

EFEITOS DA OBESIDADE INDUZIDA POR REDUÇÃO DE NINHADA SOBRE PARÂMETROS EPIDIDIMÁRIOS E ESPERMÁTICOS DE RATOS PERIPUBERAIS

Nayane Caroline Silva Vicentini¹, Larissa Rugila Stopa², Ernane Torres Uchoa³, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes⁴, Rafaela Pires Erthal⁵

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Londrina/PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Programa Voluntário de Iniciação Científica (PVIC/UniCesumar). nayanevicentini@gmail.com

²Doutoranda em Ciências Fisiológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná. stopalarissa@gmail.com

³ Pesquisador, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná. euchoa@uel.br

⁴Pesquisadora, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná. glaura@uel.br

⁵Orientadora, Mestre em Patologia Experimental, Docente do Curso de Biomedicina da UniCesumar campus Londrina, Paraná. rafaela.erthal@unicesumar.edu.br

RESUMO

Alterações nutricionais durante o período gestacional induzem disfunções metabólicas e endócrinas, que persistem até a vida adulta do indivíduo. Assim como a obesidade na primeira infância, que hoje é considerada situação pandêmica. Onde, segundo a Organização Mundial da Saúde, 1 a cada 5 crianças se enquadram na classificação de obesidade. Concomitante, houve um aumento pela procura por clínicas de fertilização. Principalmente devido a casos relacionados à infertilidade masculina. Desse modo o objetivo do presente estudo é atestar a relação entre o aumento da obesidade, com os casos de infertilidade masculina através da observação dos parâmetros epididimários e espermáticos de ratos da linhagem Wistar, de ninhada reduzida, induzidos à supernutrição neonatal por amamentação. Será/foi avaliado o número de espermátides maduras, tempo de trânsito espermático no epidídimo, análises histopatológicas e morfométricas, motilidade espermática, atividade mitocondrial e integridade acrossômica. A partir dos resultados prévios, conclui-se que a obesidade induzida durante o período de lactação em modelo experimental aumentou o peso corpóreo e prejudicou a motilidade espermática. Mais análises ainda são necessárias para esclarecer o mecanismo pelo qual a obesidade pode prejudicar a morfofisiologia epididimária e espermática.

PALAVRAS-CHAVE: Obesidade; Epidídimo; Infertilidade masculina.

1 INTRODUÇÃO

Os marcadores globais de obesidade mostram aumento significativo na quantidade de pessoas que atingiram a obesidade nas últimas 3 décadas. Sobretudo quando se trata da obesidade infantil, que se tornou um problema de saúde pública no século 21 (GÜNGÖR, 2014). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), calcula-se que em 2025 cerca de 75 milhões de crianças atinjam a faixa da obesidade (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE GOIÁS, 2019).

Isso também se aplica ao Brasil. Onde 1 a cada 3 crianças (entre 5 e 9 anos) se enquadram na classificação de sobrepeso, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). E ainda segundo o Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional, no ano de 2019, 16,33% das crianças entre 5 a 10 anos estavam na faixa do sobrepeso. Com 9,58% de crianças consideradas obesas, e 3,98% com um quadro mais grave de obesidade (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE GOIÁS, 2019).

Sabe-se que a obesidade infantil tem a capacidade de alterar os órgãos e sistemas do organismo humano (GÜNGÖR, 2014). O mesmo acontece com os animais, ao reduzir a ninhada de ratos no período perinatal. A nutrição dos filhotes acontecerá de uma forma superior as necessidades metabólicas, provocando obesidade, alterações metabólicas e endócrinas que durarão a vida toda. Diminuindo a qualidade e a expectativa de vida (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2007).

Um dos sistemas afetados é o reprodutor masculino, foco desse estudo. Em mamíferos, é composto pelos testículos, epidídimos, ductos deferentes, vesícula seminal e próstata. Ocasionalmente o aumento da procura por clínicas de fertilidade quando adultos, como foi relatado nos últimos anos (TORTORA; NIELSEN, 2013).

O epidídimo é o órgão cuja função principal é a maturação pós-testicular dos espermatozoides, proporcionando motilidade e a capacidade de fertilização dos mesmos. Anatomicamente composto de três regiões: caput (cabeça), corpo e cauda. Onde cada região expressa seus próprios genes e proteínas necessárias para o processo de maturação (BELLEANNÉE; THIMON; SULLIVAN, 2012)

Em ratos e camundongos o segmento inicial é composto por 2 a 4 segmentos, responsáveis pela vascularização e regulação do epidídimo como um todo (BELLEANNÉE; THIMON; SULLIVAN, 2012). E qualquer alteração no desenvolvimento desses segmentos, principalmente causados pela obesidade, leva à infertilidade (DOMENICONI *et al.*, 2016).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, provindos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) cuja ninhada foi ajustada no dia pós-natal (DPN) 3, através da eutanásia por decapitação, sendo mantidos 3 filhotes (small litter – SL) ou 10 filhotes (normal litter – NL) com cada mãe (RODRIGUES *et al.*, 2009). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, com ambiente adaptado com ciclo de luz de 12 h claro/escuro, temperatura entre 22 ± 2 °C, alimentação e água *ad libidum*.

No DPN 21, foram desmamados e mantidos no biotério até a eutanásia (DPN 51). Os epidídimos direitos de 10 animais de cada grupo foram retirados, pesados e congelados, para que seja feita a contagem de espermátides maduras. Os epidídimos de mais 5 animais foram encaminhados para análises histopatológicas e morfométricas. Com utilização dos espermatozoides do ducto deferente esquerdo para observação da motilidade, integridade acrossômica e atividade mitocondrial. Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina - CEUA/UEL (OF. CIRC. CEUA Nº. 87/2020).

As análises a seguir, ainda serão realizadas. Os epidídimos congelados seguiram os padrões de Robb *et al.* (1978), e adaptações de Fernandes, *et al.* (2007) para avaliação de contagem espermática. Serão segmentados para que a contagem de espermatozoides seja realizada na câmara de Neubauer. Cujas a média aritmética dos campos de contagem indicará a quantidade de espermatozoides em milhões por ml. Após, essa quantidade será multiplicada pelo fator de diluição utilizado, resultando no número de espermatozoides por órgão. E dividido pela PDE para expressar o tempo de trânsito dos mesmos (dias necessários para atravessarem o epidídimo).

O processamento histológico seguirá os padrões de Fernandes, *et al.* (2011). Os epidídimos serão segmentados, e fixados por 4 horas em Methacem, seguido de álcool 70% até inclusão em Praplast. Seccionados a 5 µm e corados com hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica, morfométrica e estereológica.

A histopatologia e estereologia serão através da microscopia, para observar o epitélio e interstício do órgão, de modo qualitativo, e observar as proporções de lúmen, epitélio e interstício.

O conteúdo coletado a partir do ducto deferente foi destinado também ao processamento de espermatozoides para avaliação posterior da incorporação seletiva do corante DAB pelas mitocôndrias ativas da peça intermediária do espermatozoide (HRUDKA, 1987). Eles serão coletados dos ductos deferentes em PBS, onde 100 µL serão incubados por 1 hora em 200 µL do corante DAB, a 37°C. Após, será preparado um

esfregaço, fixado em PBS com formaldeído a 10%. Para contagem de 200 células e classificação nas classes: I (100% da peça intermediária corada), II (mais de 50% da peça intermediária corada), III (menos de 50% da peça intermediária corada), IV (ausência de coloração na peça intermediária). Com resultados expressos em porcentagem.

E, por fim, será feita a análise estatística, para comparação dos dados obtidos através do teste estatístico t-student, ou o de Mann-Whitney. As diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados prévios obtidos a partir do presente estudo demonstram que, a redução de ninhada indutora de obesidade aumentou o peso corpóreo quando comparado ao grupo controle (Figura 1). Além disso, animais induzidos à obesidade apresentaram redução na porcentagem de espermatozoides móveis (Figura 2).

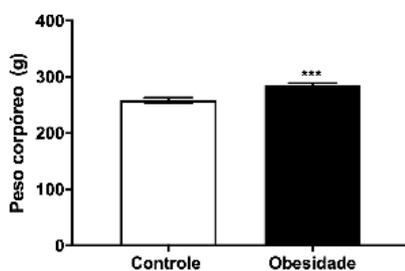


Figura 1: Peso corpóreo

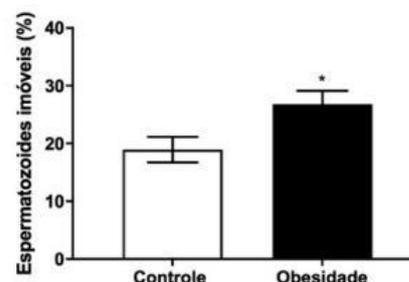


Figura 2: Motilidade espermática

Espera-se ainda, com as análises futuras, obter resultados mais esclarecedores sobre os efeitos que a obesidade pode causar durante a fase de diferenciação pós-natal do epidídimo. Além de possibilitar melhores explicações sobre a qualidade espermática, aumento dos casos de infertilidade masculina, e contribuir para o desenvolvimento científico desse problema social que é a obesidade.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados prévios, conclui-se que a obesidade induzida durante o período de lactação em modelo experimental aumentou o peso corpóreo e prejudicou a motilidade espermática. Mais análises ainda são necessárias para esclarecer o mecanismo pelo qual a obesidade pode prejudicar a morfofisiologia epididimária e espermática.

REFERÊNCIAS

BELLEANÉE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. Region-specific gene expression in the epididymis. **Cell Tissue Res**. 2012 sep;349(3): p. 717-31. DOI: 10.1007/s00441-012-1381-0. Epub 2012, mar. 18. PMID: 22427067.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. **Neuroreport**, v. 18, p. 521-524, 2007.

DOMENICONI, R. F. *et al.* Is the epididymis a series of organs placed side by side? **Biol Reprod**. 2016 Jul;95(1):10. DOI: 10.1095/biolreprod.116.138768. Epub 2016, apr. 27. PMID: 27122633; PMCID: PMC5029429.

FERNANDES, G. S.; FERNANDEZ, C. D.; CAMPOS, K. E.; DAMASCENO, D. C.; ANSELMOFRANCI, J. A.; KEMPINAS, W. D. Vitamin C partially attenuates male reproductive deficits in hyperglycemic rats. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 9, p. 100, 2011.

ROBB, G.W.; AMMAN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. **J Reprod Fertil**, v. 54(1), p.103-107. 1978.

RODRIGUES, A.L. *et al.* Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **J Endocrinol.** v. 195, p. 485-94, 2007;

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE GOIÁS. **Obesidade infantil desafia pais e gestores.** 11/10/2019. Disponível em: <https://www.saude.go.gov.br/noticias/81-obesidade-infantil-desafia-pais-e-gestores>.

TORTORA, G. J.; NIELSEN, M. T. Princípios de anatomia humana. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

GÜNGÖR, N. K. Overweight and obesity in children and adolescents. **J Clin Res Pediatr Endocrinol.** 2014, sep; 6(3): p. 129-43. DOI: 10.4274/Jcrpe.1471. PMID: 25241606; PMCID: PMC4293641.