17 g of lipids per kg) or a HF diet (49 g of lipids from lard per kg) respectively, during pregnancy and lactation. After birth, the litter size was adjusted to six pups, to standardize the lactation process (Langley-Evans et al., 1996). On weaning, male offspring were monitored until four months of age, after being divided into four groups: C/C (n=8), C/HF (n=8), HF/C (n=9), and HF/HF (n=8), where the first letter corresponds to the maternal diet and the second letter corresponds to the diet of pups after weaning.

The dietary intake of the animals was recorded daily, and all diets were prepared following the recommendations of the American Institute of Nutrition (formulations AIN-93G and AIN-93M) (Reeves et al., 1993) (Table 1). The diets were made by *Pragsoluções*

(Jau, SP, Brazil - www.pragsolucoes.com.br). During the experimental period, body mass was monitored weekly. In addition, at three months of age, the systolic blood pressure of the offspring was measured weekly, using the noninvasive method of tail-cuff plethysmography (Insight, São Paulo, Brazil).

Oral glucose tolerance test (OGTT)

Oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed in both dams (before mating and after weaning) and pups (at four months of age). To perform the OGTT, the animals underwent 12 h fasting and received a hypertonic glucose solution (2 g/kg body mass) by orogastric gavage. Blood was collected from the tail vein before glucose administration (time 0) and at 15, 30, 60, and 120 min after the glucose load, and blood glucose was measured using a glucometer (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brazil). The area under the curve (AUC) was measured to assess glucose tolerance.

Sacrifice

After 12 hours of fasting, rats in the C/C, C/HF, HF/C, and HF/HF groups were killed by CO_2 inhalation, at four months of age. Blood samples were collected from the heart (right atrium) by cardiac puncture, for the serum analysis. The genital fat pad and testes were dissected, weighed, fixed (in formaldehyde and/or frozen), and prepared for histomorphometry and western blotting analyses. The gonadosomatic index was calculated by using the following formula: (testicular mass / body mass) $\times$ 100 (Uno et al., 2014).

Serum biochemistry and hormone levels

Serum was separated by centrifugation (3000 rpm, for 8 min). The concentrations of total cholesterol (TC), HDL-c, and triacylglycerol (TAG) were quantified using a colorimetric assay (BioSystems, Cat 11506, Barcelona, Spain), whereas the analyses for insulin and testosterone were performed by using available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits: the rat/mouse insulin kit (Millipore, Cat. EZRMI-13K, St Charles, MO, USA) and the general testosterone kit (Enzo, Cat. ADI-900-065, New York, USA), respectively.

Sperm analyzes

The sperm was collected from the tail of the epididymis, and a spermatic solution was prepared to determine the concentration and motility of sperm in a Neubauer chamber. Sperm viability was evaluated by the hypo-osmotic swelling test, and 200 spermatozooids were evaluated per rat (Ribeiro et al., 2014).

Testes histomorphometry

The testes were fixed in Bouin's solution for 24 h,

Table 1. Composition of experimental diets according to the American Institute of Nutrition formulations AIN-93G and AIN-93M (Reeves et al., 1993).

Ingredients (g/Kg)	AIN-93 G		AIN-93 M	
	C	HF	C	HF
Corn starch	539.486	299.486	465.700	192.600
Casein	190.00	230.00	140.00	175.00
Sucrose	100.00	100.00	100.00	100.00
Soybean oil	70.00	70.00	40.00	40.00
Lard	0.00	200.00	0.00	238.00
Fiber	50.00	50.00	50.00	50.00
L-cislin	3.00	3.00	1.80	1.80
Colin	2.50	2.50	2.50	2.50
Antioxidant	0.014	0.014	0.008	0.060
Minerals mixed	35.00	35.00	35.00	35.00
Vitamins mixed	10.00	10.00	10.00	10.00
TOTAL (g)	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
Energy (Kcal/Kg)	3960.00	4960.00	3190.00	4380.00
Carbohydrate (%)	64.00	32.00	76.00	36.00
Protein (%)	19.00	19.00	14.00	14.00
Lipid (%)	17.00	49.00	10.00	50.00

C, control diet; HF, high-fat diet.

and in formaldehyde for 48 h at room temperature, after which they were embedded in paraffin. Subsequently, the material was sectioned at a thickness of 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin. Digital images were obtained using an Olympus BX51 light microscope with a coupled digital camera (Olympus DP70, Tokyo, Japan). The histomorphometric analysis was performed using the Image J software.

The diameter of the seminiferous tubule and the height of the seminiferous epithelium (25 fields/animal) were determined using the 'straight line' tool. The diameter of the seminiferous tubule was measured using a straight line that passed through the center of the tubule. For this analysis, tubules with an irregular shape were excluded (Ribeiro et al., 2013). For the measurement of the seminiferous epithelium height, we used the same tool and determined the distance from the tunica propria to the inner germinal cell, excluding the spermatozooids (Ribeiro et al., 2013). These analyzes were performed with an objective of 10 $\times$ (seminiferous tubule diameter) and a 20 $\times$ (seminiferous epithelium height).

The volume densities of the tubular (seminiferous epithelium, lumen, and tunica propria) and intertubular (interstitial cells, vessels, and nerves) compartments were determined using the 'cell counter' and 'grid' tools. The test grid, containing 100 points, was superimposed over the testicular photomicrographs, and each structure that was touched by a point was counted. These analyzes were performed using a 40 $\times$ objective (25 fields/animal), and the results were expressed as percentages (De Souza et al., 2012).

The Sertoli cells were quantified by direct counting ('cell counter' tool). This counting was made randomly, disregarding the stage of the seminiferous epithelium cycle. However, only Sertoli cells with a visible nuclear profile were counted (Kotsampasi et al., 2009). For this, we used an immersion oil objective (60 $\times$) to evaluate 30

sections of the seminiferous tubules from each animal.

Western blotting

Frozen samples of the testes (100 mg) were homogenized in RIPA lysis buffer containing protease inhibitors. Lysates were centrifuged for 20 min at 4°C, and the supernatants were collected. Equal amounts of total protein were resuspended in sodium dodecyl sulfate (SDS)-containing sample buffer, heated for 5 min at 100°C, and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, proteins were electroblotted on a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). The membrane was blocked, probed with the following primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany): rabbit anti-STAR - 1:200 (30 kDa, SC-25806) and mouse anti- β -actin - 1:200 (43 kDa, SC-81178), washed, and incubated with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies, respectively. Protein expression levels were determined using an ECL kit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). Signals were visualized by autoradiography, and the quantification of the bands was carried out by densitometry using the Image J software.

Data analysis

The data were tested for their compatibility with a normal distribution, and reported as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Differences between groups were assessed using the unpaired Student's t-test and a one-way analysis of variance (ANOVA), with a subsequent *post hoc* Bonferroni test. Differences were considered statistically significant if $P \leq 0.05$ (Prism 5.03, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Table 2. Biometry, food intake, gonad measurement, serum biochemistry, and hormone levels in the experimental groups.

Data	C/C	C/HF	H/F	H/HF
Body mass (g)	423.90 $\pm$ 48.85	415.90 $\pm$ 58.92	421.10 $\pm$ 55.58	409.10 $\pm$ 58.16
Epididymal fat mass (g)	6.47 $\pm$ 2.87	6.35 $\pm$ 1.26	4.45 $\pm$ 0.20	6.65 $\pm$ 2.68
Food intake - g/day/animal (g)	17.35 $\pm$ 4.30	15.05 $\pm$ 4.56	15.77 $\pm$ 5.91	14.78 $\pm$ 6.38
Systolic blood pressure (mmHg)	167.00 $\pm$ 12.36	160.10 $\pm$ 25.00	182.80 $\pm$ 14.13	163.60 $\pm$ 28.44
Testis mass (g)	1.72 $\pm$ 0.10	1.74 $\pm$ 0.14	1.76 $\pm$ 0.15	1.74 $\pm$ 0.18
Gonadosomatic index (%)	0.39 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.03
OGTT (AUC - a.u.)	268986 $\pm$ 16385.00	282388 $\pm$ 12534.00	251442 $\pm$ 19400.00	250158 $\pm$ 32170.00
Insulin (ng/mL)	1.11 $\pm$ 0.86	1.03 $\pm$ 0.60	2.04 $\pm$ 0.77	1.69 $\pm$ 0.53
Total cholesterol (mg/dL)	54.00 $\pm$ 9.63	51.14 $\pm$ 4.38	63.75 $\pm$ 17.04	53.71 $\pm$ 9.21
HDL-c (mg/dL)	41.43 $\pm$ 6.24	33.29 $\pm$ 2.87 ^a	41.57 $\pm$ 5.80 ^b	35.80 $\pm$ 3.49
Triacylglycerols (mg/dL)	92.50 $\pm$ 24.00	83.86 $\pm$ 13.95	146.80 $\pm$ 37.03 ^{ab}	87.43 $\pm$ 20.82 ^c
Testosterone (ng/mL)	11.39 $\pm$ 2.13	7.85 $\pm$ 1.30 ^a	9.34 $\pm$ 1.69	10.43 $\pm$ 0.85

C/C, H/HF (pups that had the same diet as their dams after weaning), C/HF, H/F (pups that after weaning had a different diet from that of their dams). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significance was assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent *post hoc* Bonferroni test. ^a: indicates a statistical difference in the C/C group; ^b: indicates a statistical difference in the C/HF group; ^c: indicates a statistical difference in the H/F group, when $P \leq 0.05$.

Results

Maternal data

During gestation and lactation, the gain in body mass for HF dams did not differ from that of the C mothers ($P=0.2388$). Likewise, both groups were characterized by similar glucose curve AUC values, measured at mating and after weaning ($P=0.6276$ and $P=0.0534$, respectively). However, the food intake of C dams was higher than that of HF dams at the same time point ($P=0.0163$).

Offspring data

Biometry, food intake, and gonad measurement

Body mass and food intake were similar in the C/C,

C/HF, HF/C, and HF/HF groups ($P=0.9339$; $P=0.5747$, respectively). The systolic blood pressure of rats in the groups that received the HF diet prenatally and/or postnatally did not differ from that of C/C group ($P=0.3554$) (Table 2).

Moreover, table 2 shows that no differences were observed in the genital fat pad, testicular mass, and gonadosomatic index, in the different groups ($P=0.3144$; $P=0.9001$; $P=0.0921$, respectively).

Biochemistry and hormone levels

In addition, glucose and insulin levels were similar among the experimental groups ($P=0.0576$; $P=0.0503$; $P=0.0505$, respectively). The concentrations of total cholesterol were similar across all offspring groups ($P=0.3616$). However, the concentration of HDL-c in the C/HF group was lower than those in the C/C and HF/C

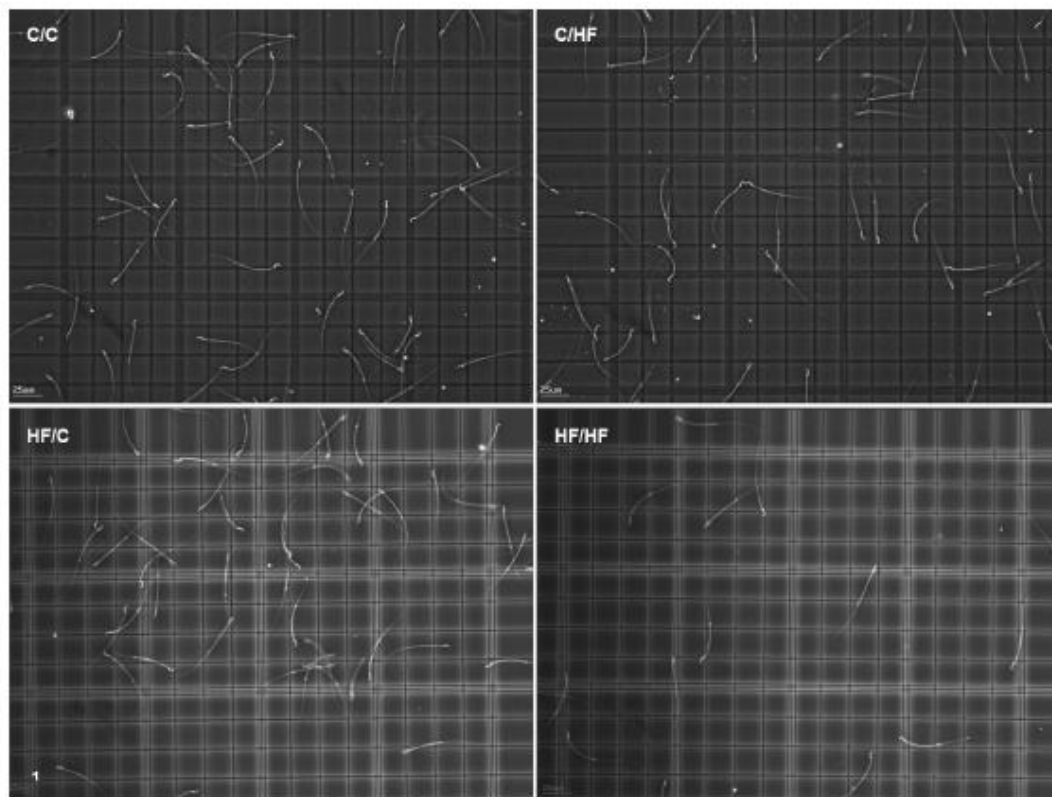


Fig. 1. Sperm concentration. C/C (control/control), C/HF (control/high-fat), HF/C (high-fat/control) and HF/HF (high-fat/high-fat). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significant differences were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. C/C, C/HF and HF/C, normal production; HF/HF, lower sperm concentration. The figure contains the scale bar of 25 μ m generated by the sperm class analyzer (SCA) software. Phase-contrast optics. $\times 100$.

groups ($P=0.0100$). Furthermore, the TAG level was higher in HF/C rats than in other groups ($P=0.0005$). In addition, the testosterone level in the C/HF group was lower than that in the C/C group ($P=0.0218$) (Table 2).

Sperm parameters

The sperm concentration in the HF/HF group was lower than that in the HF/C group by 73% ($P=0.0072$) (Fig. 1). The viability of sperm in all groups that were exposed in any way to the HF diet was lower than that in the C/C group (C/HF: 28%; HF/C: 49%; HF/HF: 57%). Furthermore, in HF/HF rats, the sperm viability was 39% lower than that in the C/HF group ($P<0.0001$). Sperm motility values did not differ significantly between the groups ($P=0.5217$) (Table 3).

Testicular parameters

The volumetric density of the tubular compartment in the HF/HF group was 19% lower than the one measured in other groups ($P<0.0001$). In the HF/HF group the volumetric density of the intertubular compartment, was increased by 276%, 280%, and 296% compared to the values observed in the C/C, C/HF, and HF/C groups, respectively ($P<0.0001$) (Table 3).

The diameter of the seminiferous tubule in the HF/C group was wider than in the C/C, C/HF, and HF/HF groups, by 13%, 16%, and 11%, respectively ($P<0.0001$; Fig. 2). The seminiferous epithelium height in the C/HF, HF/C, and HF/HF groups was 8%, 13%, and 31% lower than that in the C/C group. In addition, the HF/HF group exhibited the lowest seminiferous

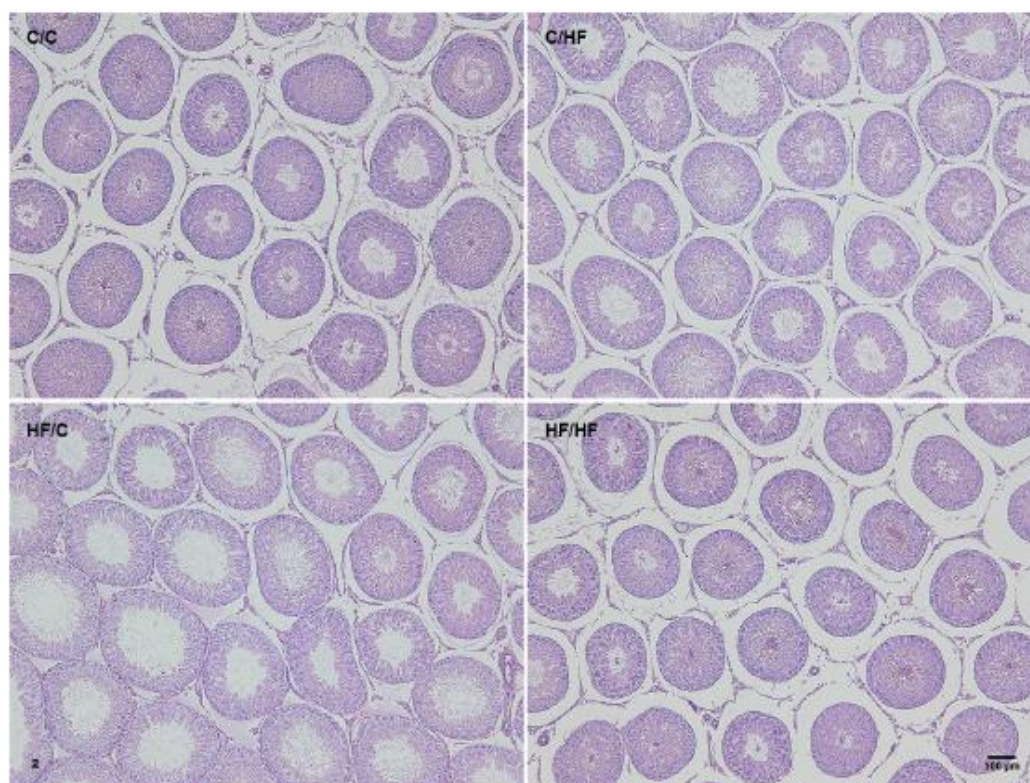


Fig. 2. Seminiferous tubule diameter. C/C (control/control), C/HF (control/high-fat), HF/C (high-fat/control) and HF/HF (high-fat/high-fat). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significant differences were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. HF/C, testes with the largest seminiferous tubule diameter; the other groups preserved the testis histoarchitecture. H-E staining. $\times 100$.

Maternal diet and testicular parameters

Table 3. Testicular parameters of the experimental groups.

Data	C/C	C/HF	H/F/C	H/F/HF
Sperm concentration (sptz/mL)	$1.71 \times 10^6 \pm 4.05 \times 10^5$	$1.29 \times 10^6 \pm 6.70 \times 10^5$	$2.10 \times 10^6 \pm 5.61 \times 10^5$	$5.70 \times 10^6 \pm 2.46 \times 10^6$ ^c
Sperm viability (%)	19.57 ± 2.94	14.00 ± 2.37 ^a	9.92 ± 1.93 ^a	8.50 ± 2.63 ^{a,b}
Sperm motility (%)	47.36 ± 19.09	40.40 ± 14.49	52.35 ± 13.54	52.68 ± 3.68
Tubular compartment Vv (%)	93.97 ± 0.96	94.05 ± 0.93	94.20 ± 0.85	75.91 ± 2.24 ^{a,b,c}
Inter-tubular compartment Vv (%)	6.14 ± 0.84	6.08 ± 0.94	5.83 ± 0.79	23.09 ± 2.24 ^{a,b,c}
Seminiferous tubule diameter (μ m)	262.90 ± 9.83	256.80 ± 13.19	297.60 ± 11.91 ^{a,b}	267.90 ± 8.31 ^c
Seminiferous epithelium height (μ m)	60.52 ± 3.18	55.68 ± 3.46 ^a	52.70 ± 2.37 ^a	41.87 ± 2.69 ^{a,b,c}
Sertoli cells no./cross section	21.86 ± 0.98	20.68 ± 0.15	20.86 ± 1.16	20.56 ± 1.07

C/C, HF/HF (pups that had the same diet as their dams after weaning), C/HF, HF/C (pups that after weaning had a different diet from that of their dams). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significance was assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. ^a: indicates a statistical difference in the C/C group; ^b: indicates a statistical difference in the C/HF group; ^c: indicates a statistical difference in the HF/C group, when $P \leq 0.05$.

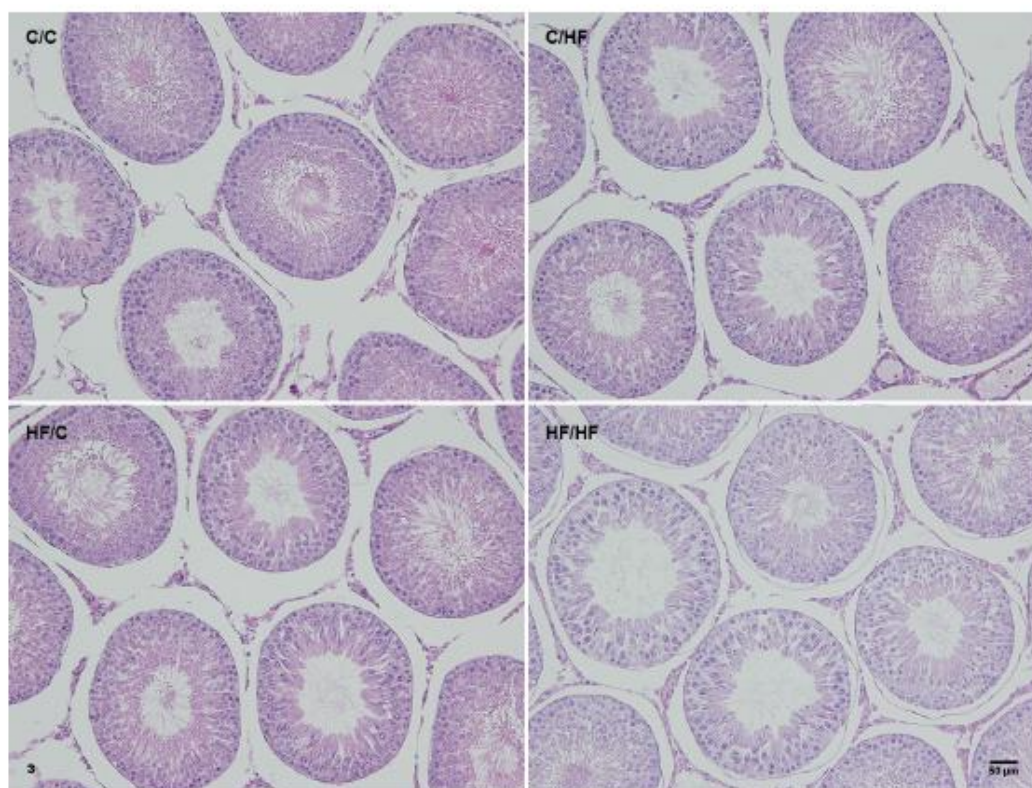


Fig. 3. Seminiferous epithelium height. C/C (control/control), C/HF (control/high-fat), HF/C (high-fat/control) and HF/HF (high-fat/high-fat). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significant differences were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent post hoc Bonferroni test. C/C, preserved testis histoarchitecture; C/HF, a decreased seminiferous epithelium height; HF/C, a decreased seminiferous epithelium height; HF/HF, the lowest seminiferous epithelium height. H-E staining. $\times 200$.

epithelium height, which was 25% and 21% lower than those in the C/HF and HF/C groups, respectively ($P < 0.0001$; Fig. 3). The number of Sertoli cells in a cross section of the seminiferous tubule was similar among all groups ($P = 0.0509$) (Table 3).

Moreover, the expression level of the STAR protein in C/HF rats was lower than in that in C/C animals ($P = 0.0215$; Fig. 4).

Discussion

Testicular development and spermatogenesis (proliferation phase) begin during the intrauterine period (Dolci et al., 2015). The nutritional status during the critical period of ontogenesis is pivotal for the maturation of offspring organ systems. Our findings suggest that the administration of a HF diet during gestation and lactation does not affect the maternal metabolism. It has been previously noted that this type of diet is not closely correlated with maternal obesity (Gregorio et al., 2010). Similarly, it was observed that the HF diet was not able to alter the body mass and the testicular mass of the offspring. Since food intake was similar among experimental groups, it is believed that the increase in energy following the administration of a HF diet leads to animals that achieve satiety more easily.

Notably, the HF diet reduced the HDL-c plasma levels in the C/HF group and increased the TAG serum levels in the offspring of mothers who had received a HF diet throughout gestation and lactation. Obesogenic diets increase the plasma levels of TC and LDL-c, and decrease the level of HDL-c, a lipoprotein that is fundamentally important in the reverse cholesterol transport (Ramirez and Hu, 2015). It is known that dyslipidemia is linked to infertility (Schisterman et al., 2014). Moreover, experimental studies have shown that hyperlipidemic mice fed a HF diet exhibit histopathological changes in their testes (Zhang et al., 2012).

In addition to hypertriglyceridemia, a prenatal HF diet causes structural changes in the testes, that could compromise sperm production. In animals that had received a prenatal HF diet, the sperm viability and seminiferous epithelium height were decreased, compared to the corresponding parameters in the C/C group. These findings demonstrate the deleterious, but limited effects, of the consumption of a HF diet during gestation and lactation. Experimental (Louei Monfared, 2013) and clinical studies (Ergun et al., 2007) have already shown a negative correlation between TAG levels, on the one hand, and sperm quality and morphometric parameters on the other.

Despite these findings, the mechanism underlying the direct association between serum TAG levels and testicular characteristics remains unclear. The hormone-sensitive lipase (HSL) is responsible for the conversion of cholesterol esters to free cholesterol, as well as for the hydrolysis of TAG leading to the release of fatty acids, which is important for energy production. HSL is ubiquitously expressed in the male reproductive system and may play an important role in the regulation of the pathophysiological processes in the testes (Wang and Xu, 2015). Previous studies have shown that male mice, in which the *Lipe* gene, encoding for HSL, was knocked out, were infertile and presented unique morphological abnormalities such as round, elongating spermatids, deficient spermatogenesis, and azoospermia (Wang et al., 2004, 2014). Although we did not measure HSL levels, the possible reduction in the amount of this enzyme may have negatively influenced testicular morphology and sperm viability.

A HF diet influences the lipid composition of the plasma membrane in animal cells (Perona, 2017) and the excess cholesterol decreases the fluidity of the membrane (De Craene et al., 2017). In this study, we observed that the HF diet, regardless of the period of administration, promoted a reduction in sperm viability, which may suggest disruptions in the functional integrity of the sperm plasma membrane (Ribeiro et al., 2014). The concentration of sperm decreased in the group that had received a HF diet throughout their lives, compared to that in the HF/C group, showing that the consumption of a C diet after weaning minimized the damages caused by the intake of a HF diet during the prenatal period. Sperm motility was not altered by this fetal

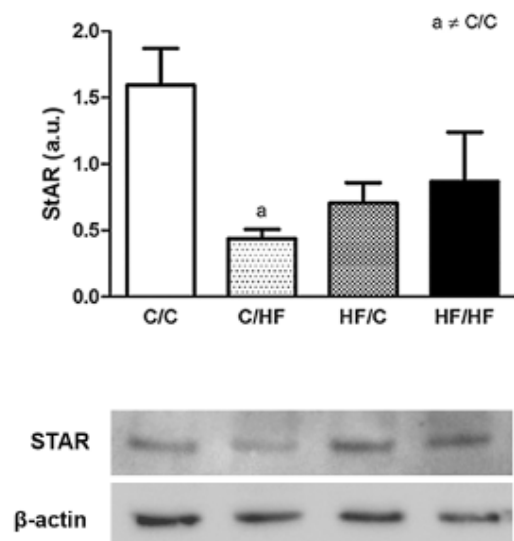


Fig. 4. STAR protein expression levels (mean $\pm$ SD) and representative protein bands, as determined by western blot. C/C (control/control), C/HF (control/high-fat), HF/C (high-fat/control) and HF/HF (high-fat/high-fat). Significant differences were assessed using the analysis of variance (ANOVA), and a subsequent post hoc Bonferroni test. ^a indicates a statistical difference for the C/C group, when $P \leq 0.05$.

programming model. In support of these results, we observed that the volumetric density of the tubular compartment was reduced in the HF/HF group. The tubular compartment represents the larger part of the testis, occupying 95% of the testicular parenchyma (Morais et al., 2014) and is fundamental for the production of spermatozoa.

Morphometric parameters, such as the diameter of the seminiferous tubule and the height of the seminiferous epithelium are also indicators of the spermatogenic activity (Ribeiro et al., 2014). The diameter of the seminiferous tubules was larger in rats that were exposed to a HF diet during the prenatal period. The high cholesterol levels in the diet can increase lipid peroxidation levels in various tissues, compromising cell integrity (Rani et al., 2016). Therefore, we believe that the lipids passing through the placenta may have caused the sloughing of the seminiferous epithelium, that consequently increased the amount of luminal cellular debris. This condition may have caused the obstruction of the efferent ducts, and impaired the passage of fluid from the testes to the epididymis, thus widening the diameter of the seminiferous tubule (Moffit et al., 2007).

The group that was exposed to a prenatal HF diet also exhibited a reduction in the height of the seminiferous epithelium. Similarly, this parameter was lower in the group that had been fed a HF diet postnatally. The largest decrease was observed in the HF/HF group, which had received a HF diet throughout the life of the rats, confirming the negative influence of a lipid-rich diet on spermatogenesis. Excess cholesterol promotes the rigidity of the plasma membrane and alters its physico-chemical properties (Perona, 2017). However, no data exist on fetal programming using a high cholesterol diet, and its effects on the testicular morphology of adult animals are unknown. It has been reported that maternal obesity alters the development of gonocytes, and decreases sex steroid levels in rat pups, during the first days of life (0.5 to 14.5 days postpartum) (Christante et al., 2013). The gonocytes represent the precursors of male germ cells (spermatogonia), and therefore a reduction in their number may impair sperm production in adult offspring.

With respect to the reduction of the height of the seminiferous epithelium, our work and that of others (Reame et al., 2014) has demonstrated that the administration of a HF diet during the postnatal period negatively affects serum testosterone levels, when compared to those in the C/C group. Testosterone, a hormone produced by Leydig cells, regulates the testicular maturation and differentiation of cells of the spermatogenic lineage, which form the seminiferous epithelium, and are responsible for the production of spermatozoa (Martin, 2016). Although we have not analyzed Leydig cells, it is known that they complete their differentiation at puberty (Teerds and Huhtaniemi, 2015). In this regard, it is possible that a HF diet directly delays the maturation of Leydig cells, while this was not

observed when the exposure to excess dietary cholesterol occurred only during the prenatal period.

In agreement with our serum testosterone levels results and data published by Li et al. (2013), the expression of the STAR protein was reduced in the C/HF group. This may be potentially due to the fact that the group that had received the high-fat diet throughout life (HF/HF) had undergone an adaptation process. The predictive adaptive response implies that exposure to insults during the prenatal period causes metabolic adaptations in the offspring, that ensure their survival in similar conditions during the postnatal period (Gallou-Kabani et al., 2007; Bateson et al., 2014).

In the interstitial cells of the testis, the STAR protein is responsible for initiating the conversion of cholesterol to testosterone, and facilitating the transport of free cholesterol to the inner mitochondrial membrane. Subsequently, testosterone is synthesized in a series of steroidogenic steps, catalyzed by different proteins (Manna et al., 2016). Sebokova et al. (1988) observed that dietary lipids can affect the organization of the plasma membrane in the testis. Specifically, when the availability of LH receptors, located in Leydig cells, is altered, testosterone production is compromised (Sebokova et al., 1988).

Sertoli cells are the most resistant structures in the testes and the last ones to be modified when exposed to insults. It is known that alterations in the number of Sertoli cells are rarely observed (Stumpp et al., 2008). Our study is the first to evaluate the effect of fetal programming using a HF diet on the number of Sertoli cells. The number of Sertoli cells did not differ among the tested groups, that may suggest that the exposure time to the HF diet was insufficient to cause changes in this parameter.

In conclusion, a HF diet, regardless of its administration period, promotes a limited number of metabolic changes. However, it alters sperm parameters, namely by reducing sperm concentration and viability. Several important morphological and morphometrical changes were also observed in the testes, where the diameter of the seminiferous tubule widened, whereas the volumetric density of the tubular compartment and the height of the seminiferous epithelium decreased. These data suggest that the consumption of a HF diet may lead to disturbances in spermatogenesis, and impair fertility during adulthood.

Acknowledgements. This research was supported by grants from Brazilian agencies: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERJ (Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro). The authors would like to thank Píscila Fernandes dos Santos for her technical assistance.

References

Barker D.J.P. and Osmond C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*

Maternal diet and testicular parameters

415

- 1, 1077-1081.
- Bateson P., Gluckman P. and Hanson M. (2014). The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *J. Physiol.* 592, 2357-2368.
- Campos-Silva P., Furriel A., Costa W.S., Sampaio F.J. and Gregorio B.M. (2015). Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats. *Int. Braz. J. Urol.* 41, 569-575.
- Chavarro J.E., Minguez-Alarcon L., Mendiola J., Cutillas-Tolin A., Lopez-Espin J.J. and Torres-Cartero A.M. (2014). Trans fatty acid intake is inversely related to total sperm count in young healthy men. *Hum. Reprod.* 29, 429-440.
- Christante C.M., Taboga S.R., Pinto-Fochi M.E. and Goes R.M. (2013). Maternal obesity disturbs the postnatal development of gonocytes in the rat without impairment of testis structure at prepubertal age. *Reproduction* 146, 549-558.
- De Craene J.O., Bertazzi D.L., Bär S. and Friant S. (2017). Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 634.
- De Souza D.B., Silva D., Cortez C.M., Costa W.S. and Sampaio F.J. (2012). Effects of chronic stress on penile corpus cavernosum of rats. *J. Androl.* 33, 735-739.
- Dolci S., Campob F. and De Felici M. (2015). Gonadal development and germ cell tumors in mouse and humans. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 45, 114-123.
- Ergun A., Kose S.K., Aydos K., Ata A. and Avcı A. (2007). Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. *Arch. Androl.* 53, 21-23.
- Gallou-Kabani C., Vigé A., Gross M.S., Boileau C., Rabes J.P., Fruchart-Najib J., Jais J.P. and Junien C. (2007). Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1095-E1100.
- Gregorio B.M., Souza-Mello V., Carvalho J.J., Mandarim-de-Lacerda C.A. and Aguilera M.B. (2010). Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203, 495.e1-8.
- Kotsampasi B., Balaskas C., Papadomichelakis G. and Chadio S.E. (2009). Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 135-147.
- Langley-Evans S.C., Gardner D.S. and Jackson A.A. (1996). Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Nutr.* 126, 1578-1585.
- Li Y., Liu L., Wang B., Xiong J., Li Q., Wang J. and Chen D. (2013). Impairment of reproductive function in a male rat model of non-alcoholic fatty liver disease and beneficial effect of N-3 fatty acid supplementation. *Toxicol. Lett.* 222, 224-232.
- Louei Monfared A. (2013). Correlation of serum lipid profile with histological and seminal parameters of testis in the goat. *Int. J. Fertil. Steril.* 7, 122-129.
- Manna P.R., Stelson C.L., Siominski A.T. and Pruthi K. (2016). Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine* 51, 7-21.
- Martin L.J. (2016). Cell interactions and genetic regulation that contribute to testicular Leydig cell development and differentiation. *Mol. Reprod. Dev.* 83, 470-487.
- Moffit J.S., Bryant B.H., Hall S.J. and Boekelheide K. (2007). Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis. *Toxicol. Pathol.* 35, 719-727.
- Morais A.C., Balarini M.K., Lopes E.O., Menezes T.P., Quintela F.M., Morais D.B., Gomes Mde L. and Matta S.L. (2014). The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). *Anim. Reprod. Sci.* 149, 249-258.
- Perona J.S. (2017). Membrane lipid alterations in the metabolic syndrome and the role of dietary oils. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859, 1690-1703.
- Ramirez A. and Hu P.P. (2015). Low high-density lipoprotein and risk of myocardial infarction. *Clin. Med. Insights. Cardiol.* 9, 113-117.
- Rani V., Deep G., Singh R.K., Palle K. and Yadav U.C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life. Sci.* 148, 183-193.
- Reame V., Pylowanov E.Z., Ribeiro D.L., Pissolato T.F., Taboga S.R., Goes R.M. and Pinto-Fochi M.E. (2014). Obesogenic environment by excess of dietary fats in different phases of development reduces spermatogenic efficiency of Wistar rats at adulthood: correlations with metabolic status. *Biol. Reprod.* 91, 151.
- Reeves P.G., Nielsen F.H. and Fahey G.C. Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123, 1939-1951.
- Ribeiro C.T., De Souza D.B., Medeiros J.L. Jr., Costa W.S., Pereira-Sampaio M.A. and Sampaio F.J. (2013). Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testis. *Acta. Cirurg. Bras.* 28, 419-422.
- Ribeiro C.T., Milhomem R., De Souza D.B., Costa W.S., Sampaio F.J. and Pereira-Sampaio M.A. (2014). Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *J. Urol.* 191, 1578-1584.
- Rodriguez-Gonzalez G.L., Reyes-Castro L.A., Vega C.C., Boeck L., Ibanez C., Nathanielsz P.W., Larrea F. and Zambrano E. (2014). Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr.)* 36, 9721.
- Schisterman E.F., Mumford S.L., Chen Z., Browne R.W., Boyd Barr D., Kim S. and Buck Louis G.M. (2014). Lipid concentrations and semen quality: the LIFE study. *Andrology* 2, 408-415.
- Sebokova E., Garg M.L. and Clandinin M.T. (1988). Modulation of receptor-mediated gonadotropin action in rat testes by dietary fat. *Am. J. Physiol.* 254, E708-E712.
- Stumpp T., Freymüller E. and Miraglia S.M. (2008). Sertoli cell morphological alterations in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. *Microsc. Microanal.* 14, 225-235.
- Teetds K.J. and Huhtaniemi I.T. (2015). Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Hum. Reprod. Update.* 21, 310-328.
- Uno T., Kato T., Seki Y., Kawakami E. and Hayama S. (2014). Methods of evaluating the spermatogenic ability of male raccoons (*Procyon lotor*). *J. Reprod. Dev.* 60, 421-425.
- Wang W.Y. and Xu G.H. (2015). The integration and regulation of hormone-sensitive lipase in reproductive system. *Sheng. Li. Ke. Xue. Jih. Zhan.* 46, 1-5 (in chinese).
- Wang S.P., Chung S., Soni K., Bourdages H., Herro L., Trasler J. and Mitchell G.A. (2004). Expression of human hormone-sensitive lipase

Maternal diet and testicular parameters

- (HSL) in postmeiotic germ cells confers normal fertility to HSL-deficient mice. *Endocrinology* 145, 5688-5693.
- Wang S.P., Wu J.W., Bourdages H., Lefebvre J.F., Casavant S., Leavitt B.R., Labuda D., Trasler J., Smith C.E., Hemo L. and Mitchell G.A. (2014). The catalytic function of hormone-sensitive lipase is essential for fertility in male mice. *Endocrinology* 155, 3047-3053.
- Zhang K., Lv Z., Jia X. and Huang D. (2012). Melatonin prevents testicular damage in hyperlipidaemic mice. *Andrologia* 44, 230-236.
- Accepted October 30, 2017

ANEXO C - Comprovação de submissão do 2^o artigo científico

12/04/2018

Terra Mail - Message - pamellacampos@terra.com.br

Fwd: Successfully received: submission Fetal programming by high-fat diet promoted prostatic atrophy in adult Wistar Albino rats for The Journal of Nutritional Biochemistry

De: Bianca Martins Gregorio <biancamgregorio.uerj@gmail.com>

Para: "Pamella C. Silva" <pamellacampos@terra.com.br>

Data: Qui 12/04/18 11:18

----- Forwarded message -----

From: **The Journal of Nutritional Biochemistry** <EvisSupport@elsevier.com>

Date: 2018-04-12 11:01 GMT-03:00

Subject: Successfully received: submission Fetal programming by high-fat diet promoted prostatic atrophy in adult Wistar Albino rats for The Journal of Nutritional Biochemistry

To: biancamgregorio.uerj@gmail.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: JNB_2018_326

Title: Fetal programming by high-fat diet promoted prostatic atrophy in adult Wistar Albino rats

Journal: The Journal of Nutritional Biochemistry

Dear Dr. Gregorio,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in The Journal of Nutritional Biochemistry . Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JNB and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

The Journal of Nutritional Biochemistry

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

--

Att,

Bianca Martins Gregório, RD, PhD
Prof. Adjunto de Anatomia Humana
Depto Anatomia / IBRAG - UERJ
Unidade de Pesquisa Urogenital - <http://urogenitalresearch.org/>
Tel: +55 21 2868-8021

CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5949190267189565>

Manuscript Details

Manuscript number	JNB_2018_326
Title	Fetal programming by high-fat diet promoted prostatic atrophy in adult Wistar Albino rats
Article type	Research Paper

Abstract

We investigated the effect of a high-fat diet on body metabolism and ventral prostate morphology in 4-months-old offspring. The mother was fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet during gestation and lactation. At weaning, the offspring diet remained the same (C/C, n=8; HF/HF, n=8) or it was switched (C/HF, n=8; HF/C, n=9). Biometry, blood pressure (BP), glucose, and lipid metabolism were evaluated, and the ventral prostate underwent morphometric and immunohistochemistry analysis. Body mass and BP were similar among groups. Triacylglycerol of HF/C increased, and the C/HF group had decreased HDL-c levels ($P=0.0005$ and $P=0.0100$, respectively). All groups on the HF diet presented hyperglycemia ($P=0.0064$), but insulin and glucose tolerance were not altered. Serum testosterone diminished in the C/HF group ($P=0.0218$). The prostate of all groups fed with the HF diet displayed reduced acinar area ($P<0.0001$). The epithelium height was smaller in HF/C and HF/HF groups compared with C/C and C/HF groups ($P<0.0001$), and the volume density of epithelium was lower in HF/C group compared with the C/C and C/HF groups ($P=0.0024$). Finally, the volume density of smooth muscle cells diminished in C/HF and HF/C groups ($P=0.0013$), and the volume density of connective tissue was also reduced in HF/C and HF/HF groups ($P<0.0001$). High-fat diet intake during gestation, lactation, and the postnatal life leads to prostatic atrophy. These data suggest that a high-fat diet might impair prostate secretory activity and contractility, and thus disturb reproductive function in adulthood.

Keywords	High-fat diet; Maternal nutrition; Postnatal period; Prostate; Rats
Corresponding Author	Bianca Gregorio
Order of Authors	Pamella Campos-Silva, Angelo de Souza Fernandes, Waldemar Silva Costa, Francisco Sampaio, Bianca Gregorio
Suggested reviewers	Sebastião Taboga, Mauricio Chagas, Claudine Junien, Simon Langley-Evans

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.doc [Cover Letter]

Highlights.doc [Highlights]

Manuscript.docx [Manuscript File]

Fig. 1.tif [Figure]

Fig. 2.tif [Figure]

Fig. 3.tif [Figure]

Table 1.docx [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.



www.anatomia.uerj.br

DOAÇÃO VOLUNTÁRIA DE CORPOS

O DAN mantém um Programa de Doação de Corpos,

Esse Programa filantrópico e voluntário é importante para manter as aulas práticas para os cursos da área biomédica, principalmente Medicina e Odontologia,

Qualquer pessoa pode participar, sem ônus.

Para participar do programa o doador deve preencher o formulário que pode ser obtido na página internet do departamento em www.anatomia.uerj.br, identificando duas pessoas que serão os executores de sua vontade,

Após o preenchimento as assinaturas devem ser reconhecidas em cartório e o documento entregue na secretaria do departamento (ou enviado por correio para o endereço indicado).

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CENTRO BIOMÉDICO – INSTITUTO DE BIOLOGIA – DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

Ed. Prof. América Piquet Carneiro - Av. 28 de Setembro, 87 fds - térreo. CEP: 20551-030, RJ, Brasil - Tel: (21) 2868-8519; Fax: 2868-8033



April 12, 2018.

Urogenital Research Unit

Department of Anatomy– State University of Rio de Janeiro

The Journal of Nutritional Biochemistry

Dr Bernhard Hennig (Editor-in-Chief)

Dear Editor-in-Chief,

On behalf of the authors, I submit the manuscript entitled **“Fetal programming by high-fat diet promoted prostatic atrophy in adult Wistar Albino rats”** for publishing.

The authors fulfilled all conditions required for authorship and accept responsibility for content of the manuscript. The authors have read and approved the submission of the manuscript to *The Journal of Nutritional Biochemistry*. This manuscript, or part of it, neither has been published nor is currently under consideration for publication by any other journal. The authors disclose they have no financial interest or commercial sponsor for this work. This study was approved by the Ethics Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes (IBRAG, CEUA 0072014).

Looking forward to reply at your convenience, I remain.

Yours sincerely,

Bianca Martins Gregório

Bianca M. Gregório, RD, PhD

HIGHLIGHT

Nutritional status during critical periods is pivotal for maturation of systems.

HF diet promotes prostatic atrophy.

These data suggest possible impairment of reproductive function in adulthood.

Title: Fetal programming by high-fat diet promoted prostatic atrophy in adult Wistar Albino rats

Pamella Campos-Silva

Angelo de Souza Fernandes

Waldemar Silva Costa

Francisco Jose Barcellos Sampaio

Bianca Martins Gregorio

Urogenital Research Unit, Biomedical Center, Department of Anatomy, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de setembro 87 (fds) 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Corresponding author: Bianca Martins Gregorio. Urogenital Research Unit, Biomedical Center, Department of Anatomy, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de setembro 87 (fds) 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone: (+55.21) 2868-8399
E-mail: biancamgregorio.uerj@gmail.com

Running title: Maternal diet affects prostatic parameters

Funding sources: This research was supported by grants from Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Keywords: High-fat diet; Maternal nutrition; Postnatal period; Prostate; Rats

Abstract

We investigated the effect of a high-fat diet on body metabolism and ventral prostate morphology in 4-months-old offspring. The mother was fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet during gestation and lactation. At weaning, the offspring diet remained the same (C/C, $n=8$; HF/HF, $n=8$) or it was switched (C/HF, $n=8$; HF/C, $n=9$). Biometry, blood pressure (BP), glucose, and lipid metabolism were evaluated, and the ventral prostate underwent morphometric and immunohistochemistry analysis. Body mass and BP were similar among groups. Triacylglycerol of HF/C increased, and the C/HF group had decreased HDL-c levels ($P=0.0005$ and $P=0.0100$, respectively). All groups on the HF diet presented hyperglycemia ($P=0.0064$), but insulin and glucose tolerance were not altered. Serum testosterone diminished in the C/HF group ($P=0.0218$). The prostate of all groups fed with the HF diet displayed reduced acinar area ($P<0.0001$). The epithelium height was smaller in HF/C and HF/HF groups compared with C/C and C/HF groups ($P<0.0001$), and the volume density of epithelium was lower in HF/C group compared with the C/C and C/HF groups ($P=0.0024$). Finally, the volume density of smooth muscle cells diminished in C/HF and HF/C groups ($P=0.0013$), and the volume density of connective tissue was also reduced in HF/C and HF/HF groups ($P<0.0001$). High-fat diet intake during gestation, lactation, and the postnatal life leads to prostatic atrophy. These data suggest that a high-fat diet might impair prostate secretory activity and contractility, and thus disturb reproductive function in adulthood.

Keywords: High-fat diet; Maternal nutrition; Postnatal period; Prostate; Rats

1. Introduction

The intake of foods rich in energy and fat has increased in Western countries [1]. The literature is wide about the matter, and much is discussed about the effect of high-fat diet intake during gestation and lactation on the offspring, a phenomenon known as fetal programming [2, 3]. Maternal high-fat diet intake during critical periods of body development compromise key metabolic organs such as the liver, adipose tissue [4, 5], and pancreas [6, 7], as well as important organs such as the heart and the kidneys [8]. However, little is discussed about the effect of fetal programming on the urogenital system, especially the prostate.

The prostate is an androgen-dependent organ, in which testosterone and dihydrotestosterone (DHT) are essential for cell differentiation, morphology maintenance, and gland physiology [9]. However, not only the androgens play a key role, but circulating estrogen, glucose, insulin, triglycerides, and HDL-c might negatively impact prostate homeostasis as well [10-12]. These serum markers are usually altered by high-fat diet intake, increasing the likelihood of metabolic syndrome development [13]. Additionally, there is a positive correlation between hyperglycemia and prostatic atrophy [14], and the metabolic syndrome is associated with benign prostatic hyperplasia (BPH) [15]. Despite of it, little is known about the effect of a maternal high-fat diet on the prostate morphology of the adult offspring. Thus, this study aimed to investigate if fetal programming by high-fat diet modulates offspring metabolism and prostate morphology, as well as if diet maintenance or switching for a control diet after weaning would also have an impact on these parameters.

2. Materials and methods

2.1. Ethical aspects

The handling and experimental protocols were approved by the local Ethics Committee to Care and Use of Laboratory Animals (Protocol No. 0072014). The study was performed following the Animal Research Reporting In vivo Experiments ARRIVE guidelines and the Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals (US NIH Publication N° 85-23. Revised 1996) [16].

2.2. Animals, diet and mating

Animals were housed in collective polypropylene cages and maintained under controlled conditions of temperature ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity ($60\pm 10\%$), dark–light cycle (12:12 h) and air exhaustion cycle (15min/h), with free access to water and food. Male and female Wistar rats with three-months-old were mated overnight. After pregnancy confirmation (vaginal plug), females were divided into two nutritional groups: control group (C; $n=10$) and high-fat group (HF; $n=10$). The dams and the offspring, until the three-months-old, were fed with either a AIN-93G purified C diet (17% fat, 19% protein and 64% carbohydrate; 3.95 Kcal/g) or a modified AIN-93G HF diet rich in lard (49% fat, 19% protein and 32% carbohydrate; 4.94 Kcal/g). The offspring, from three to four months old, was fed with either a AIN-93M purified C diet (10% fat, 14% protein and 76% carbohydrate; 3.18 Kcal/g) or a modified AIN-93M HF diet rich in lard (50% fat, 14% protein and 36% carbohydrate; 4.37 Kcal/g), following the American Institute of Nutrition recommendation [17]. On weaning, part of the pups remained on the same diet

as their mother [C/C ($n=8$) and HF/HF ($n=8$) groups] and the pups had the diet changed [C/HF ($n=8$) and HF/C ($n=9$) groups]. Body mass was monitored weekly, and food intake daily. Feed efficiency was calculated as body mass gain (g)/energy intake (kJ) per animal ($100\times$). Blood pressure was measured weekly for one month (between three and four months old), by the non-invasive method of tail-cuff plethysmography (Insight, São Paulo, Brazil).

2.3. Blood analysis

The offspring were killed by CO₂ inhalation at four months old. On the day before euthanasia, animals were food deprived for 12 h (8 p.m.–8 a.m.). Blood was collected by cardiac puncture, blood glucose was measured immediately using a glucometer (Accu-Chek, Roche, SP, Brazil), and the remaining blood was centrifuged (3,000 rpm, for 8 min), the plasma was collected, and stored at -20°C. Lipid profile (total cholesterol [TC], HDL-c, triacylglycerol [TAG]) was detected by a colorimetric assay (BioSystems, Cat 11506, Barcelona, Spain). Plasma insulin and testosterone levels were determined by ELISA assays according to manufacturer instructions (Millipore, Cat. EZRMI-13K, St Charles, MO, USA; Enzo, Cat. ADI-900-065, New York, USA). Glucose tolerance was estimated by the insulin/glucose (I/G) ratio [18].

2.4. Prostate morphology

The genital fat pad and the ventral prostate were dissected and weight. The ventral prostate was fixed in 4% formaldehyde for 48 h at room temperature, followed the routine histological procedures, and it was embedded in paraffin (Isotar, 740, CAS

8002 -74 -2, RJ, Brazil). Subsequently, the sample was sectioned at 5 μm thick, and stained with hematoxylin and eosin. Digital images (25 fields/animal) were acquired with an Olympus BX51 light microscope (Tokyo, Japan) coupled to a digital camera (Olympus DP70, Tokyo, Japan), and morphometry was performed using the Image J Software (imagej.nih.gov/ij/). After system calibration, the acinar area was measured with the freehand selection tool and the epithelium height was determined by the straight line tool. Images used for these analyses were obtained at 200 $\times$ and 600 $\times$ magnifications, respectively.

Immunohistochemistry for α -smooth muscle actin was performed as previously described [19]. The volume density (V_v) of epithelium, acinar lumen, connective tissue and cells stained for α -smooth muscle actin was estimated using the cell counter and grid tools of Image J. The 100-points test grid was superimposed over the digital images (200 $\times$), and each structure that was touched by a point was considered. The result is expressed as percentage.

2.5. Statistical analysis

Data were tested for normality distribution and reported as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Differences among groups were tested by the one-way analysis of variance (ANOVA) with *post hoc* test of Bonferroni. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant (Prism 5.03, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, U.S.A).

3. Results

3.1. Fetal programming did not increase body adiposity or blood pressure in male offspring

No significant differences were found for body mass, energy intake and feed efficiency among groups C/C (423.90 ± 48.85 g, 260.20 ± 55.54 KJ/day/animal and 0.51 ± 0.13 g/KJ), C/HF (415.90 ± 58.92 g, 296.60 ± 82.57 KJ/day/animal and 0.55 ± 0.05 g/KJ), HF/C (421.10 ± 55.58 g, 279.20 ± 86.32 KJ/day/animal and 0.43 ± 0.10 g/KJ) and HF/HF (409.10 ± 58.16 g, 288.70 ± 116.60 KJ/day/animal and 0.51 ± 0.05 g/KJ; $P=0.9339$, $P=0.6729$ and $P=0.0911$, respectively). Genital fat pad weight and systolic blood pressure were also similar among C/C (6.47 ± 2.87 g and 167.00 ± 12.36 mmHg), C/HF (6.35 ± 1.26 g and 160.10 ± 25.00 mmHg), HF/C (4.45 ± 0.20 g and 182.80 ± 14.13 mmHg) and HF/HF (6.65 ± 2.68 g and 163.60 ± 28.44 mmHg; $P=0.3144$, $P=0.3554$, respectively) groups.

3.2. High-fat feeding partially modulates glucose and lipid metabolism, and testosterone levels

TC levels did not differ among the C/C (54.00 ± 9.63 mg/dL), C/HF (51.14 ± 4.38 mg/dL), HF/C (63.75 ± 17.04 mg/dL) and HF/HF (53.71 ± 9.21 mg/dL; $P=0.3616$) groups. However, plasma HDL-c in C/HF group was 20% lower than that in C/C and HF/C groups (C/C: 41.43 ± 6.24 mg/dL; C/HF: 33.29 ± 2.87 mg/dL; HF/C: 41.57 ± 5.80 mg/dL; HF/HF: 35.80 ± 3.49 mg/dL; $P=0.0100$). Furthermore, TAG of HF/C group was 59%, 75% and 68% higher compared to the C/C, C/HF and HF/HF groups, respectively

(C/C: 92.50 ± 24.00 mg/dL; C/HF: 83.86 ± 13.95 mg/dL, HF/C: 146.80 ± 37.03 mg/dL; HF/HF: 87.43 ± 20.82 mg/dL, $P=0.0005$). The glucose was higher in groups that received the HF diet, regardless of its administration period compared to the C/C group (C/C: 5.68 ± 1.61 mmol/L, C/HF: 12.62 ± 7.40 mmol/L, HF/C: 12.82 ± 6.95 mmol/L, HF/HF: 13.60 ± 1.70 mmol/L, $P=0.0064$). The insulin did not differ among the groups (C/C: 1.11 ± 0.86 ng/mL, C/HF: 1.03 ± 0.60 ng/mL, HF/C: 2.04 ± 0.77 ng/mL, HF/HF: 1.69 ± 0.53 ng/mL, $P=0.0505$). The I/G ratio was similar among the C/C (0.20 ± 0.07 ng/mL/mmol/L), C/HF (0.12 ± 0.09 ng/mL/mmol/L), HF/C (0.20 ± 0.12 ng/mL/mmol/L) and HF/HF (0.12 ± 0.03 ng/mL/mmol/L, $P=0.0571$) groups. Testosterone level in C/HF group was 31% lower than that in C/C group (C/C: 11.39 ± 2.13 ng/ml, C/HF: 7.85 ± 1.30 ng/ml, HF/C: 9.34 ± 1.69 ng/ml, HF/HF: 10.43 ± 0.85 ng/ml, $P=0.0218$).

3.3. High-fat diet intake promotes prostate atrophy in the post-natal life

Table 1 shows the morphological aspects assessed, and photomicrographs in figures 1 and 2 illustrates epithelial height and acinar area, respectively, for all experimental groups. Prostate acinar area decreased 23% due to high-fat feeding during the postnatal period compared with the C/C group ($P<0.0001$). Groups that received the high-fat diet in the prenatal period presented a diminished epithelial height and smaller acinar area than the C/C ($\downarrow 31\%$, $\downarrow 45\%$, $P<0.0001$) and C/HF ($\downarrow 32\%$, $\downarrow 28\%$, $P<0.0001$) groups. The epithelial height decreased 27% and 29% in the group that only received the HF diet (HF/HF) in comparison with the C/C and C/HF groups, respectively ($P<0.0001$). In addition, the acinar area decreased by 33% in the HF/HF group compared with the C/C group ($P<0.0001$) (Table1).

Regarding the Vv of smooth muscle cells, the high-fat diet in the postnatal period reduced this parameter in comparison with the C/C group ($\downarrow 40\%$, $P=0.0013$). The group that received the high-fat diet in the prenatal period showed a decrease in the same parameter and the Vv of connective tissue compared with the C/C group. ($\downarrow 28$, $P=0.0013$; $\downarrow 60$, $P<0.0001$, respectively). Additionally, HF/C group presented a lower Vv of epithelium than that in the C/C ($\downarrow 30\%$) and C/HF ($\downarrow 29\%$, $P=0.0024$) groups. Animals that received the HF diet in both periods decreased 74% the Vv of connective tissue compared with the C/C group ($P<0.0001$). The Vv of acinar lumen did not differ among the groups ($P=0.0110$) (Table 1; Fig. 3).

4. Discussion

The human prostate is an exocrine gland that secretes an alkaline fluid (a component of the seminal fluid) important for semen liquefaction, the mechanism of coagulation and sperm motility [20]. In rodents, the gland develops from the urogenital sinus, and it appears approximately at 18.5 days of gestation [21]. The ventral lobe of the prostate is the most similar to the human prostate; therefore it is the most studied [22]. The maternal nutritional status during the critical periods of life development (gestation and lactation) is a determining factor for the healthy development of the offspring's organic systems [23, 24]. Recent data have shown that high-fat diet intake during gestation and lactation promotes disturbances in lipid and carbohydrate metabolism, as well as hypertension in the offspring [2, 3].

It is known that these metabolic disorders may negatively alter the morphology and functionality of the prostate [14, 25, 26]. Although we did not observe obesity or blood pressure elevation, high-fat feeding at the prenatal and postnatal periods promoted

hyperglycemia in the offspring. It has been shown that hyperglycemia alters the expression of androgen receptors (AR), interferes with epithelial cell proliferation and apoptosis, promotes stromal remodeling, and leads to significant prostate atrophy in rodents [14, 27, 28]. Moreover, hyperglycemia compromises the functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and disturbs the hormone secretion that stimulates testosterone synthesis by the testes [29].

Groups that received the high-fat diet presented lower testosterone, being statistically significant only in the group in which the diet was administered in the postnatal period. Testosterone is converted to DHT, a more functional compound, by the action of 5 alpha-reductase enzyme, after diffusing into the prostatic cells. Both testosterone and DHT can bind to AR, a nuclear receptor found in the epithelial and stromal cells of the prostate. This binding stimulates the mitogenic activity, cellular proliferation, and gland secretion. DHT forms a more stable complex with the AR, and its performance is stronger testosterone [30, 31]. Although DHT level was not assessed in the present study, it is synthesized from testosterone, and the decreased testosterone level found here may have been one of the factors responsible for prostate atrophy in our study.

Regarding prostate morphometry, present data shows that fetal programming by high-fat diet reduces prostate stroma, which consists of connective tissue and smooth muscle cells. The volume density of connective tissue was diminished in the groups that received the high-fat diet throughout life (HF/HF) and solely in the prenatal period (HF/C). As known, prostate connective tissue consists of collagen fibers and fibroblasts that synthesize extracellular matrix components [32]. Growth factors and other regulatory molecules of cellular activities are also associated with the extracellular matrix [33], and when there are absence or insufficiency of these components, the

prostatic homeostasis might be affected. As a result, gland maturation is compromised. Similarly, we showed reduced volume density of smooth muscle cells due to high-fat diet intake in the prenatal and postnatal periods, showing once again a negative impact when both the mother and the offspring consume the high-fat diet. Smooth muscle cells are arranged around prostatic acini, and they are essential for the maintenance of prostate reproductive function since they provide necessary contraction during ejaculation. Also, smooth muscle cells modulate the production of paracrine factors, and the synthesis, degradation, and reorganization of the extracellular matrix due to their interaction with the epithelial cells [34, 35]. In the face of it, a reduced population of smooth muscle cells directly compromises prostate physiology.

Damasceno et al. (2014) observed changes in prostate morphology of rats exposed to an adverse intrauterine environment, that was characterized by a reduction of smooth muscle α -actin expression. This stain indirectly indicates a decrease in smooth muscle cell population and corroborates with our data. In addition to a reduced stromal compartment, they also observed a reduced acinar lumen [14]. Similarly, our data show that fetal programming by high-fat diet and the diet itself decreased drastically the acinar compartment, which, together with the decrease in smooth muscle cells, may lead to lower gland contractility, impairing prostatic fluid release.

The epithelium height was decreased in the offspring fed with the high-fat diet throughout life (HF/HF) or solely in the prenatal period (HF/C), in agreement with the changes observed in the prostate stroma. The prostatic epithelium consists of six types of cells: stem cells, basal cells, transit-amplifying cells (TACs), intermediate cells, secretory luminal cells, and neuroendocrine cells. The secretory luminal cells are considered the main cells since they are responsible for prostatic fluid secretion [36]. Thus, a decreased epithelium height might compromise prostate secretory activity, and

thus it's functioning. In consonance with this result, this same groups also had decreased acinar area. In this study it was observed that, the diet itself and an increased placental influx of fatty acids contribute negatively to the morphological development of the prostate, with a reduction in the volume density of smooth muscle cells, and thus gland contractility. The release of the prostatic fluid becomes impaired, which may have caused the decrease in the prostatic acini size of these animals.

Another factor that confirms our results is the stability in serum insulin levels in the different experimental groups. It is known that hyperinsulinemia is associated with the development of BPH. Several mechanisms are reported in the literature, such as stimulation of the sympathetic nervous system [37], activation of prostate cell growth and proliferation [38], and obesity [39]. However, our study did not show variations in serum insulin levels, which justifies the results of atrophy observed in the prostate.

The high-fat diet intake during pregnancy, lactation and by the offspring in the postnatal life promotes prostatic atrophy. This morphological remodeling might compromise prostate secretory activity and contractility, impairing reproductive function in the adulthood.

Acknowledgment

The authors would like to thank Priscila Fernandes dos Santos for her technical assistance.

Declarations of interest

None

References

- [1] Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Cancelliere R, di Fabio G, Zarrelli A, Liverini G, Iossa S. Fat quality influences the obesogenic effect of high fat Diets. *Nutrients* 2015;7:9475-91.
- [2] Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2014;211:237 e1-237 e13.
- [3] Umekawa T, Sugiyama T, Du Q, Murabayashi N, Zhang L, Kamimoto Y, Yoshida T, Sagawa N, Ikeda T. A maternal mouse diet with moderately high-fat levels does not lead to maternal obesity but causes mesenteric adipose tissue dysfunction in male offspring. *J Nutr Biochem* 2015;26:259-66.
- [4] Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:495 e1-8.
- [5] Almeida MM, Dias-Rocha CP, Souza AS, Muros MF, Mendonca LS, Pazos-Moura CC, Trevenzoli IH. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. *Br J Nutr* 2017;118:788-803.
- [6] Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *Eur J Nutr* 2013;52:759-69.
- [7] Bringhenti I, Omellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. The insulin-signaling pathway of the pancreatic islet is impaired in adult mice offspring of mothers fed a high-fat diet. *Nutrition* 2016;32:1138-43.

- [8] Kruse M, Fiallo A, Tao J, Susztak K, Amann K, Katz EB, Charron MJ. A high fat diet during pregnancy and lactation induces cardiac and renal abnormalities in GLUT4 +/- male mice. *Kidney Blood Press Res* 2017;42:468-82.
- [9] Antoniassi JQ, Fochi RA, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR. Corticosterone influences gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostatic morphophysiology and alters its proliferation and apoptosis rates. *Int J Exp Pathol* 2017;98:134-46.
- [10] Ribeiro DL, Rafacho A, Bosqueiro JR, Taboga SR, Góes RM. Cellular changes in the prostatic stroma of glucocorticoid-treated rats. *Cell Tissue Res* 2008;332:499-508.
- [11] Garg M, Dalela D, Dalela D, Goel A, Kumar M, Gupta G, Sankhwar SN. Selective estrogen receptor modulators for BPH: new factors on the ground. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013;16:226-32.
- [12] Gacci M, Sebastianelli A, Salvi M, De Nunzio C, Vignozzi L, Corona G, Jaeger T, Chini T, Russo GI, Maggi M, Morgia G, Tubaro A, Carini M, Senni S. Benign prostatic enlargement can be influenced by metabolic profile: results of a multicenter prospective study. *BMC Urol* 2017;17:22.
- [13] Pedersen SD. Metabolic complications of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013;27:179-93.
- [14] Damasceno AA, Carvalho CP, Santos EM, Botelho FV, Araújo FA, Deconte SR, Tomiosso TC, Balbi AP, Zanon RG, Taboga SR, Góes RM, Ribeiro DL. Effects of maternal diabetes on male offspring: high cell proliferation and increased activity of MMP-2 in the ventral prostate. *Cell Tissue Res* 2014;358:257-69.
- [15] Ngai HY, Yuen KS, Ng CM, Cheng CH, Chu SP. Metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia: An update. *Asian J Urol* 2017;4:164-73.

- [16] Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;1:94-9.
- [17] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51.
- [18] Deisl C, Anderegg M, Albano G, Lüscher BP, Cerny D, Soria R, Bouillet E, Rimoldi S, Scherrer U, Fuster DG. Loss of sodium/hydrogen exchanger NHA2 exacerbates obesity- and aging-induced glucose intolerance in mice. *PLoS One* 2016;11:e0163568.
- [19] Furriel A, Campos-Silva P, Silva PC, Costa WS, Sampaio FJ, Gregório BM. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids induce morphological alterations in the rat ventral prostate. *PLoS One* 2014;9:e102876.
- [20] Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol* 2016;13:379-86.
- [21] Picut CA, Ziejewski MK, Stanislaus D. Comparative aspects of pre- and postnatal development of the male reproductive system. *Birth Defects Res* 2017;110:190-227.
- [22] Prins GS. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology* 1992;130:3703-14.
- [23] Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986;1:1077-81.
- [24] Pinho CF, Ribeiro MA, Rinaldi JC, Felisbino SL, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Fochi RA, Boer PA, Scarano WR. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reprod Fertil Dev* 2014;26:967-73.

- [25] Arthur R, Möller H, Garmo H, Holmberg L, Stattin P, Malmstrom H, Lambe M, Hammar N, Walldius G, Robinson D, Jungner I, Hemelrijck MV. Association between baseline serum glucose, triglycerides and total cholesterol, and prostate cancer risk categories. *Cancer Med* 2016;5:1307-18.
- [26] Tikoo K, Vikram A, Shrivastava S, Jena G, Shah H, Chhabra R. Parental high-fat diet promotes inflammatory and senescence-related changes in prostate. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:4962950.
- [27] Arcolino FO, Ribeiro DL, Gobbo MG, Taboga SR, Góes RM. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol* 2010;91:144-54.
- [28] Gobbo MG, Taboga SR, Ribeiro DL, Góes RM. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. *Micron* 2012;43:326-33.
- [29] Morelli A, Comeglio P, Sarchielli E, Cellai I, Vignozzi L, Vannelli GB, Maggi M. Negative effects of high glucose exposure in human gonadotropin-releasing hormone neurons. *Int J Endocrinol* 2013;2013:684659.
- [30] Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 1990;126:1165-72.
- [31] McNamara KM, Nakamura Y, Sasano H, Handelsman DJ, Simanainen U. Prostate epithelial AR inactivation leads to increased intraprostatic androgen synthesis. *Prostate* 2013;73:316-27.
- [32] Harmelin A, Danon T, Kela I, Brenner O. Biopsy of the mouse prostate. *Lab Anim* 2005;39:215-20.

- [33] Krušlin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci* 2015;15:1-8.
- [34] Thomson AA, Cunha GR, Marker PC. Prostate development and pathogenesis. *Differentiation* 2008;76:559-64.
- [35] Levesque C, Nelson PS. Cellular constituents of the prostate stroma: key contributors to prostate cancer progression and therapy resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017.
- [36] Miki J. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. *Int J Urol* 2010;17:139-47.
- [37] De Nunzio C, Aronson W, Freedland SJ, Giovannucci E, Parsons JK. The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases. *Eur Urol* 2012;61:560-70.
- [38] Ryl A, Rotter I, Słojewski M, Dolegowska B, Grabowska M, Baranowska-Bosiacka I, Laszczynska M. Hormone concentration, metabolic disorders and immunoexpression of androgen and estrogen-alpha receptors in men with benign prostatic hyperplasia and testosterone deficiency syndrome. *Folia Histochem Cytobiol* 2015;53:227-35.
- [39] Corona G, Rastrelli G, Monami M, Saad F, Luconi M, Lucchese M, Facchiano E, Sforza A, Forti G, Mannucci E, Maggi M. Body weight loss reverts obesity-associated hypogonadotropic hypogonadism: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2013;168:829-43.

Table 1 - Prostate morphology

Data	C/C	C/HF	HF/C	HF/HF
Epithelium height (μm)	18.98 ± 0.97	17.82 ± 1.39	$12.50 \pm 1.92^{\text{a,b}}$	$13.14 \pm 1.85^{\text{a,b}}$
Acinar area (μm^2)	136.340 ± 11.847	$105.398 \pm 18.511^{\text{a}}$	$75.670 \pm 7.671^{\text{a,b}}$	$90.812 \pm 18.230^{\text{a}}$
Epithelium Vv (%)	29.21 ± 5.60	28.78 ± 5.66	$20.54 \pm 4.65^{\text{a,b}}$	22.10 ± 2.50
Acinar lumen Vv (%)	58.65 ± 6.78	57.00 ± 15.95	70.43 ± 5.86	70.45 ± 3.42
Connective tissue Vv (%)	4.99 ± 1.61	3.54 ± 1.33	$2.01 \pm 1.42^{\text{a}}$	$1.28 \pm 0.51^{\text{a}}$
Smooth muscle cells Vv (%)	7.70 ± 1.42	$4.66 \pm 1.64^{\text{a}}$	$5.53 \pm 1.51^{\text{a}}$	6.17 ± 0.99

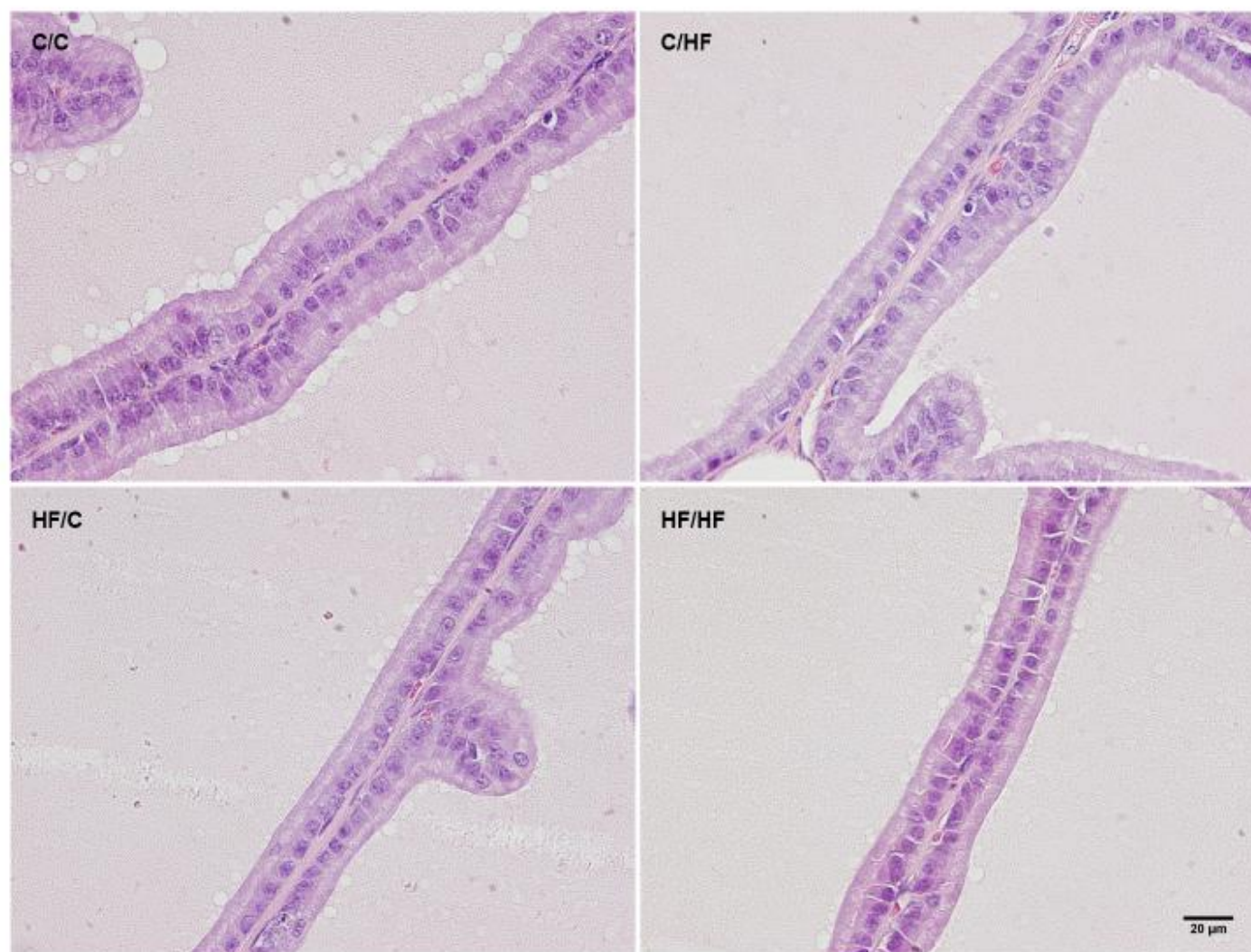
C/C, HF/HF (pups remained on the same diet as their mother), C/HF, HF/C (pups had the diet changed). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Differences were assessed by One-Way ANOVA, and *post hoc* test of Bonferroni, where ^a vs. C/C group; and ^b vs. C/HF group, when $P \leq 0.05$

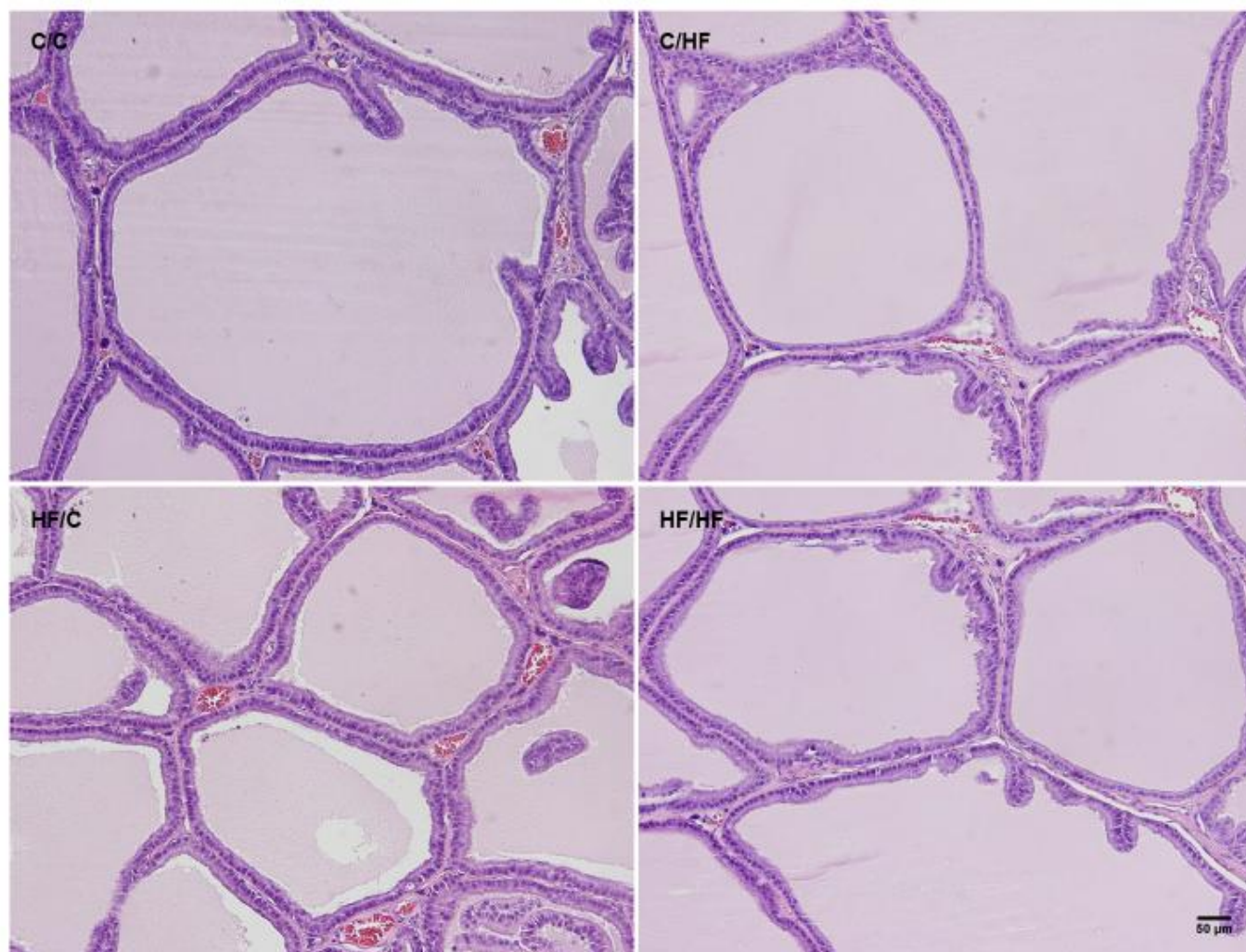
Figure captions

Fig. 1 Epithelium height. C/C, HF/HF (pups remained on the same diet as their mother), C/HF, HF/C (pups had the diet changed). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significant differences were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent *post hoc* Bonferroni test. C/C and C/HF preserved their prostatic histoarchitecture; HF/C and HF/HF presented a lower epithelium height than the others groups. H-E staining, 600 $\times$

Fig. 2 Acinar area. C/C, HF/HF (pups remained on the same diet as their mother), C/HF, HF/C (pups had the diet changed). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significant differences were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent *post hoc* Bonferroni test. C/C preserved its acinar area; C/HF, HF/C and HF/HF showed a decreased on the acinar area. H-E staining, 200 $\times$

Fig. 3 Volume density of epithelium, acinar lumen, connective tissue and smooth muscle cells. C/C, HF/HF (pups remained on the same diet as their mother), C/HF, HF/C (pups had the diet changed). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Significant differences were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and a subsequent *post hoc* Bonferroni test. C/C preserved its volume density of epithelium, acinar lumen, connective tissue and smooth muscle cells; C/HF presented a decreased on the volume density of smooth muscle cells; HF/C showed a reduction of all parameters studied, except for the acinar lumen; HF/HF showed a decreased volume density of connective tissue. H-E staining, 200 $\times$





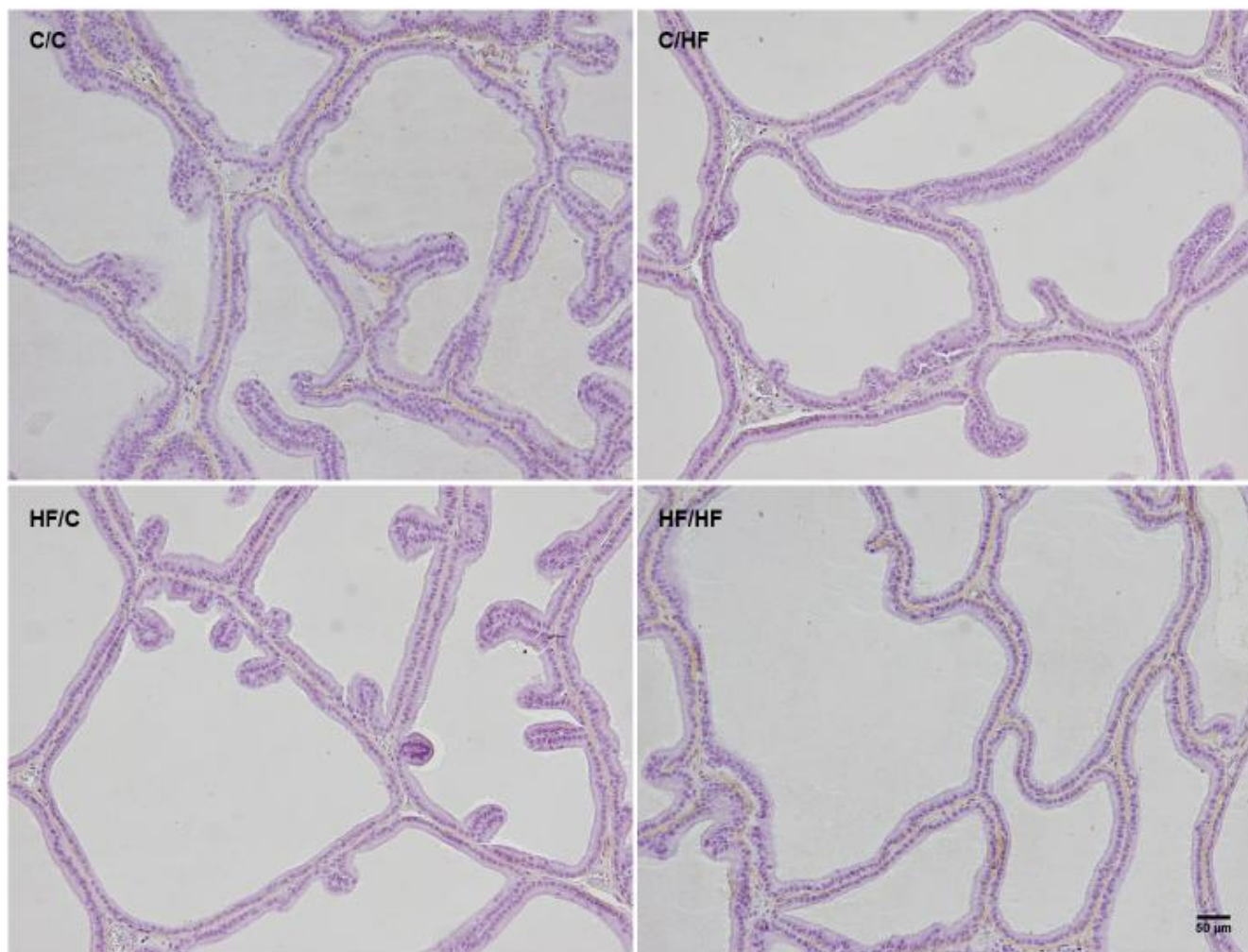


Table 1 - Prostate morphology

Data	C/C	C/HF	HF/C	HF/HF
Epithelium height (μm)	18.98 ± 0.97	17.82 ± 1.39	$12.50 \pm 1.92^{\text{a,b}}$	$13.14 \pm 1.85^{\text{a,b}}$
Acinar area (μm^2)	136.340 ± 11.847	$105.398 \pm 18.511^{\text{a}}$	$75.670 \pm 7.671^{\text{a,b}}$	$90.812 \pm 18.230^{\text{a}}$
Epithelium Vv (%)	29.21 ± 5.60	28.78 ± 5.66	$20.54 \pm 4.65^{\text{a,b}}$	22.10 ± 2.50
Acinar lumen Vv (%)	58.65 ± 6.78	57.00 ± 15.95	70.43 ± 5.86	70.45 ± 3.42
Connective tissue Vv (%)	4.99 ± 1.61	3.54 ± 1.33	$2.01 \pm 1.42^{\text{a}}$	$1.28 \pm 0.51^{\text{a}}$
Smooth muscle cells Vv (%)	7.70 ± 1.42	$4.66 \pm 1.64^{\text{a}}$	$5.53 \pm 1.51^{\text{a}}$	6.17 ± 0.99

C/C, HF/HF (pups remained on the same diet as their mother), C/HF, HF/C (pups had the diet changed). Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Differences were assessed by One-Way ANOVA, and *post hoc* test of Bonferroni, where ^a vs. C/C group; and ^b vs. C/HF group, when $P \leq 0.05$