RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 30/08/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Impacto da sacarina sódica sobre a programação do desenvolvimento intergeracional

Me. Alana Rezende Godoi Rebeschini

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

Botucatu – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

IMPACTO DA SACARINA SÓDICA SOBRE A PROGRAMAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INTERGERACIONAL

ME. ALANA REZENDE GODOI REBESCHINI

PROFA. DRA. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO

PROF. DR. FRANCISCO EDUARDO MARTINEZ

PROF. DR. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Botucatu – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rebeschini, Alana Rezende Godoi.
Impacto da sacarina sódica sobre a programação do desenvolvimento intergeracional / Alana Rezende Godoi Rebeschini. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Patricia Fernanda Felipe Pinheiro
Coorientador: Francisco Eduardo Martinez
Coorientador: Erick José Ramo da Silva
Capes: 20100000

1. Açúcares. 2. Sacarose. 3. Metabolismo. 4. Reprodução humana. 5. Testículos.

Palavras-chave: Adoçante; DOHaD; Metabolismo de glicose; Reprodução masculina; Testículo.

POTENCIAL IMPACTO CIENTÍFICO

O estudo sobre possíveis causas de infertilidade masculina abrange questões de saúde pública e de igualdade de gênero. A infertilidade masculina é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde pública, sendo a causa de 20% dos casos de infertilidade em casais. Assim, o impacto social da presente pesquisa está em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3 e 5 da OMS.

POTENTIAL SCIENTIFIC IMPACT

The study on possible causes of male infertility encompasses public health and gender equality issues. Male infertility is recognized by the World Health Organization (WHO) as a public health problem, being the cause of 20% of infertility cases in couples. Thus, the social impact of the present research is in line with the Sustainable Development Goals (SDGs) 3 and 5 of the WHO.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ALANA REZENDE GODOI REBESCHINI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 30 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 08:30 horas, no(a) Sala da Pós-Graduação da Central de Aulas, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ALANA REZENDE GODOI REBESCHINI, intitulada **Impacto da sacarina sódica sobre a programação do desenvolvimento intergeracional**. A Comissão Examinadora foi constituida pelos seguintes membros: Profa. Dra. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA (Co-orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. BRUNO CESAR SCHIMMING (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências da Saúde / Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE - Presidente Prudente, Profa. Dra. CRISTIANE FIGUEIREDO PINHO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP - Câmpus de Bauru. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO

AGRADECIMENTOS

À Patricia Fernanda Felipe Pinheiro, que, ao longo desses 8 anos de trabalho e parceria, foi muito mais do que uma orientadora. Foi mãe e amiga. Compartilhou momentos bons e ruins, vibrou com minhas conquistas como se fossem suas, chorou minhas dores e se preocupou comigo até mesmo quando não era seu papel. Depositou sua confiança em mim, acreditou na minha capacidade e nos meus ideais. Fez-se leve quando tudo parecia pesado e foi fortaleza quando necessário. Moldou-me e permitiu ser moldada. Viu-se mãe de um pequeno e lindo príncipe, permitindo que eu acompanhasse toda essa jornada em seu grande sonho. Dizem que os orientados carregam consigo traços de seus orientadores. Sinto-me honrada por carregar traços da grande mulher, professora e orientadora que você é. Desejo que este seja apenas o fim de mais um capítulo da grande jornada que ainda iremos percorrer juntas. Meu maior e mais sincero agradecimento!

Ao Francisco Eduardo Martinez, meu coorientador, exemplo de profissional generoso, competente e de inteligência ímpar. Agradeço por todos os cafés partilhados, pelos e-mails reflexivos que recebíamos todas as manhãs e por todas as conversas filosóficas que tivemos. O senhor nos abraçou como éramos, demonstrando que não devemos nos reprimir para caber nos conceitos alheios. Obrigada!

Ao Erick José Ramo da Silva, também coorientador, agradeço por abrir as portas não apenas do seu laboratório, mas por manter-se disponível em todos os momentos necessários para a realização deste trabalho. Obrigada!

Ao meu esposo Raul César Dias Rebeschini. Agradecer a você pode ser uma das coisas mais complicadas que eu tenha que fazer, pois você não foi apenas meu companheiro; foi meu porto seguro. Você confia e acredita em mim mais do que eu mesma um dia possa acreditar. Foi responsável por eu encarar situações que eu jamais me colocaria. Você sonhou e sonha meus sonhos. Esteve comigo nos meus dias mais sombrios e sabe o quanto essa conquista significa para mim. Obrigada pela linda família que estamos construindo. Obrigada por dividir sua vida, seus sentimentos, incertezas e inseguranças comigo. Desejo que alcancemos muito mais do que um dia desejamos, e que façamos isso juntos, de corpo e alma. Obrigada pelos 12 anos de companheirismo, amor e cuidado. Que muitos outros anos venham e que sejam tão maravilhosos quanto esses. Izzy e eu te amamos profundamente!

Aos meus pais, Isabel Cristina de Rezende Godoi e Ronaldo Godoi. Meu alicerce. Sou a junção da força e companheirismo de um, e da determinação e objetividade do outro. Me ensinaram que desistir não é uma opção. Vocês são os grandes responsáveis pela mulher que eu me tornei. Obrigada por todo amor, apoio, por abraçarem meus objetivos e confiarem em mim. Essa é mais uma conquista nossa! Eu amo vocês!

À minha irmã, Francine de Rezende Chuilki, que vibra com todas as minhas conquistas e, juntamente com meu cunhado, Raphael Kleber Chuilki, me apoiou e incentivou desde o primeiro momento. Obrigada por estarem, mais uma vez, compartilhando essa conquista comigo. Obrigada também pelos meus dois bigatos favoritos. Amo vocês!

Ao meu irmão, Arthur Rezende Godoi, o meu gordinho favorito. Você é uma das pessoas mais puras que já conheci. O menino que eu vi tornando-se pai tão cedo, mas que fez e faz seu papel com maestria. Obrigada pelo apoio e pelos três sobrinhos maravilhosos. Eu te amo!

Aos meus sogros, Sueli Aparecida Dias Rebeschini e Antônio Carlos Rebeschini. Pelo apoio, incentivo e por sempre desejarem meu sucesso. Amo vocês!

À Maira Smaniotto Cucielo, minha amiga e irmã de coração. Você esteve comigo em cada passo desse trabalho e em cada conquista da minha vida nesses 6 anos de amizade. Chorou, comemorou, cuidou e zelou, de mim e, principalmente, da minha baby Izzy Judite (a tia favorita, rs). Por muito tempo eu disse que você era meu completo oposto. Hoje não posso afirmar que isso ainda é verdade. Você despertou o lado cuidadoso e carinhoso que eu havia evitado por muito tempo. Me ensinou que nem sempre eu posso deixar meu lado sincero falar mais alto, porque às vezes, tudo que uma pessoa precisa é de um simples abraço. Obrigada por querer se fazer presente e não permitir que a distância ou os infortúnios da vida afetem a sincera amizade que construímos. Eu te amo!

À Vanessa Caroline Fioravante, meu braço direito. Me acompanhou, literalmente, em todos os passos desse trabalho, fornecendo apoio não apenas profissional, mas também sendo um ombro amigo. Obrigada!

À minha equipe, Tainá Miotto de Souza, Gabriela Monteiro de Oliveira, Isabel Bertholdo Ferreira, Sarah Cordeiro Yamashita e Yasmin Pereira de Lira. Obrigada por não medirem esforços na realização desse trabalho.

Aos servidores e amigos que a anatomia me deu, Cris, Gelson, Paulo, Luciano e Rinaldo. Obrigada por todos os cafés, risadas e partilha de conhecimento. Tenham certeza de que vocês deixaram meus dias mais leves. Sentirei falta de todos!

À amada Vandinha, que cuidou de mim como se eu fosse sua filha. Obrigada por todo carinho e zelo. Te amo!

Aos docentes, servidores e colegas do setor de Anatomia – IBB, pelos conhecimentos partilhados e pelas risadas a cada café. Obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2023/05096-8.

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho.”

(Steve Jobs)

RESUMO

A infertilidade é um problema global que afeta uma em cada seis pessoas no mundo, com fatores genéticos contribuindo para 10-20% dos casos masculinos. Alterações no ambiente materno, como estresse e nutrição, podem impactar o desenvolvimento natural da prole, destacando a importância dos fatores epigenéticos na programação do desenvolvimento. No contexto da nutrição, observa-se um aumento global no consumo de adoçantes artificiais, frequentemente justificado para controle de peso, diabetes e fins estéticos. Embora sejam escolhidos por seus supostos benefícios à saúde, a WHO recentemente desaconselhou o uso de adoçantes por indivíduos saudáveis, devido à sua ineficiência a longo prazo na redução dos riscos de doenças não transmissíveis. Além disso, estudos demonstraram que os adoçantes são capazes de afetar os mecanismos regulatórios do apetite e impactar negativamente aspectos reprodutivos em machos. Assim, este estudo investigou a possível herança intergeracional na programação do desenvolvimento de ratos machos (F1 e F2) resultante da exposição de ratas (F0) à sacarina sódica durante os períodos gestacional e lactacional, e suas implicações no metabolismo energético e na saúde reprodutiva. Ratas prenhes da linhagem *Sprague-Dawley* foram divididas em dois grupos experimentais: Grupo Controle (C): composto por ratas que consumiram ração e água *ad libitum* (n=10); Grupo Sacarina Sódica (S): composto por ratas que consumiram ração e água *ad libitum* adoçadas com 0,3% de sacarina sódica (n=10) (protocolo CEUA nº 8109101219). A prole masculina (DPN21 e 120, F1 e F2) foi morta e os testículos foram dissecados, pesados e processados conforme os protocolos adotados. O consumo de sacarina sódica não afetou peso corpóreo e eficiência alimentar dos animais. Nas mães, houve aumento de insulina em F0, grelina em F0 e F1, e reduções de glucagon e insulina em F1. Nos machos F1 no DPN21, observaram-se reduções de grelina, leptina, insulina, e aumento de GLUT2 e gordura visceral, além de atraso na puberdade. No DPN120, níveis baixos de leptina e insulina persistiram, com reduções em ER-α, 5-α redutase, aromatase, testosterona, e alterações espermáticas. Na geração F2, DPN21 mostrou grelina reduzida, aumento de AR e redução de PCNA e 5-α redutase; DPN120 exibiu leptina elevada, AR e ER-α baixos, com produção espermática reduzida, atraso no trânsito espermático e morfologia alterada. O consumo materno de sacarina sódica foi capaz de afetar a saúde reprodutiva dos machos por duas gerações. Na geração F1, a sacarina sódica programou alterações metabólicas que, por sua vez, influenciaram o eixo HHG. Já na geração F2, as mudanças programadas pela sacarina sódica no sistema energético comprometeram diretamente a saúde testicular dos animais. Esses achados destacam a necessidade de uma análise cuidadosa dos riscos associados ao uso de adoçantes sobre a saúde reprodutiva.

Palavras-chave: Adoçante; DOHaD; Metabolismo de glicose; Reprodução masculina; Testiculo.

ABSTRACT

Infertility is a global issue affecting one in six people worldwide, with genetic factors contributing to 10-20% of male cases. Alterations in the maternal environment, such as stress and nutrition, can impact the natural development of offspring, highlighting the importance of epigenetic factors in developmental programming. In the context of nutrition, there is a global increase in artificial sweetener consumption, often justified for weight control, diabetes, and aesthetic purposes. Although chosen for their purported health benefits, the WHO has recently discouraged the use of sweeteners by healthy individuals due to their long-term inefficiency in reducing the risks of non-communicable diseases. Furthermore, studies have shown that sweeteners can affect appetite regulatory mechanisms and negatively impact male reproductive aspects. This study investigated the potential intergenerational inheritance in the developmental programming of male rats (F1 and F2) resulting from the exposure of female rats (F0) to sodium saccharin during gestational and lactational periods, and its implications on energy metabolism and reproductive health. Pregnant Sprague-Dawley rats were divided into two experimental groups: Control Group (C), composed of rats that consumed food and water ad libitum (n=10); and Sodium Saccharin Group (S), composed of rats that consumed food and water ad libitum sweetened with 0.3% sodium saccharin (n=10) (CEUA protocol no. 8109101219). Male offspring (PND21 and 120, F1 and F2) were euthanized, and their testes were dissected, weighed, and processed according to adopted protocols. Sodium saccharin consumption did not affect body weight or food efficiency in the animals. In the mothers, there was an increase in insulin in F0, ghrelin in F0 and F1, and reductions in glucagon and insulin in F1. In F1 males at PND21, reductions in ghrelin, leptin, and insulin were observed, along with an increase in GLUT2 and visceral fat, as well as delayed puberty. At PND120, low levels of leptin and insulin persisted, with reductions in ER-α, 5-α reductase, aromatase, testosterone, and sperm alterations. In the F2 generation, PND21 showed reduced ghrelin, increased AR, and reduced PCNA and 5-α reductase; PND120 exhibited elevated leptin, low AR and ER-α, reduced sperm production, delayed sperm transit, and altered morphology. Maternal consumption of sodium saccharin was able to affect male reproductive health across two generations. In the F1 generation, sodium saccharin programmed metabolic changes that, in turn, influenced the HPG axis. In the F2 generation, sodium saccharin's programmed changes in the energy system directly compromised the animals' testicular health. These findings highlight the need for careful analysis of the risks associated with the use of sweeteners on reproductive health.

Keywords: Sweetener; DOHaD; Glucose metabolism; Male reproduction; Testis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH – Amplitude do deslocamento lateral da cabeça

ANOVA – Análise de variância

AR – Receptor de andrógeno

AUC – Área sob a curva

BTB – Blood Testis-Barrier

C – Grupo controle

CA – Cabeça

CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis

CD – Cauda

CEA – Eficácia alimentar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO – Corpo

CONCEA – Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal

DG – Dia gestacional

DHT – Diidrotestosterona

DL – Dia lactacional

DOHaD – Developmental Origins of Health and Disease

DP – Desvio padrão

DPD – Dia pós-desmame

DPN – Dia pós-natal

EA – Eficiência alimentar

ER – Receptor de estrógeno

F0 – Geração 0

F1 – Geração 1

F2 – Geração 2

FDA – Food and Drug Administration

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GH – Hormônio de crescimento

GLUT – Transportador de glicose

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

GPCC – Ganho de peso por consumo calórico

HHG – Hipotálamo-Hipófise-Gônada

HTF – Human Tubal Fluid

Kcal – Quantidade total de calorias ingeridas

LC – Célula de Leydig

LH – Hormônio luteinizante

LIN – Linearidade

MPW – Masculinization Programming Window

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

PBS – Fosfato de sódio

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PF – Peso corporal final

PI – Peso corporal inicial

PND – Postnatal day

PRL – Prolactina

S – Grupo sacarina sódica

SC – Célula de Sertoli

SG – Semana gestacional

SL – Semana lactacional

STR – Retilinearidade

T – Testosterona

T2R – Receptor de sabor amargo

TA – Quantidade total de alimento ingerido

TTI – Teste de tolerância à insulina

TTOG – Teste de tolerância oral à glicose

VAP – Velocidade média do trajeto

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade linear

WHO - World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distúrbios quantitativos da espermatogênese e a frequência de fatores genéticos (KRAUSZ; RIERA-ESCAMILLA, 2018). 1

Figura 2 – Epigenética intergeracional. 3

Figura 3 - Estrutura conceitual para o impacto da exposição precoce a adoçantes em resultados relacionados à obesidade mais tarde na vida. A exposição a adoçantes ocorrendo no útero, por meio da lactação ou por meio da alimentação direta pode afetar a programação do desenvolvimento do metabolismo, preferências de sabor e microbiota intestinal, influenciando, em última análise, o ganho de peso, adiposidade e obesidade. Adaptado de ARCHIBALD; DOLINSKY; AZAD, 2018. 4

Figura 4 - Estrutura química da sacarina sódica. 4

Figura 5 - Esquema sobre a atuação dos andrógenos (tempo-dependente) na determinação da diferenciação, formação e crescimento dos órgãos do sistema genital masculino. Em ratos, a MPW ocorre entre 15,5 e 18,5 dias pós-concepção. Note que, nos períodos da MPW e pós-natal, os andrógenos atuam no desenvolvimento dos órgãos. GT, tubérculo genital; VP, próstata ventral; WD, duto de Wolff; AGD, distância anogenital (WELSH et al., 2008). 5

Figura 6 - Delineamento experimental. 10

Figura 7 - Parâmetros das matrizes das gerações F0 e F1 de peso corporal (A e B), consumo de ração (C e D), consumo de água (E e F) e eficiência alimentar (G e H). Valores expressos como média±DP. Os valores de P foram calculados usando o teste t e ANOVA de duas vias. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) a partir do teste de comparações múltiplas de Sidak pós-hoc. Figuras A: P_{Inter}= 0,4139, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,4952; B: P_{Inter}= 0,7700, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,3436; C: P_{Inter}= 0,0024, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,1651; D: P_{Inter}= 0,5523, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,7577; E: P_{Inter}= 0,1032, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,0267; F: P_{Inter}= 0,0031, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,0671; G: P_{Inter}= 0,0892, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,9446; H: P_{Inter}= 0,3252, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,6119. Dia Gestacional (DG), Dia Lactacional (DL), Semana Gestacional (SG), Semana Lactacional (SL), Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) e Ganho de Peso Corpóreo por Consumo Calórico (GPCC). 17

Figura 8 - Parâmetros da prole das gerações F1 e F2 de peso corporal (A e B), consumo de ração (C e D), consumo de água (E e F) e eficiência alimentar F1 (G) e F2 (H). Valores expressos como média±DP. Os valores de P foram calculados usando o teste t e ANOVA de duas vias.

*Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) a partir do teste de comparações múltiplas de Sidak pós-hoc. Figuras A: P_{Inter}= 0,7564, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,7389; B: P_{Inter}= 0,9975, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,8444; C: P_{Inter}= <0,0001, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,1504; D: P_{Inter}= 0,0001, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,5821; E: P_{Inter}= <0,0001, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,3411; F: P_{Inter}= 0,0043, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,3029; G: P_{Inter}= 0,0242, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,0242; H: P_{Inter}= 0,9546, P_{Semana}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,9546. Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) e Ganho de Peso por Consumo Calórico (GPCC). 18

Figura 9 - Análise das fêmeas (n=8/grupo) da geração F0 para o teste de tolerância à insulina (TTI) (A e C), teste de tolerância oral à glicose (TTOG) (B e E) e áreas sob as curvas (AUC) (C e F). Os valores são expressos como média±DP. Os valores de P foram calculados usando o teste t e ANOVA de duas vias. *Diferenças significativas entre os grupos ($p<0,05$) a partir do teste de comparações múltiplas de Sidak pós-hoc. Figuras A: P_{Inter}= 0,9495, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,3122; B: P_{Inter}= 0,3376, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,7008; D: P_{Inter}= 0,9195, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,6760; E: P_{Inter}= 0,3009, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,1357. 19

Figura 10 - Análise das fêmeas (n=8/grupo) da geração F1 para o teste de tolerância à insulina (TTI) (A e C), teste de tolerância oral à glicose (TTOG) (B e E) e áreas sob as curvas (AUC) (C e F). Os valores são expressos como média±DP. Os valores de P foram calculados usando o teste t e ANOVA de duas vias. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) a partir do teste de comparações múltiplas de Sidak pós-hoc. Figuras A: P_{Inter}= 0,1559, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,2199; B: P_{Inter}= 0,6008, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,2147; D: P_{Inter}= 0,8460, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,9417; E: P_{Inter}= 0,8454, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,6824. 19

Figura 11 - Análise da prole (n=8/grupo) das gerações F1 e F2 para o teste de tolerância à insulina (TTI) (A e C), teste de tolerância oral à glicose (TTOG) (B e E) e áreas sob as curvas (AUC) (C e F). Os valores são expressos como média±DP. Os valores de P foram calculados usando o teste t e ANOVA de duas vias. *Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) a partir do teste de comparações múltiplas de Sidak pós-hoc. Figuras A: P_{Inter}= 0,2394, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,9572; B: P_{Inter}= 0,7941, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,0978; D: P_{Inter}= 0,9897, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,1855; E: P_{Inter}= 0,8019, P_{Tempo}= <0,0001, P_{Grupo}= 0,1287. 20

Figura 12 – Análise densitométrica óptica de AR (A), ER-α (B), PCNA (C), 5α-redutase (D), aromatase (E) e GLUT2 (F) da prole das gerações F1 e F2 no DPN21. Valores expressos como média±DP (n=4). *Significância entre os grupos ($P<0,05$). 21

Figura 13 - Análise densitométrica óptica de AR (A), ER-α (B), PCNA (C), 5α-redutase (D), aromatase (E) e GLUT2 (F) da prole das gerações F1 e F2 no DPN120. Valores expressos como média±DP (n=4). *Significância entre os grupos (P<0,05).....22

Figura 14 - Motilidade dos espermatozoides da prole das gerações F1 e F2. Valores expressos como média±DP (n=12). 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso de gordura e índice de adiposidade, níveis plasmáticos de grelina, leptina, glucagon e insulina das matrizes F0 e F1 nos grupos controle e sacarina sódica. 16

Tabela 2 – Parâmetros de desenvolvimento, peso de gorduras e órgãos, índice de adiposidade, níveis plasmáticos de testosterona, 17β-estradiol, grelina, leptina, glucagon e insulina da prole F1 e F2 aos 21 dias de idade dos grupos controle e sacarina sódica. 20

Tabela 3 – Peso de gorduras e órgãos, índice de adiposidade, níveis plasmáticos de testosterona, 17β-estradiol, grelina, leptina, glucagon e insulina da prole F1 e F2 aos 120 dias de idade dos grupos controle e sacarina sódica. 21

Tabela 4 – Parâmetros cinemáticos, morfologia espermática e produção de espermatozoides no testículo, número de espermatozoides e tempo de trânsito espermático no epidídimo da prole masculina dos grupos controle e sacarina sódica. 23

Sumário

Introdução 1

Objetivos 8

Material e Métodos 8

Acasalamento dos animais 8

Experimento 8

Parâmetros biométricos 9

Consumo de ração e água 9

Instalação da puberdade 9

Eficiência alimentar (EA) 9

Teste de tolerância à insulina (TTI) 11

Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) 11

Coleta de material biológico 11

Determinação do índice de adiposidade 11

Extração de proteínas e Western Blotting 12

Avaliação da morfologia e da viabilidade dos espermatozoides 12

Avaliação da motilidade dos espermatozoides via CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) 12

Produção diária de espermatozoides por testículo 13

Número de espermatozoides e o tempo de trânsito no epidídimo 13

Análise hormonal 14

Forma de análise dos resultados 14

Resultados 15

O uso de sacarina sódica não afetou o peso corpóreo e o comportamento alimentar 15

O consumo de sacarina sódica causou desordens metabólicas 15

A ingestão materna de sacarina sódica afetou a instalação da puberdade 15
A sacarina sódica alterou os hormônios sexuais na prole F1 16
A sacarina sódica afetou marcadores funcionais nos testículos 16
O consumo materno de sacarina sódica afetou parâmetros espermáticos 16
Discussão 24
Conclusão 28
Referências 29

Introdução

A Organização Mundial da Saúde (do inglês “World Health Organization”, WHO) apresentou a infertilidade como um problema de saúde global, afetando, em todo o mundo, uma proporção significativa de pessoas em idade reprodutiva. Apesar da dificuldade em obter dados precisos, especialmente em países com poucos recursos, o ônus geral da subfertilidade/infertilidade é significativo, sugerindo que uma a cada seis pessoas sofre de infertilidade ao longo da vida. Dessa forma, abordar a infertilidade é essencial para garantir o direito de indivíduos e casais de gestar (Objetivos de Desenvolvimento Sustentável - ODS 3 e 5) (EISENBERG et al., 2023; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023a).

A infertilidade masculina contribui, de forma total ou parcial, para 20 a 70% dos casos de infertilidade em casais. Estima-se que mais de 30 milhões de homens no mundo sejam inférteis (AGARWAL et al., 2015). A avaliação dos índices de fertilidade é realizada por meio da análise dos parâmetros espermáticos (TOURNAYE; KRAUSZ; OATES, 2017), utilizando método padronizado pela WHO, que fornece valores de referência para a fertilidade normal, amplamente adotado pela maioria dos laboratórios (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Embora a importância da investigação da fertilidade masculina esteja bem estabelecida, a subfertilidade/infertilidade é uma patologia complexa, que pode variar desde a ausência de espermatozoides nos testículos até alterações distintas na qualidade espermática (KRAUSZ, 2011; TOURNAYE; KRAUSZ; OATES, 2017). Defeitos na espermatogênese devido a distúrbios testiculares podem apresentar uma variedade de fenótipos seminais e frequentemente estão associados a anormalidades genéticas específicas, como apresentados na figura 1 (KRAUSZ; RIERA-ESCAMILLA, 2018).

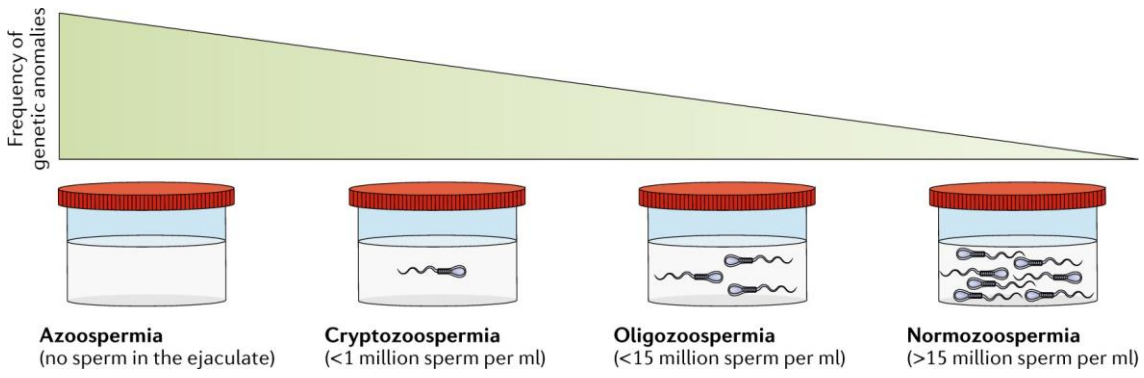


Figura 1 - Distúrbios quantitativos da espermatogênese e a frequência de fatores genéticos (KRAUSZ; RIERA-ESCAMILLA, 2018).

Os fatores genéticos são responsáveis por cerca de 10-20% dos casos de infertilidade masculina (FRIEDRICH; TÜTTELMANN, 2024; KRAUSZ; RIERA-ESCAMILLA, 2018). Inicialmente, acreditava-se que a única contribuição do espermatozoide na fertilização fosse o material genético; entretanto, estudos recentes revelaram o papel fundamental da epigenética na coordenação e na modulação da expressão gênica. A paisagem epigenética específica de cada célula permite que o mesmo genoma origine uma ampla diversidade de transcriptomas. Essa herança epigenética assegura que assinaturas específicas sejam transmitidas através das gerações, preservando a integridade do epigenoma ao longo do tempo (SCHAGDARSURENGIN; STEGER, 2016).

Alterações no ambiente materno, devido ao estresse ou fatores nutricionais, podem afetar o desenvolvimento natural da prole, direcionando-o a um novo percurso (BALE et al., 2010). Diversos estudos foram realizados para desvendar os mecanismos pelos quais esses ajustes acontecem, e hoje está estabelecida a importância dos fatores epigenéticos na programação do desenvolvimento (BOHACEK et al., 2013; CURLEY et al., 2011; HODES, 2013; MCCARTHY; NUGENT, 2013). A hipótese das "Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença" (do inglês "Developmental Origins of Health and Disease", DOHaD) descreve essas respostas adaptativas do indivíduo sob condições específicas no início da vida (FERNANDEZ-TWINN; CONSTÂNCIA; OZANNE, 2015).

Dessa forma, a exposição à aditivos nutricionais durante os períodos gestacional e lactacional nos remete a uma programação que pode então ser expressa de maneira intergeracional (Figura 2). A herança intergeracional é caracterizada pela plasticidade da paisagem epigenética, ou seja, a sensibilidade do genoma às mudanças nas condições ambientais e nutricionais (BALE, 2015).

Os mecanismos precisos pelos quais a exposição poderá influenciar a longo prazo depende do tipo e gravidade da exposição, se ela ocorre dentro de uma janela de vulnerabilidade no sistema destino ao qual quer-se investigar, e se é capaz de afetar epigeneticamente as células germinativas (BALE, 2015). Evidências epidemiológicas apontam que o tempo de exposição durante o desenvolvimento pode ser crucial para alguns desafios ambientais. Além disso, o momento da exposição pode determinar se o evento terá efeitos epigenéticos limitados ou se afetará amplamente o epigenoma, bem como por quanto tempo esse efeito poderá persistir entre as gerações (BALE, 2015; BALE et al., 2010).

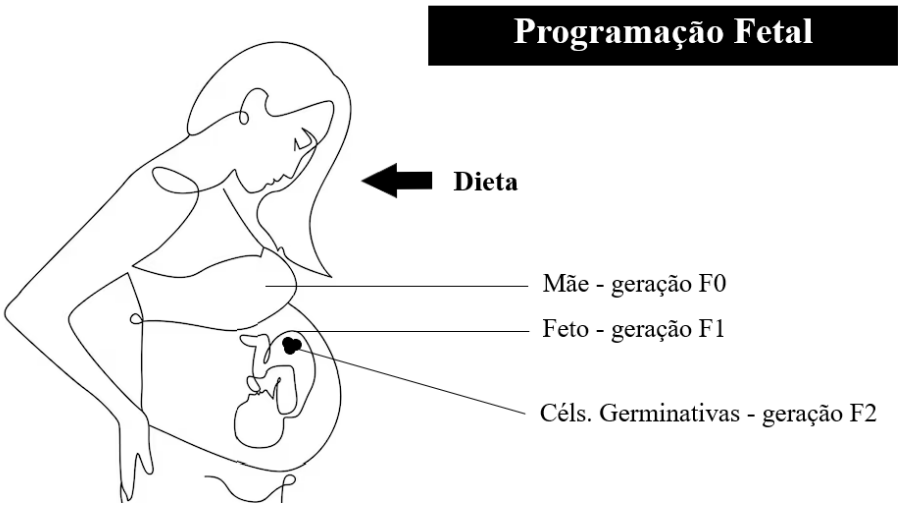


Figura 2 – Epigenética intergeracional.

Cientes da potencialidade dos fatores nutricionais influenciarem aspectos epigenéticos, observamos o aumento exponencial do consumo global de adoçantes artificiais como aditivos alimentares, frequentemente justificado pela intenção de auxiliar no controle de peso e no tratamento do diabetes (CUMMINGS; OVERDUIN, 2007; DAHER; MATTA; ABDEL NOUR, 2019; POLYÁK et al., 2010). Além disso, muitos indivíduos saudáveis também recorrem aos adoçantes com o objetivo de alcançar determinados padrões estéticos (TORLONI et al., 2007).

Embora façam essa escolha visando benefícios à saúde, estudos demonstraram que os adoçantes consumidos interferem nos mecanismos regulatórios do apetite, promovendo aumento na ingestão alimentar compensatória devido à ausência de calorias. Eles são capazes de alterar a função e a composição da microbiota intestinal, levando a desarranjos metabólicos e modificações de preferências de paladar, o que influencia o metabolismo de glicose e de lipídeos. Esses efeitos podem resultar em ganho de peso, obesidade e até diabetes (Figura 3) (ARCHIBALD; DOLINSKY; AZAD, 2018; BELLISLE; DREWNOWSKI, 2007; BERTHOUD, 2002; CUMMINGS; OVERDUIN, 2007; RENWICK; MOLINARY, 2010; SARIS, 2003; SMEETS; ERKNER; DE GRAAF, 2010; YANG, 2010).

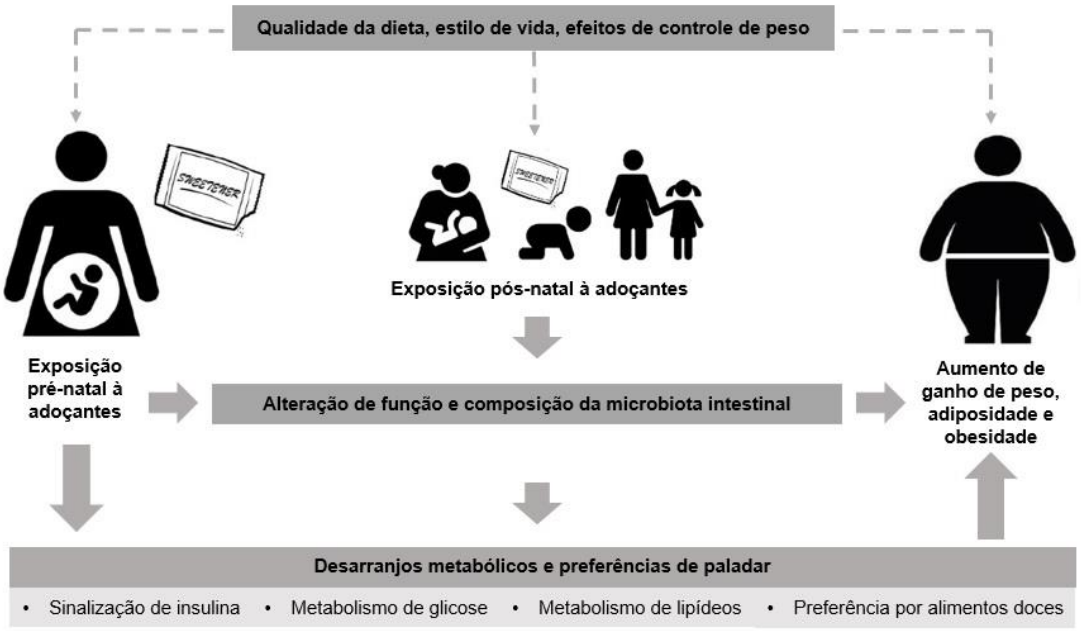


Figura 3 - Estrutura conceitual para o impacto da exposição precoce a adoçantes em resultados relacionados à obesidade mais tarde na vida. A exposição a adoçantes ocorrendo no útero, por meio da lactação ou por meio da alimentação direta pode afetar a programação do desenvolvimento do metabolismo, preferências de sabor e microbiota intestinal, influenciando, em última análise, o ganho de peso, adiposidade e obesidade. Adaptado de ARCHIBALD; DOLINSKY; AZAD, 2018.

Dentre os adoçantes, a sacarina sódica é um dos mais consumidos mundialmente (Figura 4) e, embora a Agência de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (do inglês "Food and Drug Administration", FDA) a considere um composto seguro por ser excretada de maneira inalterada pelos rins (FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 2023; WHITEHOUSE; BOULLATA; MCCAULEY, 2008) recentemente a WHO emitiu um alerta não recomendando o uso de adoçantes artificiais por indivíduos saudáveis devido à sua ineficiência a longo prazo na redução dos riscos de doenças não transmissíveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023b). Além disso, durante a gestação recomenda-se restringir seu uso, pois a sacarina sódica pode atravessar a placenta e acumular-se nos tecidos fetais, além de estar presente no leite materno se consumida durante a lactação (BRUGNERA et al., 2012; WHITEHOUSE; BOULLATA; MCCAULEY, 2008).

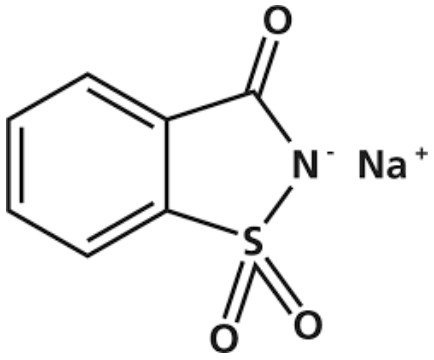


Figura 4 - Estrutura química da sacarina sódica.

Nesse contexto, a compreensão das origens fetais dos distúrbios reprodutivos masculinos evoluiu com a descoberta da janela de programação da masculinização (do inglês "Masculinization Programming Window", MPW), que nos ratos ocorre entre os dias 15 e 18 pós concepção (Figura 5). A MPW é o período em que as ações androgênicas programam o desenvolvimento, tamanho e função dos órgãos genitais masculinos na idade adulta (MACLEOD et al., 2010; WELSH et al., 2008). A ação androgênica não se restringe somente a este período, mas continua ao longo da vida reprodutiva dos machos (HERMAN et al., 2000; PRAHALADA et al., 1997; WELSH et al., 2008).

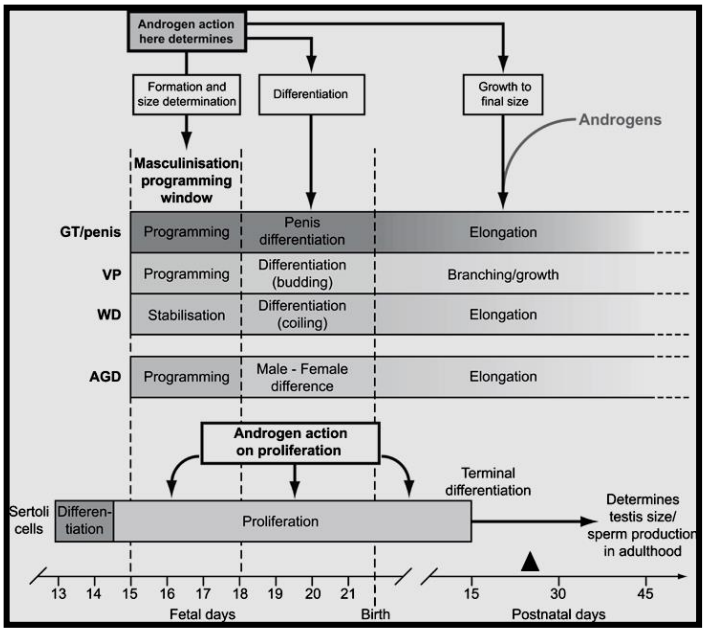


Figura 5 - Esquema sobre a atuação dos andrógenos (tempo-dependente) na determinação da diferenciação, formação e crescimento dos órgãos do sistema genital masculino. Em ratos, a MPW ocorre entre 15,5 e 18,5 dias pós-concepção. Note que, nos períodos da MPW e pós-natal, os andrógenos atuam no desenvolvimento dos órgãos. GT, tubérculo genital; VP, próstata ventral; WD, duto de Wolff; AGD, distância anogenital (WELSH et al., 2008).

O desenvolvimento testicular no rato segue uma sequência básica, que inclui: formação pré-natal de cordões espermáticos contendo gonócitos; transformação dos gonócitos em espermatogônias; proliferação das células de Sertoli e formação da barreira hemato-testicular (do inglês "Blood Testis-Barrier", BTB); desenvolvimento dos espermatócitos (meiose); e espermiogênese (formação de espermátides redondas e alongadas) (PICUT; ZIEJEWSKI; STANISLAUS, 2018).

Mediada pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada (HHG), no rato adulto, a regulação hormonal é crucial para a espermatogênese e o equilíbrio endócrino. O hipotálamo estimula a produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) através da sinalização de neurotransmissores, fatores de crescimento e hormônios esteroides. O GnRH, por sua vez, estimula a hipófise a produzir o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante

(FSH). O LH, juntamente com a prolactina (PRL), estimula as células de Leydig (LC) a produzirem andrógenos. Esses andrógenos atravessam os túbulos seminíferos e se ligam à proteína citosólica de ligação ao andrógeno nas células de Sertoli (SC), regulada positivamente através da ação do FSH. Isso concentra o andrógeno no citoplasma, permitindo sua ligação ao receptor de andrógeno (AR) nuclear e ativando as SCs para desempenharem suas funções na espermatogênese (OJEDA; SKINNER, 2006; PICUT et al., 2015; STOKER et al., 2000; WEINBAUER et al., 2010). Nos túbulos seminíferos, as SCs estendem-se da membrana basal até o lúmen tubular circundando e sustentando as células germinativas que passarão pelo processo de espermatogênese à medida que amadurecem, atravessando o epitélio antes de serem liberadas no lúmen do túbulo seminífero (COOKE; WALKER, 2022).

Para manter o equilíbrio endócrino adequado, os andrógenos produzidos pelas LCs atuam nos túbulos seminíferos e na circulação, exercendo feedback negativo sobre a produção de GnRH e LH no hipotálamo e na hipófise, respectivamente. A inibina, produzida pelas SCs, também inibe a produção de FSH pela hipófise (OJEDA; SKINNER, 2006; PICUT et al., 2015; STOKER et al., 2000; WEINBAUER et al., 2010).

As LCs são responsáveis pela produção de andrógenos, predominantemente na forma de testosterona (T) (COOKE; WALKER, 2022). Nos homens, a T é o andrógeno mais abundante produzido nos testículos e presente na circulação (BHASIN et al., 2018; FANELLI et al., 2018; FELDMAN et al., 2002; KELSEY et al., 2014; KULLE et al., 2010; NAAMNEH ELZENATY; DU TOIT; FLÜCK, 2022). Devido à produção localizada, os níveis de T testiculares são 25 a 125 vezes superiores aos encontrados na circulação sanguínea (AWONIYI et al., 1989; COMHAIRE; VERMEULEN, 1976; JAROW et al., 2001; MADDOCKS et al., 1993; SMITH; WALKER, 2014; TURNER et al., 1984). A T pode ainda ser convertida, pela ação da 5-α redutase, em diidrotestosterona (DHT), um andrógeno mais potente (FLÜCK; PANDEY, 2014; WILSON, 2001). A DHT possui afinidade de 5 a 10 vezes maior pelo AR do que a T (NAAMNEH ELZENATY; DU TOIT; FLÜCK, 2022; WILSON, 2001). Esses andrógenos são essenciais para manter a estrutura e a função testicular.

Estudos recentes utilizando camundongos transgênicos revelaram que os estrogênios também são críticos para o desenvolvimento e função normal dos órgãos reprodutivos masculinos (COOKE et al., 2017). O equilíbrio andrógeno/estrogênio é essencial para o desenvolvimento sexual normal, sendo ajustado nos testículos por fatores endócrinos e parácrinos e pela atividade da aromatase, que utiliza a T como substrato para sintetizar estradiol (CARREAU; WOLCZYNSKI; GALERAUD-DENIS, 2010; COOKE et al., 2017). Os efeitos

estrogênicos são desencadeados pela ativação do receptor de estrógeno (ER), presente nas SCs e nas LCs (COOKE et al., 1991b, 2017; HESS et al., 1997; IGUCHI T., 1991). Assim, essa interação complexa sobre o testículo garante um processo espermatogênico adequado. Por sua vez, esses ajustes podem ser afetados por vários fatores, entre eles o consumo de sacarina sódica na dieta.

Um estudo que avaliou o uso de sacarina sódica em camundongos machos demonstrou efeitos reprodutivos negativos. Foram encontradas alterações nos níveis de LH, que consequentemente refletiram na produção de T. Além disso, foi sugerido que altos níveis de sacarina sódica podem iniciar a cascata apoptótica via caspase-3 por meio da ligação deste aditivo alimentar aos receptores de sabor amargo (T2R). Os efeitos da sacarina sódica levaram a mudanças na qualidade do sêmen, incluindo menores contagem de espermatozoides, viabilidade e motilidade espermática, e aumento das anormalidades espermáticas (GONG et al., 2016).

Ainda, um estudo realizado em nosso laboratório, demonstrou que a exposição materna à sacarina sódica durante os períodos gestacional e lactacional afetou diretamente a espermatogênese da prole. Foram observadas reduções no número de SCs, na proliferação das espermatogônias, na expressão do AR e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), na concentração plasmática de estradiol e no diâmetro tubular. Também foram detectadas alterações nos volumes epitelial, intersticial e luminal dos túbulos seminíferos, além de menor contagem espermática (GODOI et al., 2023).

Adicionalmente, outros estudos indicam que esses adoçantes também impactam negativamente no metabolismo energético. Assim, o glucagon, a insulina, a leptina e a grelina, hormônios cuja regulação é dependente do metabolismo da glicose, afetam a fertilidade masculina. A insulina, por exemplo, desempenha papel crucial na função testicular e na espermatogênese, sendo essencial para a produção e maturação dos espermatozoides. Alterações nos níveis de insulina, como as observadas em casos de resistência à insulina e diabetes, podem comprometer a qualidade do sêmen e a fertilidade. A leptina, hormônio anorexígeno que regula o apetite e o gasto energético, também influencia a função reprodutiva, uma vez que níveis elevados de leptina podem afetar negativamente a produção de T. A grelina, hormônio orexígeno, conhecida como o "hormônio da fome", tem efeitos sobre o eixo HHG, modulando a liberação de hormônios que são essenciais para a reprodução. Disfunções no equilíbrio desses hormônios, frequentemente associadas a desordens metabólicas, podem

impactar a fertilidade masculina de maneira significativa (TENA-SEMPERE, 2007; WAGNER et al., 2020).

Assim, formulamos a hipótese de que a exposição à sacarina sódica durante os períodos gestacional e lactacional das mães (geração F0) afeta a saúde reprodutiva devido as desordens metabólicas, causando disfunção testicular ao longo das gerações (F1 e F2). Optamos pelo modelo experimental com ratos devido ao seu ciclo de vida curto, gestação rápida e semelhanças genéticas, fisiológicas e anatômicas com os humanos (COOPER et al., 2021; KEMPINAS; KLINEFELTER, 2015).

Conclusão

O consumo materno de sacarina sódica foi capaz de afetar a saúde reprodutiva dos machos por duas gerações. Na geração F1, a sacarina sódica programou alterações metabólicas que, por sua vez, influenciaram o eixo HHG. Já na geração F2, as mudanças programadas pela sacarina sódica no sistema energético comprometeram diretamente a saúde testicular dos animais. Entender esses mecanismos é fundamental para avaliar os riscos potenciais associados ao uso de adoçantes e para orientar políticas e recomendações sobre a ingestão desses compostos. Estudos futuros devem investigar mais profundamente os efeitos intergeracionais, a fim de oferecer uma avaliação mais abrangente dos riscos à saúde reprodutiva relacionados ao consumo de sacarina sódica.

Referências

AGARWAL, A. et al. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 13, n. 1, 12 dez. 2015.

AL-ATTAR, L. et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 6, p. 1335–1343, 15 set. 1997.

ALVES, M. G. et al. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. **Tissue barriers**, v. 1, n. 2, p. e23992, abr. 2013.

ARCHIBALD, A. J.; DOLINSKY, V. W.; AZAD, M. B. Early-Life Exposure to Non-Nutritive Sweeteners and the Developmental Origins of Childhood Obesity: Global Evidence from Human and Rodent Studies. **Nutrients**, v. 10, n. 2, 10 fev. 2018.

ÁVILA, M. A. P. et al. Effect of prenatal ethanol exposure on sexual motivation in adult rats. **Alcohol**, v. 54, p. 11–16, 1 ago. 2016.

AWONIYI, C. A. et al. Restoration of Advanced Spermatogenic Cells in the Experimentally Regressed Rat Testis: Quantitative Relationship to Testosterone Concentration within the Testis. **Endocrinology**, v. 124, n. 3, p. 1217–1223, 1 mar. 1989.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131–2157, 1 maio 2007.

BAKER-SMITH, C. M.; DE FERRANTI, S. D.; COCHRAN, W. J. The Use of Nonnutritive Sweeteners in Children. **Pediatrics**, v. 144, n. 5, 1 nov. 2019.

BALE, T. L. et al. Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 314–319, 15 ago. 2010.

BALE, T. L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. 2015.

BALLESTER, J. et al. Insulin-Dependent Diabetes Affects Testicular Function by FSH- and LH-Linked Mechanisms. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 5, p. 706–719, 10 set. 2004.

BARR, V. A. et al. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4463–4472, 1997.

BARREIRO, M. L.; TENA-SEMPERE, M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? **Molecular and cellular endocrinology**, v. 226, n. 1–2, p. 1–9, 29 out. 2004.

BELLISLE, F.; DREWNOWSKI, A. Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. **European Journal of Clinical Nutrition 2007 61:6**, v. 61, n. 6, p. 691–700, 7 fev. 2007.

BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 393–428, jun. 2002.

BHASIN, S. et al. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 5, p. 1715–1744, 1 maio 2018.

BOHACEK, J. et al. Transgenerational epigenetic effects on brain functions. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 4, p. 313–320, 15 fev. 2013.

BRUGNERA, V. F. et al. Utilização dos adoçantes durante a gestão e lactação. **Revista PINDORAMA**, v. 2, n. 02, p. 13–13, 2012.

BRUNING, J. C. et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5487, p. 2122–2125, 22 set. 2000.

CAMMISOTTO, P. G.; BUKOWIECKI, L. J. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 283, n. 1, 2002.

CARREAU, S.; WOLCZYNSKI, S.; GALERAUD-DENIS, I. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1571–1579, 27 maio 2010.

CELIK, O. et al. Peptides: Basic determinants of reproductive functions. **Peptides**, v. 72, p. 34–43, 1 out. 2015.

CERVANTES-RODRÍGUEZ, M. et al. Sugared water consumption by adult offspring of mothers fed a protein-restricted diet during pregnancy results in increased offspring adiposity: the second hit effect. **The British journal of nutrition**, v. 111, n. 4, p. 616–624, 28 fev. 2014.

CHANG, C. et al. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 18, p. 6876–6881, 4 maio 2004.

COMHAIRE, F. H.; VERMEULEN, A. TESTOSTERONE CONCENTRATION IN THE FLUIDS OF SEMINIFEROUS TUBULES, THE INTERSTITIUM AND THE RETE TESTIS OF THE RAT. **Journal of Endocrinology**, v. 70, n. 2, p. 229–235, 1 ago. 1976.

COOKE, P. S. et al. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 129, n. 1, p. 244–248, 1991a.

COOKE, P. S. et al. Estrogen Receptor Expression in Developing Epididymis, Efferent Ductules, and Other Male Reproductive Organs. **Endocrinology**, v. 128, n. 6, p. 2874–2879, 1 jun. 1991b.

COOKE, P. S. et al. Estrogens in Male Physiology. **Physiological reviews**, v. 97, n. 3, p. 995–1043, 1 jul. 2017.

COOKE, P. S.; WALKER, W. H. Nonclassical androgen and estrogen signaling is essential for normal spermatogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 121, p. 71–81, 1 jan. 2022.

COOPER, T. K. et al. Research-Relevant Conditions and Pathology of Laboratory Mice, Rats, Gerbils, Guinea Pigs, Hamsters, Naked Mole Rats, and Rabbits. **ILAR Journal**, v. 62, n. 1–2, p. 77–132, 31 dez. 2021.

CUMMINGS, D. E.; OVERDUIN, J. Gastrointestinal regulation of food intake. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 13, 1 jan. 2007.

CURLEY, J. P. et al. Social influences on neurobiology and behavior: epigenetic effects during development. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 352–371, abr. 2011.

DAHER, M. I.; MATTA, J. M.; ABDEL NOUR, A. M. Non-nutritive sweeteners and type 2 diabetes: Should we ring the bell? **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 155, p. 107786, 1 set. 2019.

DE GENDT, K. et al. Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 4117–4126, set. 2005.

DEFRONZO, R. A. et al. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers 2015 1:1**, v. 1, n. 1, p. 1–22, 23 jul. 2015.

DIETARY GUIDELINES ADVISORY COMMITTEE. Scientific report of the 2015 dietary guidelines advisory committee. **United States Department of Agriculture**, 2015.

EDDY, E. M. et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, v. 137, n. 11, p. 4796–4805, 1996.

EISENBERG, M. L. et al. Male infertility. **Nature reviews. Disease primers**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2023.

FANELLI, F. et al. Normative Basal Values of Hormones and Proteins of Gonadal and Adrenal Functions from Birth to Adulthood. **Sexual Development**, v. 12, n. 1–3, p. 50–94, 22 fev. 2018.

FEIJÓ, F. DE M. et al. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. **Appetite**, v. 60, n. 1, p. 203–207, 1 jan. 2013.

FELDMAN, H. A. et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **academic.oup.comHA Feldman, C Longcope, CA Derby, CB Johannes, AB Araujo, AD Coviello, WJ BremnerThe Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002•academic.oup.com**, 2002.

FERNANDEZ-TWINN, D. S.; CONSTÂNCIA, M.; OZANNE, S. E. Intergenerational epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 43, p. 85–95, 1 jul. 2015.

FILLER, R. Methods for Evaluation of Rat Epididymal Sperm Morphology. **Male Reproductive Toxicology**, p. 334–343, 1 jan. 1993.

FLÜCK, C. E.; PANDEY, A. V. Steroidogenesis of the testis – new genes and pathways. **Annales d'Endocrinologie**, v. 75, n. 2, p. 40–47, 1 maio 2014.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **Aspartame and Other Sweeteners in Food | FDA**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/aspartame-and-other-sweeteners-food>. Acesso em: 20 jul. 2024.

FRIEDRICH, C.; TÜTTELMANN, F. Genetics of female and male infertility. **Medizinische Genetik**, v. 36, n. 3, p. 161, 30 set. 2024.

GARDNER, C. et al. Nonnutritive Sweeteners: Current Use and Health Perspectives: A Scientific Statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 35, n. 8, p. 1798, ago. 2012.

GODOI, A. R. et al. Maternal exposure of rats to sodium saccharin during gestation and lactation on male offspring. **Biology of Reproduction**, v. 108, n. 1, p. 98–106, 14 jan. 2023.

GONG, T. et al. Effects of daily exposure to saccharin and sucrose on testicular biologic functions in mice. **Biology of Reproduction**, v. 95, n. 6, p. 1–13, 1 dez. 2016.

HAZRA, R. et al. Temporal Role of Sertoli Cell Androgen Receptor Expression in Spermatogenic Development. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 1, p. 12–24, 1 jan. 2013.

HERMAN, R. A. et al. Timing of prenatal androgen exposure: anatomical and endocrine effects on juvenile male and female rhesus monkeys. **Hormones and behavior**, v. 38, n. 1, p. 52–66, 2000.

HESS, R. A. et al. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2607–2613, 1993.

HESS, R. A. et al. Estrogen receptor (α and β) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 6, p. 602–611, nov. 1997.

HODES, G. E. Sex, stress, and epigenetics: Regulation of behavior in animal models of mood disorders. **Biology of Sex Differences**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 21 jan. 2013.

HOLDCRAFT, R. W.; BRAUN, R. E. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. **Development (Cambridge, England)**, v. 131, n. 2, p. 459–467, jan. 2004.

HUANG, Q. et al. Diet beverage intake during lactation and associations with infant outcomes in the infant feeding practices study II. **Nutrients**, v. 13, n. 9, 1 set. 2021.

IGUCHI T. Developmental pattern of estrogen receptor expression in male mouse genital organs. **Mol. Androl.**, v. 3, p. 109–120, 1991.

JAROW, J. P. et al. Assessment of the androgen environment within the human testis: Minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 640–645, 2001.

KELSEY, T. W. et al. A Validated Age-Related Normative Model for Male Total Testosterone Shows Increasing Variance but No Decline after Age 40 Years. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109346, 8 out. 2014.

KEMPINAS, W. D. G.; KLINEFELTER, G. R. Interpreting histopathology in the epididymis. **https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979114**, v. 4, n. 2, p. e979114, 4 mar. 2015.

KIESS, W. et al. A Role for Leptin in Sexual Maturation and Puberty? **Hormone Research**, v. 51, n. Suppl. 3, p. 55–63, 1 nov. 1999.

KIESS, W. et al. Male Obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 44, n. 4, p. 761–772, 1 dez. 2015.

KLIP, A. et al. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, n. 1, p. 43–53, jan. 1994.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature 1999 402:6762**, v. 402, n. 6762, p. 656–660, 9 dez. 1999.

KOLACZYNSKI, J. W. et al. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. **Diabetes**, v. 45, n. 5, p. 699–701, 1996.

KRAUSZ, C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 25, n. 2, p. 271–285, abr. 2011.

KRAUSZ, C.; RIERA-ESCAMILLA, A. Genetics of male infertility. **Nature Reviews Urology 2018 15:6**, v. 15, n. 6, p. 369–384, 5 abr. 2018.

KULLE, A. E. et al. A Novel Ultrapressure Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Androstenedione, Testosterone, and Dihydrotestosterone in Pediatric Blood Samples: Age- and Sex-Specific Reference Data. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 5, p. 2399–2409, 1 maio 2010.

KUMAR, T. R. Fshb Knockout Mouse Model, Two Decades Later and Into the Future. **Endocrinology**, v. 159, n. 5, p. 1941–1949, 1 maio 2018.

LAMBERT, A.-S.; BOUGNERES, P. Growth and descent of the testes in infants with hypogonadotropic hypogonadism receiving subcutaneous gonadotropin infusion. **International journal of pediatric endocrinology**, v. 2016, n. 1, dez. 2016.

LOHNER, S.; TOEWS, I.; MEERPOHL, J. J. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape. **Nutrition Journal**, v. 16, n. 1, 8 set. 2017.

LUBAHN, D. B. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 23, p. 11162–11166, 1 dez. 1993.

LUTSEY, P. L.; STEFFEN, L. M.; STEVENS, J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 754–761, fev. 2008.

MACLEOD, D. J. et al. Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. **International journal of andrology**, v. 33, n. 2, p. 279–287, 2010.

MADDOCKS, S. et al. Intratesticular hormone levels and the route of secretion of hormones from the testis of the rat, guinea pig, monkey and human. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 4, p. 272–278, 1993.

MAGALHÃES, J. Z. et al. Neurotoxicidade do nascimento à puberdade em roedores: revisão dos principais agentes tóxicos e suas implicações. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v. 20, n. 2, 1 dez. 2020.

MCCARTHY, M. M.; NUGENT, B. M. Epigenetic Contributions to Hormonally-Mediated Sexual Differentiation of the Brain. **Journal of neuroendocrinology**, v. 25, n. 11, p. 1133, 2013.

MIGRENNE, S. et al. Mouse testis development and function are differently regulated by follicle-stimulating hormone receptors signaling during fetal and prepubertal life. **PloS one**, v. 7, n. 12, 27 dez. 2012.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 5, p. 747–806, out. 2004.

MYLCHREEST, E. et al. Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats Exposed to Di(n-butyl) Phthalate during Late Gestation. **Toxicological Sciences**, v. 55, n. 1, p. 143–151, 1 maio 2000.

NAAMNEH ELZENATY, R.; DU TOIT, T.; FLÜCK, C. E. Basics of androgen synthesis and action. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 36, n. 4, p. 101665, 1 jul. 2022.

NERY, C. DA S. et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49–55, 2011.

OJEDA, S. R.; SKINNER, M. K. Puberty in the Rat. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, p. 2061–2126, 1 jan. 2006.

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical record**, v. 203, n. 4, p. 485–492, 1982.

ORTH, J. M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. **Endocrinology**, v. 115, n. 4, p. 1248–1255, 1984.

PICUT, C. A. et al. Postnatal Development of the Testis in the Rat:Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 326–342, 11 set. 2015.

PICUT, C. A.; ZIEJEWSKI, M. K.; STANISLAUS, D. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System. **Birth Defects Research**, v. 110, n. 3, p. 190–227, 15 fev. 2018.

PINTO, D. E. et al. Long-term intake of saccharin decreases post-absortive energy expenditure at rest and is associated to greater weight gain relative to sucrose in wistar rats. **Nutrition & metabolism**, v. 14, n. 1, 20 fev. 2017.

POLYÁK, É. et al. Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. **Acta physiologica Hungarica**, v. 97, n. 4, p. 401–407, 1 dez. 2010.

PRAHALADA, S. et al. **Effects of Finasteride, a Type 2 5-Alpha Reductase Inhibitor, on Fetal Development in the Rhesus Monkey (Macaca mulatta)Teratology**. [s.l.] Wiley-Liss, Inc, 1997.

RAHIMIPOUR, M. et al. Saccharin consumption increases sperm DNA fragmentation and apoptosis in mice. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 12, n. 5, p. 307, 13 ago. 2014.

RENWICK, A. G.; MOLINARY, S. V. Sweet-taste receptors, low-energy sweeteners, glucose absorption and insulin release. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 10, p. 1415–1420, 28 nov. 2010.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.

RUSSELL, L. D. et al. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **The American journal of anatomy**, v. 188, n. 1, p. 21–30, 1990.

SARIS, W. H. M. Sugars, energy metabolism, and body weight control. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 4, 2003.

SCHAGDARSURENGIN, U.; STEGER, K. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. **Nature Reviews Urology 2016 13:10**, v. 13, n. 10, p. 584–595, 31 ago. 2016.

SCHOELLER, E. L.; SCHON, S.; MOLEY, K. H. THE EFFECTS OF TYPE 1 DIABTES ON THE HYPOTHALAMIC, PITUITARY AND TESTES AXIS. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 839, set. 2012a.

SCHOELLER, E. L.; SCHON, S.; MOLEY, K. H. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 3, p. 839–847, set. 2012b.

SMEETS, P. A. M.; ERKNER, A.; DE GRAAF, C. Cephalic phase responses and appetite. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 11, p. 643–655, 1 nov. 2010.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 2–13, 1 jun. 2014.

SMITH, R. G.; JIANG, H.; SUN, Y. Developments in ghrelin biology and potential clinical relevance. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 16, n. 9, p. 436–442, nov. 2005.

STOKER, T. E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, n. 2, p. 197–252, 2000.

SWITHERS, S. E.; DAVIDSON, T. L. A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. **Behavioral neuroscience**, v. 122, n. 1, p. 161–173, fev. 2008.

SYLVETSKY, A. C. et al. Consumption of Low-Calorie Sweeteners among Children and Adults in the United States. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 117, n. 3, p. 441, 1 mar. 2017.

SYLVETSKY, A. C. et al. Trends in Low-Calorie Sweetener Consumption Among Pregnant Women in the United States. **Current Developments in Nutrition**, v. 3, n. 4, 11 mar. 2019.

TAI, M. M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes care**, v. 17, n. 2, p. 152–154, 1994.

TENA-SEMPERE, M. Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. **Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 15, n. 2, p. 83–88, abr. 2005.

TENA-SEMPERE, M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. **Neuroendocrinology**, v. 86, n. 3, p. 229–241, nov. 2007.

TENA-SEMPERE, M.; BARREIRO, M. L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, n. 1–2, p. 9–13, 25 fev. 2002.

TORLONI, M. R. et al. O uso de adoçantes na gravidez: uma análise dos produtos disponíveis no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 267–275, 2007.

TOURNAYE, H.; KRAUSZ, C.; OATES, R. D. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 544–553, 1 jul. 2017.

TURNER, T. T. et al. On the Androgen Microenvironment of Maturing Spermatozoa. **Endocrinology**, v. 115, n. 5, p. 1925–1932, 1 nov. 1984.

URRUTIA, M.; GRINSPON, R. P.; REY, R. A. Comparing the role of anti-Müllerian hormone as a marker of FSH action in male and female fertility. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 14, n. 3, p. 203–214, 4 maio 2019.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149–179, 1 jan. 2002.

WABITSCH, M. et al. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. **Diabetes**, v. 45, n. 10, p. 1435–1438, 1996.

WAGNER, I. V. et al. Adverse effects of metabolic disorders in childhood on adult reproductive function and fertility in the male. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 34, n. 1, p. 13–23, 1 jan. 2020.

WAGNER, I. V. et al. Diabetes Type 1 Negatively Influences Leydig Cell Function in Rats, Which is Partially Reversible By Insulin Treatment. **Endocrinology**, v. 162, n. 4, p. 1–17, 1 abr. 2021.

WEINBAUER, G. F. et al. Physiology of Testicular Function. **Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction**, p. 11–59, 2010.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479, 4 abr. 2008.

WHITEHOUSE, C. R.; BOULLATA, J.; MCCAULEY, L. A. The potential toxicity of artificial sweeteners. **AAOHN journal : official journal of the American Association of Occupational Health Nurses**, v. 56, n. 6, p. 251–259, jun. 2008.

WILK, K. et al. The Effect of Artificial Sweeteners Use on Sweet Taste Perception and Weight Loss Efficacy: A Review. **Nutrients**, v. 14, n. 6, 1 mar. 2022.

WILLEMS, A. et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. **PloS one**, v. 5, n. 11, 2010.

WILSON, J. D. The role of 5a-reduction in steroid hormone physiology. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, n. 8, p. 673–678, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Examination and processing of human semen. v. Edition, V, n. 10, p. 286, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guideline: sugars intake for adults and children. **World Health Organization**, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 12 jan. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infertility**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>. Acesso em: 20 jul. 2024a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO advises not to use non-sugar sweeteners for weight control in newly released guideline**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/15-05-2023-who-advises-not-to-use-non-sugar-sweeteners-for-weight-control-in-newly-released-guideline>. Acesso em: 20 jul. 2024b.

YANG, Q. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 83, n. 2, p. 101, jun. 2010.