

## **Alterações do DNA espermático de ratos adultos com sobrepeso induzido por supernutrição neonatal**

### **Sperm DNA alterations in overweight rats induced by neonatal supernutrition**

DOI:10.34117/bjdv8n3-427

Recebimento dos originais: 27/01/2022

Aceitação para publicação: 25/02/2022

#### **Rafaela Doretto do Valle Freitas**

Biomédica

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM / Centro Universitário São Camilo – CUSC  
Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino  
São Paulo, SP  
E-mail: rafaela.doretto@hotmail.com

#### **Renato Borges Tesser**

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM

Instituição: Centro Universitário São Camilo – CUSC

Endereço: Avenida Nazaré, 1500 – Ipiranga, , São Paulo, SP

E-mail: renatobtesser@gmail.com

#### **Sandra Maria Miraglia**

Doutora em Ciências pela Escola Paulista de Medicina (EPM) e Livre-docente em Embriologia pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino  
São Paulo, SP

E-mail: miraglia.sm@gmail.com

#### **Marina Nunes**

Mestre em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/ EPM

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino  
São Paulo, SP

E-mail: marinunes.biomed@gmail.com

#### **Samara Urban de Oliva**

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM

Instituição: Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Biologia do Desenvolvimento – UNIFESP/EPM

Endereço: Rua Botucatu, 740 – Edifício Leitão da Cunha – 2º andar – Vila Clementino  
São Paulo, SP

E-mail: samaraurban@gmail.com; oliva.samara@unifesp.br

## RESUMO

A obesidade e o sobrepeso são distúrbios multifatoriais relacionados ao aumento da adiposidade, dislipidemia, estresse oxidativo e inflamação, que estão associados à alta morbimortalidade. Embora a infância não tenha sido alvo da prevenção do sobrepeso/obesidade, o período pós-natal precoce é altamente vulnerável e o ambiente neonatal inadequado, tal como a superalimentação induzida pela redução do tamanho da ninhada, pode causar modificações fisiológicas e metabólicas em longo prazo, e que são evidenciadas somente na idade adulta. O sobrepeso/obesidade podem acarretar alterações dos níveis dos hormônios sexuais, do processo espermatogênico e na maturação espermática. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da supernutrição neonatal sobre a estrutura da cromatina e a fragmentação do DNA espermático, e se possíveis alterações do genoma paterno poderiam causar prejuízos na fertilidade e na capacidade reprodutiva dos ratos na fase adulta. A supernutrição neonatal foi induzida pela redução do tamanho da ninhada. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, divididos em dois grupos experimentais (n=8), aos dois dias pós-parto (dpp): grupo ninhada padrão (NP - 10 filhotes/ninhada) e grupo ninhada reduzida (NR - 4 filhotes/ninhada). Após o desmame, aos 21dpp, todos os filhotes receberam ração comercial padrão. Aos 119 dpp, os ratos foram acasalados com fêmeas primíparas. No 20º dia de gestação, as ratas prenhes (acasaladas com os animais dos grupos experimentais) foram submetidas à eutanásia, o útero e os ovários foram removidos para registro do número de implantações, corpos lúteos, reabsorções e fetos (vivos/mortos), além de dados morfométricos fetais e placentários, para posterior determinação dos parâmetros relativos à fertilidade e à capacidade reprodutiva. Após os acasalamentos, os ratos machos experimentais foram eutanasiados e os espermatozoides foram coletados da porção proximal da cauda epididimária para análise da compactação da cromatina, pelo Teste de Azul de Toluidina, e da fragmentação do DNA, por meio da técnica de Laranja de Acridina. Os animais adultos, aos 119 dpp, com sobrepeso induzido por supernutrição neonatal (grupo NR) apresentaram aumento estatisticamente significativo na proporção de espermatozoides com fragmentação do DNA e redução na compactação da cromatina espermática, em comparação com o grupo controle. Entretanto, não ocorreram alterações dos parâmetros relativos a fertilidade e a capacidade reprodutiva masculina. Os resultados sugerem que a supernutrição neonatal causou alterações no genoma paterno, na fase adulta, caracterizadas por fragmentação do DNA e redução na protaminação da cromatina espermática, mas que não afetou a fertilidade e a capacidade reprodutiva masculina. Estudos adicionais estão sendo conduzidos para avaliação de possíveis efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e na ocorrência de malformações congênitas na prole.

**Palavras-chave:** espermatozoide, sobrepeso, fertilidade masculina, DNA.

## ABSTRACT

Obesity and overweight are multifactorial disorders related to increased adiposity, dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation, which are associated with high morbidity and mortality. Although childhood has not been targeted for prevention of overweight/obesity, the early postnatal period is highly vulnerable and the inappropriate neonatal environment, such as overfeeding induced by reduced litter size, can cause long-term physiological and metabolic changes that are only evident in adulthood. Overweight/obesity can lead to changes in sex hormone levels, spermatogenic process, and sperm maturation. The objective of this study was to evaluate the effects of neonatal overnutrition on chromatin structure and sperm DNA fragmentation, and whether

possible alterations in the sperm genome could cause damage to fertility and reproductive capacity in adult rats. Neonatal overnutrition was induced by reducing litter size. Wistar rats were used and divided into two experimental groups (n=8) at two days postpartum (dpp): standard litter group (NP - 10 pups/litter) and reduced litter group (NR - 4 pups/litter). After weaning, at 21dpp, all pups received standard commercial feed. At 119 dpp, the rats were mated with primiparous females. On the 20th day of gestation, the pregnant rats (mated with animals from the experimental groups) were euthanized, the uterus and ovaries were removed for recording the number of implantations, corpora lutea, resorptions and fetuses (alive/dead), besides fetal and placental morphometric data, for further determination of fertility and reproductive capacity parameters. After mating, the experimental male rats were euthanized and spermatozoa were collected from the proximal portion of the epididymal tail for analysis of chromatin compaction by the Toluidine Blue test and DNA fragmentation by the Acridine Orange technique. Adult animals, at 119 dpp, with overweight induced by neonatal overnutrition (NR group) showed a statistically significant increase in the proportion of sperm with DNA fragmentation and reduction in sperm chromatin compaction, compared to the control group. However, there were no changes in fertility and male reproductive capacity parameters. The results suggest that neonatal overnutrition caused changes in the adult paternal genome characterized by DNA fragmentation and reduced sperm chromatin protamination, but did not affect male fertility and reproductive capacity. Further studies are being conducted to evaluate possible effects on embryofetal embryo development and on the occurrence of congenital malformations in the offspring.

**Keywords:** sperm, overweight, male fertility, DNA

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica causada por interações de vários fatores genéticos e ambientais, sendo considerada um dos principais problemas de saúde pública atualmente. Embora a infância não tenha sido alvo da prevenção do sobrepeso/obesidade, o período pós-natal precoce é altamente vulnerável a alterações nutricionais, o que pode causar modificações fisiológicas e metabólicas em longo prazo, e que são evidenciadas somente na idade adulta. Desta forma, o excesso de peso contribui para o desenvolvimento de diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão e doenças respiratórias, diversos tipos de neoplasias e doenças crônicas, tais como: doenças hepáticas e da vesícula biliar, apneia do sono, depressão e infertilidade (Must et al., 1999; Carter & Watenpugh, 2008; Al-Goblan et al., 2015; Hruby et al., 2016; Kachur et al., 2017; Avgerinos et al., 2019; Polyzos et al., 2019). Ainda, a obesidade/ sobrepeso, quando presente em idades críticas para a reprodução, como o período neonatal, a peripuberdade e a puberdade, pode afetar o potencial de fertilidade masculina (Paasch et al., 2010; Palmer et al., 2012).

Embora a literatura seja controversa quanto ao efeito que a obesidade masculina tem sobre os parâmetros espermáticos, incluindo motilidade e morfologia dos espermatozoides, estudos clínicos e experimentais demonstraram que o sobrepeso e a obesidade estão associadas a oligozoospermia, danos a integridade do DNA e aumento do estresse oxidativo, afetando a função espermática e interferindo no processo de fertilização e na qualidade do embrião (Spanò et al., 2000; Qin et al., 2007; Hammoud et al., 2008; Bakos et al., 2011; Teerds et al., 2011; Tunc et al., 2011; Fariello et al., 2012; Palmer et al., 2012; Chambers & Richard, 2015; Katib, 2015; Kiess et al., 2015; Alshahrani et al., 2016; Jia et al., 2018; Sepidarkish et al., 2020). Por outro lado, alterações na integridade, estrutura e compactação da cromatina e do DNA espermático também podem ocorrer independentemente da presença de alterações de outros parâmetros seminais qualitativos e quantitativos (Saleh et al., 2002) e não estar necessariamente associada a uma diminuição nas taxas de fertilidade, mas pode potencialmente acarretar alterações na qualidade do embrião (Coder et al., 2010). Desta forma, a obesidade paterna pode impactar negativamente, tanto a reprodução masculina, como também a viabilidade das progênes, por meio de danos nas células germinativas capazes de levar a alterações de expressão gênica nos embriões pré-implantação provenientes de pais obesos (Bernhardt et al., 2021).

Nesse contexto, a associação entre qualidade do genoma paterno, a capacidade reprodutiva e o desenvolvimento embriofetal e pós-natal da progênie é reconhecida. No entanto, pesquisas que avaliem o impacto de danos espermáticos sobre o desenvolvimento das progênes, independentemente de fatores maternos, são escassas. Considerando a relevância que a integridade do genoma paterno desempenha no estabelecimento, na manutenção e na viabilidade da gestação, estudos abordando esse tema são necessários e importantes (Sakkas & Alvarez, 2010).

## **2 OBJETIVO**

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da supernutrição neonatal sobre a estrutura da cromatina e a fragmentação do DNA espermático, e se possíveis alterações do genoma paterno poderiam causar prejuízos na fertilidade e na capacidade reprodutiva dos ratos na fase adulta.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*. Os animais foram obtidos através do acasalamento de ratos machos e fêmeas, provenientes da Universidade de São Paulo e foram mantidos no Biotério do Centro Universitário São Camilo. Os ratos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno medindo 45x30x15 cm, com substrato de maravalha, sob condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (23°C); os animais tiveram livre acesso à água filtrada e à ração balanceada. Os animais matrizes foram colocados para acasalar ao escurecer (após 19:00h), na proporção de um macho para duas fêmeas. No início da manhã seguinte, até 8:00h, foram obtidos esfregaços de células do epitélio vaginal para a detecção da presença de espermatozoides. O dia em que o teste apresentou-se positivo (presença de espermatozoides no esfregaço) o dia de detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado o dia de gestação zero (DG0) (Chahoud & Kwasigroch, 1977). A idade da prole foi estabelecida considerando-se o dia do parto como dia zero (dia 0).

As ninhadas foram distribuídas em 2 grupos (n=8): sobrepeso (Ninhada Reduzida – NR) e controle (Ninhada Padrão – NP). O sobrepeso foi induzido pelo método de redução de ninhada conforme descrito por Plagemann et al. (1999) e Habbout et al. (2013), com adaptações. No segundo dia pós-parto (2dpp), as ninhadas foram divididas em:

- Grupo controle (Ninhada Padrão – NP): o tamanho das ninhadas foi estabelecido com 10 filhotes/mãe até o desmame;
- Grupo obesidade (Ninhada Reduzida – NR): as ninhadas foram constituídas por 4 filhotes/mãe até o desmame.

O desmame ocorreu no 21º dpp, quando os animais dos dois grupos experimentais tiveram livre acesso à água filtrada e à ração comercial para ratos (Nuvilab CR-1 irradiada). Cada grupo foi constituído por filhotes machos, todos provenientes de ninhadas diferentes obtidas do acasalamento de diferentes animais utilizados como matrizes, de modo que não houve mais de um filhote oriundo da mesma matriz num mesmo subgrupo, evitando-se a interferência do parâmetro consanguinidade na composição da amostra e, por conseguinte, nos resultados obtidos.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA)

da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/ EPM (CEUA nº 8958020819) e à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/SÃO CAMILO - Protocolo 04/19.

Aos 119dpp, os ratos foram pareados com fêmeas primíparas. Os animais foram colocados para acasalar no final da tarde, na proporção de um macho para uma fêmea. No início da manhã seguinte, foram obtidos esfregaços de células do epitélio vaginal para a detecção da presença de espermatozoides. O dia em que o teste se apresentar positivo (presença de espermatozoides) foi considerado o dia 0 de gestação (DG0). As fêmeas prenhes foram separadas e tiveram a evolução da prenhez acompanhada.

No 20º dia de gestação, as ratas prenhes foram submetidas à eutanásia, por superdosagem de anestésico (Tiopental sódico, 150mg/Kg, via intraperitoneal), para registro do peso do útero com os fetos, do peso e análise morfométrica das placentas, do número de corpos lúteos e de sítios de implantação, da presença de reabsorções (precoces ou tardias), do número de fetos vivos ou mortos, do peso e do comprimento cabeça-nádegas de cada feto e a sexagem fetal para posterior determinação dos parâmetros relativos à fertilidade, prenhez e sítios de implantação (Faqi, 2010; Tyl & Marr, 2012):

- a) Taxa de fertilidade =  $(\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes} / \text{n}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas}) \times 100$ ;
- b) Taxa de fecundidade/ gestacional =  $(\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenhes} / \text{n}^\circ \text{ de fêmeas acasaladas, confirmadas pelo esfregaço vaginal}) \times 100$ ;
- c) Taxa de implantação =  $(\text{n}^\circ \text{ implantações} / \text{n}^\circ \text{ corpos lúteos}) \times 100$ ;
- d) Taxa perdas pré-implantação =  $(\text{n}^\circ \text{ corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ implantações} / \text{n}^\circ \text{ corpos lúteos}) \times 100$ ;
- e) Taxa de perdas pós-implantação =  $(\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos} / \text{n}^\circ \text{ de implantações}) \times 100$ ;
- f) Taxa de reabsorção =  $(\text{n}^\circ \text{ de reabsorções} / \text{n}^\circ \text{ de implantações}) \times 100$ ;
- g) Índice de perda pré-natal:  $(\text{n}^\circ \text{ de fetos mortos} + \text{n}^\circ \text{ de reabsorções}) \times 100 / \text{n}^\circ \text{ de implantações}$
- h) Taxa de viabilidade fetal:  $(\text{n}^\circ \text{ de fetos vivos} / \text{n}^\circ \text{ sítios de implantações}) \times 100$
- i) Razão sexual = (número de fetos machos/número de fetos fêmeas);
- j) Índice placentário = (média peso placentário / média peso fetal);
- k) Índice ponderal = (comprimento cabeça-nádegas / média peso fetal);
- l) Adequação do peso à idade da gestacional. Cada um dos fetos foi classificado em (Soulimane-Mokhtari et al., 2005; Damasceno et al., 2013):

- fetos com peso adequado para a idade gestacional – peso compreendido entre a média de peso dos fetos mais ou menos 1,7 desvio padrão, calculados a partir dos dados do grupo controle;
- fetos de baixo peso para a idade gestacional – peso corporal inferior à média de peso dos fetos do grupo controle menos 1,7 desvio padrão, calculados a partir dos dados do grupo controle deste mesmo grupo;
- fetos acima do peso para a idade gestacional – peso corporal superior à média do peso dos fetos do mais 1,7 desvio padrão, calculados a partir dos dados do grupo controle.

Após os acasalamentos, os ratos machos foram submetidos à eutanásia por superdosagem de anestésico (Tiopental Sódico, 150mg/Kg, via intraperitoneal). A porção da cauda proximal do epidídimo esquerdo (n=8) foi removida e colocada em placa de Petri, contendo 3mL de PBS 1X (pH 7,2); em sequência, foram realizadas incisões suficientes para a liberação do fluido epididimário, que foi incubado durante 30 minutos, a 37°C (NUNES et al., 2020).

Para a análise de fragmentação de DNA espermático, foi utilizado o método de Laranja de Acridina (LA) de acordo com a metodologia descrita por Tejada et al. (1984), com modificações. Foram obtidos esfregaços em lâminas histológicas utilizando as amostras de espermatozoides coletadas da cauda epididimária, que foram fixados em solução de Carnoy (Álcool metílico/Ácido acético, 3:1), *overnight* a 4°C. Após lavagem, os esfregaços foram incubados em solução de laranja de acridina (solução de laranja de acridina 1% + solução de fosfato de sódio dibásico 0,3M + solução de ácido cítrico 0,1M), por 15 minutos, em câmara escura. Foram avaliados 200 espermatozoides, em microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse CI (Nikon), com filtro de excitação de 460nm.

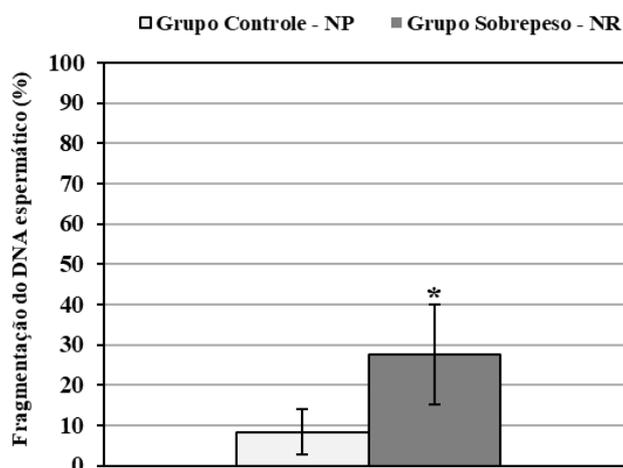
A integridade da cromatina espermática foi avaliada por meio do Teste de Azul de Toluidina (Shamsi et al., 2011). Esfregaços obtidos a partir das amostras de espermatozoides coletadas da cauda epididimária, foram fixados em etanol/acetona (1:1), a 4°C, por 30 minutos e, em seguida, submetidos à hidrólise ácida (0,1N HCl), a 4°C, por 5 minutos. Os esfregaços foram então imersos em solução de azul de toluidina 0,05%, durante 5 minutos. A análise foi realizada em microscópio de luz e 200 espermatozoides foram classificados de acordo com a coloração, sendo azul claro espermatozoides com cromatina íntegra e aqueles com tons escuros de azul ou roxos, com cromatina não íntegra (Rezakhaniha et al., 2018).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism 8*. Para a comparação dos resultados, foi utilizado o teste paramétrico “t” de *Student* para os dados que apresentaram distribuição normal ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para aqueles que não apresentaram distribuição normal. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação de proporções. As diferenças foram julgadas significantes quando  $p \leq 0,05$ .

#### 4 RESULTADOS

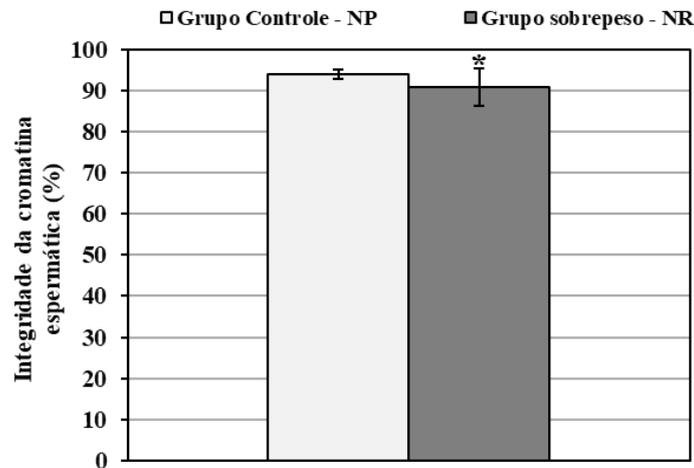
Os animais adultos, aos 119dpp, com sobrepeso induzido por supernutrição neonatal (grupo NR) apresentaram aumento estatisticamente significante na proporção de espermatozóides com fragmentação do DNA (Figura 1).

Figura 1. Avaliação da fragmentação do DNA de espermatozóides coletados da cauda epididimária proximal de animais dos grupos controle – ninhada padrão (NP) e sobrepeso – ninhada reduzida (NR). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Teste “t” de *Student* não-pareado; \* $p \leq 0,05$ . n=8.



Também ocorreu redução estatisticamente significante na proporção de espermatozóides com a cromatina íntegra no subgrupo sobrepeso-NR, em relação ao grupo controle (Figura 2).

Figura 2. Integridade da cromatina de espermatozoides epididimários pertencentes a ratos dos grupos controle – ninhada padrão (NP) e sobrepeso – ninhada reduzida (NR). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Teste “t” de Student não-pareado; \* $p \leq 0,05$ . n=8.



Entretanto, não ocorreram alterações dos parâmetros relativos à fertilidade e a capacidade reprodutiva masculina. Ainda, não houveram diferenças significativas quanto aos parâmetros morfométricos fetal e placentário, entre os grupos controle e sobrepeso, com exceção do diâmetro maior da placenta (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da capacidade reprodutiva de ratos machos pertencentes aos grupos controle – ninhada padrão (NP) e sobrepeso – ninhada reduzida (NR).

	Ninhada Padrão – NP (n=8)	Ninhada Reduzida – NR (n=8)
Número de sítios de implantação <sup>a</sup>	12,7 $\pm$ 1,4	12,7 $\pm$ 1,4
Número de corpos lúteos <sup>a</sup>	14,3 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 1,3
Taxa de implantação <sup>b</sup>	92,9 (73,3-100)	86,7 (73,3-87,5)
Número de reabsorções <sup>b</sup>	0 (0-2,0)	0 (0-1,0)
Taxa de reabsorção <sup>b</sup>	0 (0-13,6)	0 (0-9,1)
Taxa de perdas pré-implantação <sup>b</sup>	7,1 (0-27,0)	13 (13,0-15,0)
Taxa de perdas pós-implantação <sup>b</sup>	0 (0-27,0)	0 (0-9,0)
Número de fetos vivos/ ninhada <sup>a</sup>	12,0 $\pm$ 2,7	12,1 $\pm$ 2,2
Peso fetal (g) <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 0,2
% SPA <sup>c</sup>	2,8	0,0
% APA <sup>c</sup>	94,4	97,6
% LPA <sup>c</sup>	2,8	2,4
Comprimento nasoanal (mm) <sup>a</sup>	37,2 $\pm$ 1,9	38,4 $\pm$ 0,8
Índice ponderal <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01
Peso da placenta (g) <sup>b</sup>	0,52 (0,44-0,55)	0,56 (0,55-0,57)
Índice placentário <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,01

Diâmetro maior (mm) <sup>a</sup>	12,5 ± 0,5	13,5 ± 0,4*
Diâmetro menor (mm) <sup>a</sup>	10,7 ± 0,8	11,5 ± 0,4
Espessura (mm) <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,3

<sup>a</sup> Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” não pareado; \*p ≤ 0,05.

<sup>b</sup> Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste de Mann-Whitney.

<sup>c</sup> Valores expressos em porcentagem. Teste exato de Fischer. APA (*adequate for pregnancy age*): peso adequado para a idade gestacional; SPA (*small for pregnancy age*): peso baixo para a idade gestacional; LPA (*large for pregnancy age*): acima do peso para a idade gestacional.

## 5 DISCUSSÃO

Os efeitos do sobrepeso e da obesidade nos órgãos reprodutivos não são completamente compreendidos, são complexos e podem impactar negativamente a fertilidade masculina, por diversos mecanismos, que incluem aumento do estresse oxidativo, temperatura escrotal alterada relacionada à distribuição de tecido adiposo e desequilíbrio na relação testosterona/ estrógeno, culminando em alterações na espermatogênese, espermiogênese e maturação espermática e, portanto, na qualidade espermática (Martin, 2014; Kawwass et al. 2015; Jia et al., 2018; Pini et al., 2020). O ambiente nutricional neonatal desempenha um papel importante na programação dos mecanismos que determinam o ganho de peso corporal e o metabolismo ao longo da vida. Estudos experimentais, em ratos, demonstraram que a supernutrição perinatal, por meio da redução de ninhada, está envolvida no ganho de peso acelerado durante a lactação, e manutenção de pesos corporais mais elevados na idade adulta (Heidel et al., 1999; Stallings, 2002; Davidowa; Plagemann, 2001; Mozes et al., 2004; Xiao et al., 2007; Patel et al., 2009; Plagemann, 2006; Spencer; Tilbrook, 2009; Liu et al., 2013).

No presente estudo, os espermatozoides de animais do grupo sobrepeso, submetidos a redução de ninhada no período neonatal, apresentaram aumento na fragmentação do DNA e redução na integridade da cromatina. A fragmentação do DNA foi avaliada pelo Ensaio de Laranja de Acridina (AO – *Acridine Orange*), que é um corante catiônico fluorescente seletivo para ácido nucléico e permeável às células, o qual se intercala a molécula de DNA após desnaturação, emitindo fluorescência. Desta forma, o ensaio permite detectar, indiretamente, amostras de espermatozoides com alto grau de fragmentação do DNA, por meio da suscetibilidade desta molécula à desnaturação *in situ* e em pH extremamente baixo (Evenson et al., 1991). A redução da compactação da cromatina dos espermatozoides de animais com sobrepeso foi confirmada por meio do teste de azul de toluidina (AT), que fornece informações indiretas sobre a protaminação e a estabilidade da cromatina, devido a afinidade do corante por resíduos de grupamentos

fosfatos livres ao DNA do espermatozóide que possui cromatina pouco compactada e fragmentada; quando o AT se liga a regiões de histonas, ricas em lisinas, resulta em uma coloração intensa violeta-azulada (Shamsi et al., 2011).

No entanto, espermatozóides com DNA danificado, independentemente da gravidade, têm a capacidade de fertilizar o oócito II. Geralmente, uma pequena porcentagem de espermatozóides possui algum tipo de dano ao DNA, porém ele é geralmente reparado no citoplasma do oócito II. No entanto, o oócito tem a capacidade limitada de reparo e danos além desse limite resultarão em redução da razão de clivagem do blastocisto, redução do potencial de formação do blastocisto, aumento de morte embrionária prematura e baixa taxa de desenvolvimento embrionário, indicando redução na fertilidade masculina (Ahmadi & Ng, 1999).

O potencial de fertilidade quantifica, através da contagem dos sítios de implantação no útero e de corpos lúteos no ovário da fêmea, a capacidade fértil do macho que está sendo avaliado. Quanto menor a taxa de perdas pré-implantação, maior o potencial de fertilidade do macho. As taxas de perda pré e pós-implantação também permitem identificar se um fator ambiental interfere em eventos ocorridos antes da implantação ou causou alterações no pós-implante. Após os testes de capacidade reprodutiva e fertilidade, não houve diferença estatisticamente significativa entre os ratos machos pertencentes aos grupos controles e sobrepeso.

Altos níveis de fragmentação do DNA espermático podem não estar necessariamente associados a uma diminuição nas taxas de fertilização (Janny & Menezo, 1994; Sakkas et al., 1996; Jones et al., 1998; Twigg et al., 1998; Larson et al., 2000; Miller & Smith, 2001; Larson-Cook et al., 2003), mas podem potencialmente ocasionar impactos adversos sobre o desenvolvimento da prole (Coder et al., 2010).

Vários fatores adversos podem alterar a protaminação da cromatina e integridade do DNA, dentre eles o estado nutricional, o sobrepeso/obesidade e a exposição paterna a agentes químicos diversos. Desta forma, o número crescente de estudos que visam entendimento do papel desempenhado pelo genoma paterno sobre o processo de fertilização, a viabilidade e o desenvolvimento embriofetal e pós-natal da prole (Marcho et al., 2020), bem como na gênese de doenças de início tardio na progênie, demonstram a importância deste tema.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados sugerem que a supernutrição neonatal causou alterações no genoma paterno, na fase adulta, caracterizadas por fragmentação do DNA e redução na protaminação da cromatina espermática, mas que não afetou a fertilidade e a capacidade reprodutiva masculina. Futuros estudos estão sendo conduzidos para avaliação de possíveis efeitos do sobrepeso paterno sobre o desenvolvimento embriofetal e na ocorrência de malformações congênitas na prole.

## REFERÊNCIAS

- Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999;284(6):696-704.
- Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014;7:587-591.
- Alshahrani S, Ahmed AF, Gabr AH, Abalhassan M, Ahmad G. The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia.* 2016;48(10):1125-1129.
- Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism.* 2019;92:121-135.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl.* 2011;34:402-410.
- Bernhardt L, Dittrich M, El-Merahbi R, Saliba AE, Müller T, Sumara G, Vogel J, Nichols-Burns S, Mitchell M, Haaf T, El Hajj N. A genome-wide transcriptomic analysis of embryos fathered by obese males in a murine model of diet-induced obesity. *Sci Rep.* 2021;11(1):1979.
- Carter R 3rd, Watenpaugh DE. Obesity and obstructive sleep apnea: or is it OSA and obesity? *Pathophysiology.* 2008;15(2):71-77.
- Chahoud I, Kwasigroch TE. Controlled breeding of laboratory animals. In: Neubert D, Merker H-J, Kwasigroch TE (eds). *Methods in prenatal toxicology.* Berlin: Thieme Publ., 1997. pp. 78-91.
- Chambers TJ, Richard RA. The impact of obesity on male fertility. *Hormones (Athens).* 2015;14(4):563-568.
- Coder PS, Slotter ED, Stump DG, Nemec MD, Bowman CJ. Evaluation of a Male Reproductive Toxicant. In: McQueen CA, ed. *Comprehensive Toxicology.* Oxford: Elsevier; 2010. pp. 61-86.
- Damasceno DC, Silva HP, Vaz GF, Vasques-Silva FA, Calderon IM, Rudge MV, Campos KE, Volpato GT. Diabetic rats exercised prior to and during pregnancy: maternal reproductive outcome, biochemical profile, and frequency of fetal anomalies. *Reprod Sci.* 2013;20(7):730-738.
- Davidowa H, Plagemann A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport* 2001;12:3201-3204.
- Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol.* 1991;5(2):115-125.
- Faqi AS. Methods for Detection of Developmental Toxicity. In: McQueen CA, ed. *Comprehensive Toxicology.* Oxford: Elsevier, 2010. pp 277-297.

Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int.* 2012;110(6):863-867.

Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr.* 2013;143(5):553-562.

Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2222-2225.

Heidel E, Plagemann A, Davidowa H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *Neuroreport.* 1999;10(9):1827-1831.

Janny L, Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev.* 1994;38(1):36-42.

Jia YF, Feng Q, Ge ZY, Guo Y, Zhou F, Zhang KS, Wang XW, Lu WH, Liang XW, Gu YQ. Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urol.* 2018;18(1):42.

Jia YF, Feng Q, Ge ZY, Guo Y, Zhou F, Zhang KS, Wang XW, Lu WH, Liang XW, Gu YQ. Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urol.* 2018;18(1):42.

Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 1998;70(6):1022-1029.

Kachur S, Lavie CJ, de Schutter A, Milani RV, Ventura HO. Obesity and cardiovascular diseases. *Minerva Med.* 2017;108(3):212-228.

Katib A. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent European J Urol.* 2015;68(1):79-85.

Kawwass JF, Summer R, Kallen CB. Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: a critical review. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(8):617-632.

Kiess W, Wagner IV, Kratzsch J, Körner A. Male Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015;44(4):761-772.

Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2000;15(8):1717-1722.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003;80(4):895-902.

Liu HW, Srinivasan M, Mahmood S, Smiraglia DJ, Patel MS. Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305(7):E785-E794.

Marcho C, Oluwayiose OA, Pilsner JR. The preconception environment and sperm epigenetics. *Andrology*. 2020;8(4):924-942.

Martin LJ. Implications of adiponectin in linking metabolism to testicular function. *Endocrine*. 2014;46(1):16-28.

Miller JE, Smith TT. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development in vitro. *Hum Reprod*. 2001;16(5):918-924.

Mozes S, Sefčíková Z, Lenhardt L, Racek L. Obesity and changes of alkaline phosphatase activity in the small intestine of 40- and 80-day-old rats subjected to early postnatal overfeeding or monosodium glutamate. *Physiol Res*. 2004;53(2):177-186.

Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA*. 1999;282(16):1523-1529.

*Nunes M, Fischer LW, Valle Freitas RD, Miraglia SM, Oliva SU.* Epididymal effects of carbamazepine and potential impacts on sperm maturation. *Braz J Hea Rev*. 2020;3(3), 4091-4101.

Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012 Oct 1;2(4):253-263.

Patel MS, Srinivasan M, Laychock SG. Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *J Inherit Metab Dis*. 2009;32(2):218-228.

Pini T, Parks J, Russ J, Dzieciatkowska M, Hansen KC, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe M. Obesity significantly alters the human sperm proteome, with potential implications for fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2020 Apr;37(4):777-787.

Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dörner G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res*. 1999;836(1-2):146-155.

Plagemann A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm Res*. 2006;65 Suppl 3:83-89.

Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82-97.

Qin DD, Yuan W, Zhou WJ, Cui YQ, Wu JQ, Gao ES. Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian J Androl*. 2007;9(6):827-834.

Rezakhaniha B, Heidari R, Abbasi M. Can *Melissa officinalis* improve chromatin structure and sperm parameters in a rat model of varicocele? *Andrologia*. 2018; 50(8):e13058.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010;93(4):1027-1036.

Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana A. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11(4):837-843.

Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril.* 2002;78(2):313-318.

Sepidarkish M, Maleki-Hajiagha A, Maroufizadeh S, Rezaeinejad M, Almasi-Hashiani A, Razavi M. The effect of body mass index on sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond).* 2020 Mar;44(3):549-558.

Shamsi MB, Imam SN, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(11):1073-85.

Soulimane-Mokhtari NA, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A, Merzouk H, Khan NA. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(3):287-295.

Spanò M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril.* 2007;73(1):43-50.

Spencer SJ, Tilbrook A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(8):1133-1143.

Stallings VA. Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. *Pediatrics.* 2002;109(2):194-199.

Teerds KJ, de Rooij DG, Keijer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update.* 2011;17(5):667-683.

Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 1984;42(1):87-91.

Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia.* 2011;43(2):121-128.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(7):1864-1871.

Tyl RW, Marr MC. Developmental toxicity testing—Methodology. In: Hood RD ed. *Developmental and Reproductive Toxicology - A Practical Approach.* London: CRC Press, 2012. pp. 139-183.

Xiao XQ, Williams SM, Grayson BE, Glavas MM, Cowley MA, Smith MS, Grove KL. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology.* 2007;148(9):4150-4159.