



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Fernanda da Silveira Cavalcante

Administração de cafeína durante a gestação altera parâmetros testiculares na prole de camundongos C57/BL6 na vida adulta

Rio de Janeiro

2013

Fernanda da Silveira Cavalcante

**Administração de cafeína durante a gestação altera parâmetros testiculares
na prole de camundongos C57/BL6 na vida adulta**

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

Orientadora: Prof.^a Dra Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2013

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

C377 Cavalcante, Fernanda da Silveira.

Administração de cafeína durante a gestação altera parâmetros testiculares na prole de camundongos C57/BL6 na vida adulta / Fernanda da Silveira Cavalcante. – 2013.

77 f.

Orientadora: Cristiane da Fonte Ramos.

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

1. Cafeína - Teses. 2. Feto - Desenvolvimento - Teses. 3. Testículos - Teses. 4. Fecundidade - Teses. 5. Nutrição - Teses. I. Ramos, Cristiane da Fonte. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 663.93-053.32

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

Assinatura

Data

Fernanda da Silveira Cavalcante

**Administração de cafeína durante a gestação altera parâmetros testiculares
na prole de camundongos C57/BL6 na vida adulta**

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

Aprovada em 18 de dezembro de 2013.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Carla Braga Mano Gallo
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Bianca Martins Gregório
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Luiza Bastos
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

A minha família, alicerce permanente e fonte inesgotável de amor.

A minha filha Beatriz, razão de todas as coisas,
para que sirva como exemplo de comprometimento e superação.

E a amiga, companheira fiel de tantas jornadas, Rafaela Veiga
que considere como, também sua, esta realização.

AGRADECIMENTOS

Àqueles que acreditaram, contribuíram, e me reergueram.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda e à Prof.^a Dra. Márcia B. Águila Mandarin-de-Lacerda.

Às agências de fomento CNPq, Capes e FAPERJ. Á esta última especialmente por concessão do auxílio/bolsa (E-26/101.746/2011) na modalidade Bolsa Nota 10 e ao Coordenador do Curso de Pós-graduação, Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio, por indicação à bolsa.

Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças.

Charles Darwin

RESUMO

CAVALCANTE, Fernanda da Silveira. *Administração de cafeína durante a gestação altera parâmetros testiculares na prole de camundongos C57/BL6 na vida adulta*. 2013. 77f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Metabólitos ativos da cafeína apresentam toxicidade, podendo causar efeitos deletérios em muitos órgãos no período fetal pelo consumo materno. O estudo objetivou avaliar o papel da administração de cafeína durante a gestação em vários parâmetros importantes para a função testicular em camundongos adultos C57BL/6. Fêmeas grávidas foram divididas em: grupo controle (C), que receberam injeções de sol. salina (0,9% NaCl) e grupo cafeína (CF), que receberam diariamente injeções subcutâneas de 20 mg / kg de cafeína. Filhotes tiveram livre acesso à ração padrão desde o desmame até três meses de idade, quando foram mortos. O grupo CF apresentou uma redução no consumo alimentar ($C = 4,36 \pm 0,14$; $CF = 3,79 \pm 0,05/g$, $p < 0,05$) e ganho de massa corporal ($C = 25,73 \pm 0,14$; $CF = 21,08 \pm 0,41/g$, $p = 0,0001$). Ainda este grupo, apresentou alterações estruturais nos testículos da prole, como redução no peso relativo ($C = 0,078 \pm 0,003$; $CF = 0,063 \pm 0,002/g$, $p = 0,002$), diâmetro tubular ($C = 455,4 \pm 2,7$; $CF = 393,5 \pm 3,1/\mu m$, $p = 0,0001$), lume tubular ($C = 310,6 \pm 2,5$; $CF = 254,8 \pm 2,9/\mu m^2$, $p = 0,0001$) e altura do epitélio seminífero ($C = 144,8 \pm 0,9$; $CF = 138,7 \pm 1,3/\mu m$, $p = 0,0005$) observados pela técnica de morfometria. Testosterona sérica avaliada por quimioluminescência foi reduzida ($C = 6,6 \pm 2,8$; $CF = 0,5 \pm 0,2/ng/ml$, $p = 0,04$). Western Blotting foi utilizado para análise de expressão protéica. Houve aumento do receptor de leptina ($C = 0,81 \pm 0,04$; $CF = 1,28 \pm 0,15/\mu g$, $p = 0,01$), do receptor para o hormônio leteinizante ($C = 0,92 \pm 0,05$; $CF = 0,74 \pm 0,05/\mu g$, $p = 0,01$), da aromatase ($C = 0,32 \pm 0,03$; $CF = 0,48 \pm 0,05/\mu g$, $p = 0,03$) e do regulador pró apoptose ($C = 0,27 \pm 0,02$; $CF = 0,42 \pm 0,03/\mu g$, $p = 0,01$) enquanto o receptor para hormônio folículo estimulante (FSHR) ($C = 0,76 \pm 0,06$; $CF = 0,56 \pm 0,04/\mu g$, $p = 0,02$), o receptor para proteína reguladora da esteroidogênese ($C = 1,009 \pm 0,065$; $CF = 0,584 \pm 0,060/\mu g$, $p = 0,0007$), a proteína do fator de crescimento vascular endotelial ($C = 0,33 \pm 0,08$; $CF = 0,05 \pm 0,01/\mu g$, $p = 0,009$), o receptor de androgênio ($C = 0,97 \pm 0,11$; $CF = 0,59 \pm 0,07/\mu g$, $p = 0,02$) e o antígeno nuclear de proliferação celular ($C = 0,93 \pm 0,11$; $CF = 0,48 \pm 0,07/\mu g$, $p = 0,01$) foram reduzidos. Este estudo sugere que o consumo de cafeína durante a gravidez parece ser nocivo à fertilidade de animais machos, caracterizando o fenômeno de programação, o que gera alterações funcionais e estruturais nos testículos da prole adulta.

Palavras-chave: Cafeína. Programação fetal. Testículo. Nutrição. Camundongos. C57/BL6.

ABSTRACT

CAVALCANTE, Fernanda da Silveira. *The testis of the mice C57/BL6 offspring in adulthood have alterations due to maternal caffeine consumption*. 2013. 77 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Active metabolites of caffeine present toxicity, may cause deleterious effects on many organs in the fetal period by maternal consumption. This study aimed to evaluate the role of caffeine administration during pregnancy on several parameters of adult male testis in C57BL/6 mice. Pregnant C57BL/6 female mice were divided into two groups (n = 10): Control group (C), dams were injected with the vehicle only (saline 0.9 % NaCl); Caffeine group (CF), dams received daily a subcutaneous injection of 20 mg/kg of caffeine/day (1 mg/mL saline). Pups had free access to standard chow since weaning to 3 months of age, when they were killed. Treatment of dams with caffeine did not produce any visible signs of maternal toxicity. At adulthood CF group presented a reduction in the food consumption (C = 4.36 ± 0.14 , CF = 3.79 ± 0.05 /g, $p < 0.05$) and body weight gain (C = 25.73 ± 0.14 , CF = 21.08 ± 0.41 /g, $p = 0.0001$). Several alterations were seen in testis structure sighted by morphometry: testicular weight (C = 0.078 ± 0.003 , CF = 0.063 ± 0.002 /g, $p = 0.002$), tubular diameter (C = 455.4 ± 2.7 , CF = 393.5 ± 3.1 /μm, $p = 0.0001$), tubular lumen (C = 310.6 ± 2.5 , CF = 254.8 ± 2.9 /μm², $p = 0.0001$) and epithelial height (C = 144.8 ± 0.9 ; CF = 138.7 ± 1.3 /μm, $p = 0.0005$). Chemiluminescence was performed to evaluate testosterone serum levels, which was decreased (C = 6.6 ± 2.8 , CF = 0.5 ± 0.2 /ng/ml, $p = 0.04$). Western blotting showed an increase in the protein expression of leptin's receptor (C = 0.81 ± 0.04 , CF = 1.28 ± 0.15 /μg, $p = 0.02$), luteinizing hormone receptor (C = 0.92 ± 0.05 , CF = 0.74 ± 0.05 /μg, $p = 0.01$), aromatase (C = 0.32 ± 0.03 , CF = 0.48 ± 0.05 /μg, $p = 0.03$) and apoptose proteins (C = 0.27 ± 0.02 ; CF = 0.42 ± 0.03 /μg, $p = 0.002$), while follicle stimulant hormone receptor (C = 0.76 ± 0.06 , CF = 0.56 ± 0.04 /μg, $p = 0.02$), steroidogenesis protein receptor (C = 1.009 ± 0.065 , CF = 0.584 ± 0.060 /μg, $p = 0.0007$), vascular-endothelial growth factor (C = 0.33 ± 0.08 , CF = 0.05 ± 0.01 /μg, $p = 0.009$), androgen receptor (C = 0.97 ± 0.11 , CF = 0.59 ± 0.07 /μg, $p = 0.02$) and proliferating cell nuclear antigen (C = 0.93 ± 0.11 ; CF = 0.48 ± 0.07 /μg, $p = 0.01$) were reduced by maternal caffeine treatment. This study suggests that caffeine consumption during pregnancy appears to be detrimental to fertility in male offspring, by testicular programming, which generates disturbances in testicular function.

Keywords: Caffeine. Fetal programming. Testis. Nutrition. Mice. C57/BL6.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ativação do receptor de adenosina.....	16
Tabela 1 -	Descrição de anticorpos utilizados no estudo.....	31
Figura 2 –	Fotomicrografia de túbulos seminíferos.....	33
Tabela 2 -	Dados referentes à resposta materna ao uso crônico de cafeína durante a gestação.....	36
Figura 3 –	Gráfico de ingestão alimentar dos animais.....	37
Figura 4 –	Evolução de massa corporal dos animais.....	38
Figura 5 –	Massa testicular em gramas.....	39
Figura 6 –	Massa testicular relativa.....	40
Figura 7 –	Diâmetro tubular médio.....	41
Figura 8 –	Altura do epitélio seminífero.....	42
Figura 9 –	Área do lume seminífero.....	43
Figura 10 –	Fotomicrografia de túbulos seminíferos.....	43
Figura 11 –	Expressão protéica de aromatase.....	44
Figura 12 –	Expressão protéica de AR.....	45
Figura 13 –	Expressão protéica de VEGF.....	46
Figura 14 –	Expressão protéica de ER α	47
Figura 15 –	Expressão protéica de ER β	48
Figura 16 –	Expressão protéica de leptina.....	49
Figura 17 –	Expressão protéica de ObR.....	50
Figura 18 –	Expressão protéica de StAR.....	51
Figura 19 –	Expressão protéica de FSHR.....	52
Figura 20 –	Expressão protéica de LHR.....	53
Figura 21 –	Expressão protéica PCNA.....	54
Figura 22 –	Expressão protéica BAX.....	55
Figura 23 –	Imunomarcção de células em proliferação e apoptose.....	56
Figura 24 –	Níveis séricos de estradiol.....	57
Figura 25 –	Níveis séricos de leptina.....	58
Figura 26 –	Níveis séricos de testosterona.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1R	Receptor de adenosina do tipo 1
A2aR	Receptor de adenosina do tipo 2 ^a
A2bR	Receptor de adenosina do tipo 2b
A3R	Receptor de adenosina do tipo 3
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AR	Receptor de androgênio
AT1R	Receptor de angiotensina do tipo 1
AT2R	Receptor de angiotensina do tipo 2
BAX	Reguladores pró-apoptóticos
BCI-2	Reguladores anti-apoptóticos
BSA	Albumina de soro bovino
Ca ²⁺	Íon cálcio
DAB	Di-amino-benzidina
ELISA	Ensaio de imuno-absorção enzimática
ER α	Receptor de estrogênio do tipo alfa
ER β	Receptor de estrogênio do tipo beta
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante
Lv	Densidade volumétrica
Lv total	Densidade de comprimento total
OBr	Receptores de leptina
OBRb	Isoforma b do receptor de leptina
PBS	Tampão fosfato salino
PCNA	Antígeno de proliferação nuclear celular
Qa	Densidade por área
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
StAR	Proteína reguladora da esteroidogênese ativa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
μg	Micrograma
mg	Miligrama
g	Gramma
Kg	Quilograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
pg	Picograma
%	Porcentagem
\pm	Mais ou menos
β	Beta
α	Alfa
<	menor
>	maior
=	igual

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	CAFEÍNA E PROGRAMAÇÃO FETAL	15
1.1	Testículo e Cafeína	21
2	JUSTIFICATIVA	23
3	HIPÓTESE	24
4	OBJETIVO	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	Obtenção da prole	27
5.2	Biometria da prole	27
5.3	Morte dos animais	28
5.4	Western blotting	28
5.5	Imuno-histoquímica	29
5.6	Morfologia quantitativa dos testículos	32
5.7	Quimioluminescência	33
5.8	Análise estatística	34
6	RESULTADOS	35
7	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A - Comitê de ética em pesquisa	75
	ANEXO B - Artigo aceito para publicação	76
	ANEXO C - Outras publicações no período	77

INTRODUÇÃO

A história da cafeína está associada com o café, embora café não seja sua única fonte de ingestão. O nome “cafeína” deriva da palavra "gahwa" em árabe, que significa "extirpar o cansaço". Os efeitos estimulantes do café no sistema nervoso central passaram a ser observados no século XVII, o que favoreceu o aumento do consumo, mesmo na ausência do conhecimento de seus efeitos adversos (Fredholm, 2011).

1 CAFEÍNA E A PROGRAMAÇÃO FETAL

A cafeína é um alcalóide do grupo das xantinas, presente de forma natural em uma diversidade de alimentos, e em sua forma sintética vem sendo utilizado em compostos analgésicos, estimulantes do apetite e drogas antivirais que são, de forma geral, consumidos com pouca restrição (Gilbert, 1976; Bernstein et al., 2002; Sawynok, 2011). Sendo uma xantina trimetilada, a cafeína é capaz de estimular o sistema nervoso central, produzindo um alerta de curta duração, motivo este que leva a cafeína a alcançar o título de psicoativo mais consumido do mundo, destacando-se dentre as demais Metilxantinas (Bjorklund et al., 2008; Heckman et al., 2010).

A ação farmacológica da cafeína ocorre por meio de antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina; inibição de fosfodiesterases; ativação de receptores de rianodina, um canal liberador de Ca^{2+} intracelular; antagonismo de receptores do ácido gama amino butírico (GABA) (Fredholm et al., 1999; Solinas et al., 2002). Por outro lado, além de agir como estimulante no sistema nervoso central (Fredholm et al., 1999), há evidências de que a cafeína pode apresentar efeitos neurotóxicos por si só (He et al., 2003). Os efeitos da cafeína têm sido estudados utilizando-se diferentes espécies de animais e tecidos, onde o uso crônico desta substância pode ou não induzir alterações na funcionalidade dos receptores de adenosina do tipo A1 e A2 (Fredholm et al., 1999; Leon et al., 2002).

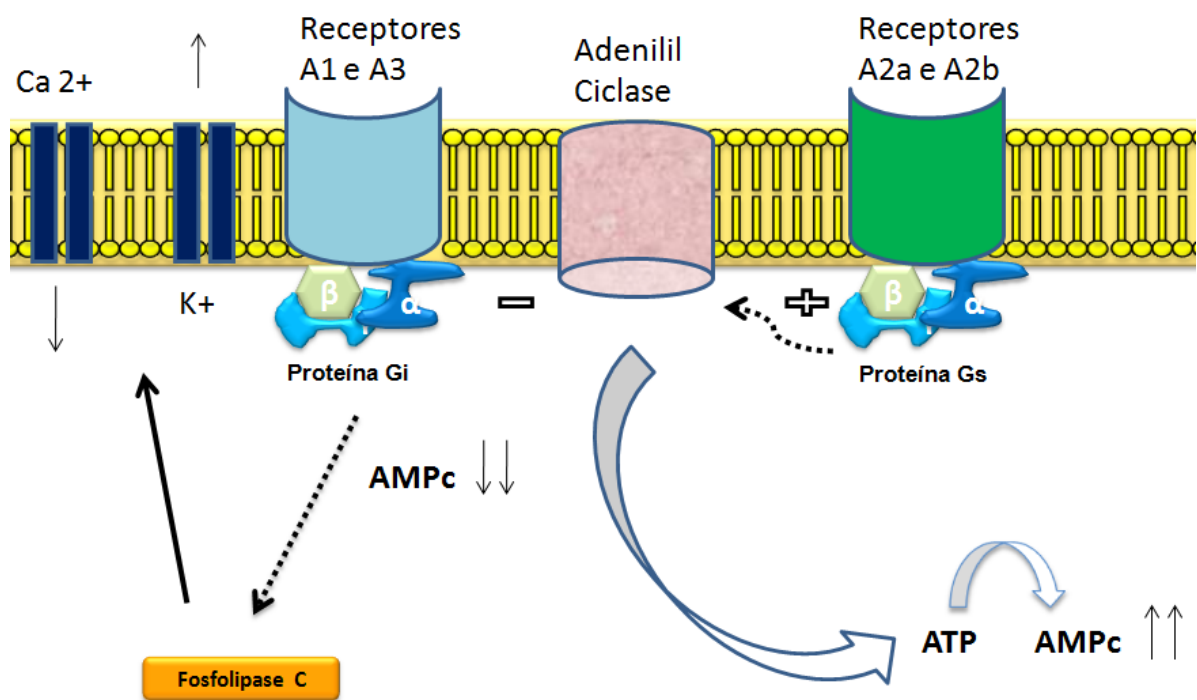
A cafeína tem um efeito vasoconstrictor periférico através da inibição de receptores vasculares de adenosina A2a, entretanto seu uso crônico leva ao aumento dos receptores de adenosina e/ou sensibilidade causando o “fenômeno da tolerância”, considerado como sendo a atenuação ou desaparecimento dos sintomas quanto ao uso crônico de cafeína (Bruns RF, 1987). Em baixas doses, seus efeitos são conhecidos como aumento da vigiância subjetiva e desempenho da atenção em tarefas, já em altas doses ocorre um aumento da ansiedade, insônia, taquicardia e agitação psicomotora (Kennedy e Wightman, 2011).

A cafeína atua como competidora antagonista pelos receptores de adenosina (Osswald e Schnermann, 2011). A adenosina é um importante componente do sistema purinérgico e é encontrada em todos os tecidos, apresentando um papel modulatório de diversos processos fisiológicos. Suas principais ações são: regulação das funções cardiovasculares como vasodilatação e diminuição da pressão sanguínea e modulação do sistema nervoso central através da regulação da liberação de neurotransmissores (Sato et al., 2005). Além disso, é

capaz de produzir inibição da lipólise, broncoconstrição e cito proteção em episódios de isquemia e hipóxia ou de stress oxidativo (Wardas, 2002; Fan *et al.*, 2003).

Os receptores de adenosina (a saber: A1R, A2aR, A2bR e A3R), compõem uma das maiores classes de receptores purinérgicos sendo estes ligados a uma proteína G estimulatória ou inibitória, onde os receptores A1 e A3 são inibidores da adenilil ciclase. A interação da adenosina com estes receptores leva a redução no acúmulo de AMPc, ativando a fosfolipase C e resultando na abertura de canais iônicos, e A2a e A2b são estimuladores da adenilil ciclase. Uma vez que adenilil ciclase é estimulada (pela interação da adenosina aos seus receptores A2) ocorre o aumento do AMPc desencadeando uma série de eventos intracelulares (Brown *et al.*, 2006; Rivkees e Wendler, 2011), como ilustra a Fig. 1.

Figura 1 - Ativação dos receptores de adenosina



Legenda: Os receptores de Adenosina A1R e A3R são acoplados a uma proteína G inibitória (Gi), sendo negativamente associados à adenilil ciclase, inibindo assim o acúmulo de AMPc ativando a Fosfolipase C e abrindo canais iônicos. Já os receptores de Adenosina A2a e A2b são acoplados a uma proteína G estimulatória (Gs), que uma vez estimulados, ativam adenilil ciclase levando ao aumento da síntese de AMPc que ativa a Proteinase K

Fonte: Modificado de (Katsuragi *et al.*, 2008).

Trabalhos mostram que uma das funções da adenosina é o controle da secreção de renina e conseqüentemente a regulação do sistema renina-angiotensina (Campbell, 1987). Esse sistema está presente também em tecidos extra renais como o testículo, o qual apresenta receptores de angiotensina do tipo AT1 e AT2 nas células peritubulares do testículo. Ainda, a angiotensina II parece ser capaz de induzir a contração e proliferação destas células (Hellmann et al., 1988; Rossi et al., 2002) podendo, de certa forma, estar envolvida em algumas desordens testiculares como a varicocele, hipoespermatogênese e criptorquidia (Francavilla et al., 1979; Guarch et al., 1992; Santamaria et al., 1992).

Estudos demonstram que a ingestão crônica de cafeína pode causar dependência física e tolerância aos seus efeitos centrais (Nehlig et al., 1992; Bernstein et al., 2002). Tendo em vista a alta frequência do consumo de cafeína pela população num contexto mundial, a comunidade científica alertou-se sobre os efeitos fisiológicos deste composto, por base em experimentos que relacionavam a sua ingestão aos níveis pressóricos ou ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares (Birkett e Logan, 1988; Hartley et al., 2001; Winkelmayr et al., 2005). Contudo, o alto consumo de cafeína é relatado para todas as faixas etárias, o que inclui mulheres gestantes (Greenwood et al., 2010). Pelo fato da cafeína ser de natureza hidrofóbica e ser prontamente absorvida por membranas biológicas, o consumo durante a gestação implica na passagem da cafeína e seus metabólitos através da placenta, alcançando o feto (Kirkinen et al., 1983) que, assim, apresenta concentrações ligeiramente menores que os níveis maternos (Cnattingius et al., 2003).

O pico de concentração de cafeína durante a gestação ocorre em torno de 30-60 min após a administração (Porter e Rivkees, 2001). A meia vida da cafeína em mamíferos adultos é em torno de três a seis horas, aumentando para de 10 a 20 horas durante a gestação (Signorello et al., 2001). No feto, a meia vida da cafeína dura em torno de 80-100 horas; sendo o feto incapaz de desmetilar a cafeína (Fredholm, 1995). Logo, uma modesta ingestão de cafeína pela mãe pode ser muito significativa para o embrião/feto (Wendler et al., 2009), o que caracteriza tipicamente a programação fetal (Barker, 1990).

A programação fetal (também chamada de programação metabólica ou imprinting metabólico) é descrita como uma modificação de caráter permanente no metabolismo, estrutura e fisiologia de um órgão devido a algum insulto ocasionado no período de desenvolvimento embrionário (Lucas e Morley, 1994).

A programação fetal foi inicialmente descrita a partir da restrição de nutrientes durante o período da segunda guerra mundial em populações europeias (Stein e Susser, 1975a, b). Tal fenômeno pode ser definido como insultos sofridos pela mãe durante períodos críticos de

desenvolvimento que irão alterar a trajetória de desenvolvimento de determinados órgãos, causando adaptações na morfologia, fisiologia e metabolismo do feto a fim de assegurar a sobrevivência fetal frente às condições intrauterinas adversas (Barker, 1990).

A hipótese da programação fetal foi postulada por David Barker (Barker, 1990) que observou a influência de fatores ambientais, particularmente a nutrição, no início do desenvolvimento, de forma a programar o feto aumentando o risco de doenças cardiovasculares e metabólicas na idade adulta. Um dos estudos pioneiros realizado na Inglaterra destacou que as mortes por doença isquêmica do coração eram em maior número em regiões pobres que apresentavam um maior índice de recém-natos com baixo índice de massa corporal ao nascimento, sugerindo que a má nutrição no início da vida aumentaria a suscetibilidade à morte prematura assim como morte por doença arterial coronariana (Barker e Osmond, 1986).

O mecanismo pelo qual a exposição a um ambiente intrauterino sub-ótimo leva a alterações permanentes no feto, pode ser explicado como uma resposta adaptativa do embrião que gera efeitos duradouros por toda a vida. O ponto crucial desta teoria é o conceito de um período crítico no qual perturbações nutricionais específicas podem operar de maneira a promover mudanças no desenvolvimento, levando à consequências de longo prazo (Lucas, 1991; McMillen e Robinson, 2005). De modo geral, o feto preserva o fluxo sanguíneo (oxigênio e suprimento de nutriente) para o desenvolvimento do cérebro e submete os demais órgãos a uma relativa redução do suprimento sanguíneo e nutricional (redistribuição do fluxo sanguíneo), resultando em retardo no crescimento (Momoi et al., 2008).

Os ambientes adversos são muitos, entre eles a insuficiência placentária, restrição energética materna e anemia materna. Diante disto, o feto acaba sofrendo adaptações em seu ambiente intrauterino, levando a alterações na produção de hormônios e a sensibilidade dos tecidos aos hormônios, redistribuição do fluxo sanguíneo e alterações do crescimento e desenvolvimento de órgãos e tecidos, o que culminará em baixo peso ao nascimento. Isso, somado ao estilo de vida e ao envelhecimento resulta no surgimento de doenças crônicas na vida adulta (Martin-Gronert e Ozanne, 2010). Todas estas observações sugerem que o consumo de cafeína durante a gestação atende ao conceito de programação fetal.

O consumo de cafeína durante a gestação é estudado há muitos anos, entretanto as evidências para a associação do uso de cafeína e o acometimento das proles permanecem controversas (Serapiao-Moraes et al., 2013). A cafeína é uma droga muito consumida mundialmente, logo, de interesse para a saúde pública. O café é responsável pela maior

porcentagem de cafeína total consumida (75%), seguido pelo chá (15%) e bebidas cafeinadas (10%) (Eskenazi, 1999; Eskenazi et al., 1999).

Durante o primeiro mês de gestação, o consumo de cafeína é relatado por 60% das mulheres grávidas, sendo que 16% destas consomem 150 mg de cafeína ou mais por dia (Browne, 2006). Embora a cafeína não tenha demonstrado efeitos teratogênicos em seres humanos, o consumo durante a gestação é associado com um risco aumentado de abortos espontâneos e índice da massa corporal baixo ao nascer (Cnattingius et al., 2003; Rivkees e Wendler, 2011). Em modelo murino, a exposição a uma única dose de cafeína durante a embriogênese resulta em aumento da gordura corporal e alteração na função cardíaca do filhote quando adulto, indicando que a exposição à cafeína durante o desenvolvimento pode ter efeitos adversos de longa duração (Wendler et al., 2009). Efeitos cardíacos e renais também foram relatados na prole adulta após o uso prolongado de cafeína durante a gestação (Serapiao-Moraes et al., 2013).

A cafeína atravessa facilmente a placenta e o líquido amniótico, fazendo com que acreditemos que a concentração sérica materna de cafeína seja um indicador confiável da concentração sérica do feto (Goldstein e Warren, 1962; Kirkinen et al., 1983). A placenta humana não pode metabolizar a cafeína porque contém apenas o CYP1A1 (citocromo P450 1A1) e não o CYP1A2 (citocromo P450 1A2) (Kalow e Tang, 1991). O feto também não possui enzimas hepáticas necessárias para metabolizar a cafeína, enzimas que só estão presentes no oitavo mês de idade (Santos et al., 1998). Desta forma, o uso contínuo e excessivo de cafeína pela mãe pode levar a alterações no feto devido a superexposição à cafeína e seus metabólitos.

Os mecanismos exatos pelos quais a cafeína pode prejudicar o desenvolvimento fetal permanecem desconhecidos. Entretanto, duas vias de ação podem ser sugeridas:

- a) a cafeína pode atuar diretamente no feto inibindo a fosfodiesterase, enzima responsável pela degradação do AMP cíclico (Liu *et al.*, 1995). Um aumento do AMP cíclico pode interferir com a divisão celular, ou causar vasoconstrição uterina mediada por catecolamina (Soyka, 1979);
- b) ação indireta da cafeína no feto, atuando através da mãe. Kirkinen et al. (Kirkinen *et al.*, 1983) documentou uma diminuição do fluxo sanguíneo intervilososo da placenta após a ingestão de apenas 200mg de cafeína pelas mães. Se o fluxo sanguíneo uterino é inadequado, a extração de oxigênio e nutrientes pelo feto aumenta até um ponto crítico durante a gestação e, portanto, reduções no fluxo sanguíneo e podem profundamente afetar a oxigenação fetal e nutrição (Ghidini, 1996).

A literatura sugere que a deficiência do fluxo sanguíneo útero-placentário, o fluxo sanguíneo feto-placentária, ou o fluxo de sangue das vilosidades pode levar a retardo do crescimento intrauterino (Liu et al., 1995; Ghidini, 1996). A exposição a cafeína durante o terceiro trimestre pode ter um efeito semelhante sobre o crescimento fetal (Grosso e Bracken, 2005). Alguns estudos indicaram que a cafeína aumenta a resistência vascular útero-placentária, possivelmente tanto através de antagonismo direto de receptores de adenosina vasculares quanto aumentando a liberação de catecolaminas (Kirkinen et al., 1983; Miller et al., 1994).

O elevado consumo de cafeína durante a gestação resulta em baixo peso ao nascimento, entretanto o mecanismo envolvido ainda permanece controverso (Momi et al., 2008). Estudos realizados com roedores mostram que o consumo de cafeína durante a gestação e/ou lactação resulta em baixos níveis de cobre no plasma, no leite e no tecido cardíaco dos filhotes (os baixos níveis deste micronutriente resultam em cardiomiopatia). O cobre é um micronutriente essencial para diversas funções orgânicas, como a mobilização do ferro para a síntese de hemoglobina. Durante a gestação há maior necessidade de síntese de hemoglobina para atender ao crescimento do feto (Wink et al., 1999; Asadifar et al., 2005).

O consumo de uma única dose de cafeína durante a gestação foi associado a hipóxia da placenta, pois provocou uma vasoconstrição da artéria placentária resultando assim em um retardo do crescimento intrauterino. Os filhotes adultos destas proles apresentaram sobrepeso e cardiomiopatia hipertrófica (Wendler et al., 2009). A cafeína ainda seria responsável por desestabilizar o HIF1 α (fator hipóxia-induzido 1 alfa), já que essa proteína é estabilizada pela ação da adenosina em seus receptores (Semenza, 2007; Wendler et al., 2009). A expressão de HIF1 α é constante e encontra-se aumentada em situações de hipóxia (Heyman et al., 2011).

1.1 Testículo e Cafeína

O testículo é um órgão par que se desenvolve dentro da cavidade abdominal e desce para a bolsa escrotal logo após o nascimento, onde a temperatura é mantida alguns graus abaixo da temperatura corpórea. Cada testículo apresenta dois polos (superior e inferior), duas margens (lateral e medial) e duas faces, uma anterior e uma posterior, coberta pelo epidídimo (Walsh, P et al., 2002).

O órgão é composto de numerosos túbulos seminíferos cujas paredes são formadas de células de Sertoli e germinativas enquanto o espaço intersticial é formado por células de Leydig, fibroblastos, dentre outras. Revestindo cada testículo, há uma cápsula de tecido conjuntivo - a túnica albugínea. Externamente à albugínea, nas regiões laterais e anteriores, se localiza a túnica vaginal. A túnica albugínea projeta-se para o interior formando o mediastino do testículo e dele partem septos fibrosos, dividindo o órgão em 200 a 300 lóbulos piramidais. Cada lóbulo do testículo possui tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células intersticiais e de 1 a 4 túbulos seminíferos (Junqueira e Carneiro, 2004).

Sob controle do eixo hipotálamo-hipófise o testículo desempenha basicamente 2 funções: produção de espermatozoides, pelos túbulos seminíferos e síntese de esteroides pelas células de Leydig (Sharpe, RM., 1983).

A união dos túbulos seminíferos proporciona a formação de uma rede espessa que origina os ductos eferentes, os quais atravessam a túnica albugínea para originarem os epidídimos. Os ductos eferentes transportam os espermatozoides dos testículos até os epidídimos, onde ganharão motilidade e ficarão armazenados até que sejam liberados no ato sexual (Walsh, P et al., 2002).

A presença dos receptores de adenosina no testículo de ratos já foi demonstrada, sendo A1R, localizado nas células de Sertoli e A3R nas células germinativas (Rivkees, 1994). O testículo fetal não possui a capacidade de metabolizar cafeína (Dews et al., 1984; Pollard et al., 2001). Mesmo no adulto, que já possui a capacidade de metabolizar a cafeína, o uso de cafeína também causa efeitos adversos (Morrissey et al., 1988). A exposição à cafeína foi relacionada ao atraso significativo na diferenciação do túbulo seminífero, redução na atividade da 3-β-hidroxyesteriode dehidrogenase, nas células de Leydig e consequente redução na síntese de testosterona (Pollard et al., 1990).

Frente à quantidade de trabalhos publicados e às semelhanças estruturais entre testículos de homens e roedores (Johnson L, Petty CS, Neaves WB, 1980; Walsh, P et al.,

2002), admite-se ser este um bom modelo experimental para estudar alterações passíveis de comprometimento da função reprodutiva masculina tornando-o modelo consagrado em pesquisa.

A redução observada na capacidade reprodutiva masculina nos últimos 50 anos tem sido objeto de bastante preocupação e estudo (Barone e Roberts, 1996; Heck e de Mejia, 2007; Greenwood et al., 2010). Tem sido mostrado que diversos fatores afetam negativamente a reprodução como estilo de vida, ocupação profissional, dieta e etc. Estudos epidemiológicos mostram que a cafeína pode ser um fator de risco tanto para o desenvolvimento fetal, quanto para infertilidade (Srisuphan e Bracken, 1986; Martin e Bracken, 1987; Wilcox et al., 1988; Fenster et al., 1991). Cafeína parece promover efeitos deletérios nos testículos. Atrofia testicular e redução na espermatogênese foi descrita em ratos após consumo prolongado de cafeína (Friedman et al., 1979). A ingestão prolongada de cafeína em coelhos parece aumentar as concentrações séricas de FSH e reduzir LH (Ezzat e el-Gohary, 1994).

Um risco aumentado de alteração na qualidade do sêmen em função do consumo de café também foi relatado em humanos (Parazzini et al., 1993). No entanto, outros autores mostraram que o tamanho nuclear do espermatozóide, sua forma e cromatina não se alteravam após consumo de cafeína (Vine et al., 1997). Entretanto, a inibição da diferenciação das células de Leydig e redução de seu número foram relatadas em ratos adultos cujas mães consumiram cafeína durante a gestação (Pollard et al., 1990), corroborando os estudos que indicam que a exposição à cafeína durante o período de organogênese pode impactar o desenvolvimento gonadal e a função da gônada no animal adulto (Ramlau-Hansen et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

É relevante estudar alterações testiculares que possam estar vinculadas a hábitos alimentares. A cafeína é muito consumida na população, inclusive em mulheres na idade fértil. Conhecer mais informações sobre as possíveis ações do consumo de cafeína pelas mães e as repercussões nos filhos é essencial para medidas preventivas de alterações futuras na prole.

3 HIPÓTESE

A ingestão materna de cafeína tem efeitos no desenvolvimento da prole ocasionando alterações nos testículos da prole de camundongos na vida adulta.

4 OBJETIVO

Avaliar alterações na ingestão alimentar, massa corporal e nos testículos de camundongos adultos da linhagem C57/BL6, bem como, os níveis séricos dos hormônios leptina, testosterona e estradiol, a morfologia testicular e a expressão de proteínas relacionadas à função testicular. Analisando, ainda, os efeitos da administração crônica de cafeína durante a gestação na ingestão alimentar, massa corporal e tamanho da ninhada das respectivas progenitoras.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados 10 camundongos machos e 20 camundongos fêmeas C57BL/6 nulíparas com 12 semanas de idade que foram selecionadas e mantidas em caixas de polietileno em ambiente com temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$) controladas, submetidos a um ciclo claro/escuro (luzes artificiais, 7h – 19h), e a um ciclo de exaustão de ar (15 min/h). Os protocolos de manuseio e experimentação foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/029/2012), anexo A. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os preceitos do “Guia para o uso de cuidado de animais de laboratório” (Publicação do NIH nº 85-23, revisada em 1996, USA).

As fêmeas foram acasaladas com machos inbreeding (razão de 2:1 - fêmeas/macho) e, no dia em que foi identificado o plug vaginal positivo, este foi considerado o primeiro dia da gestação. Fêmeas grávidas foram transferidas para caixas individuais e alocadas aleatoriamente em dois grupos experimentais denominados Controle (grupo controle) e cafeína (grupo cafeína), com $n= 10$ animais por grupo. Ambos receberam as injeções subcutâneas na região abdominal diariamente, a partir do primeiro até o último dia de gestação; sendo no grupo Controle injeção apenas do veículo (solução salina 0,9% NaCl), e no grupo cafeína injeção contendo 20mg/kg de cafeína (Sigma caffeine ReagentPlus®; 1mg/ml em solução salina). Esta dose corresponde a duas xícaras de café em humanos (Fredholm, 1995).

A massa corporal das fêmeas foi aferida diariamente em balança digital de precisão 0,01g (Marte A-1500) para o ajuste da dose e, do mesmo modo, a diluição da droga foi preparada diariamente para garantir a padronização da administração.

5.1 Obtenção da prole

Ao 21º dia de gestação as progenitoras deram origem à prole por parto espontâneo. O tamanho da ninhada foi anotado no dia do nascimento e o massa corporal dos filhotes aferido por balança digital de precisão 0,0001g (Sartorius BL2105, Gottingen, Alemanha), para padronizar o suprimento de alimento, as ninhadas foram ajustadas em seis animais por mãe, razão de 1:1 entre os gêneros, quando possível (Fischbeck e Rasmussen, 1987). As proles seguiram a mesma classificação de grupo de suas mães (controle e cafeína), sendo esta divisão mantida até o desmame, quando somente um filhote macho por ninhada foi separado aleatoriamente para dar prosseguimento ao estudo.

Os animais foram mantidos no biotério sendo avaliados diariamente quanto às condições de saúde. Durante todo o experimento os animais, tanto progenitoras quanto prole, receberam dieta padrão (19% proteínas, 64% hidratos de carbono, 17% de lipídios) seguindo recomendações da AIN-93G (Reeves et al., 1993) (www.pragsoolucoes.com.br) e água ad libitum.

5.2 Biometria da prole

A massa corporal foi aferida semanalmente em balança digital de precisão 0,01g (Marte A-1500). Após o desmame a ingestão alimentar foi acompanhada diariamente e seus valores anotados.

5.3 Morte dos animais

Os animais foram acompanhados até a 13^a semana de vida quando então foram submetidos à anestesia com Thiopental (15 mg/kg, intraperitoneal) para excisão dos órgãos de interesse. Tendo os animais sob anestesia e em decúbito dorsal, foi realizada a tricotomia na região abdomino-pélvica com posterior incisão da pele, tecido subcutâneo e parede abdominal em plano sagital mediano, sendo os cortes em sua base direcionados lateralmente. Alcançando a cavidade abdominal os testículos de ambos os lados foram levemente pinçados na região do funículo espermático e rebatidos dos epidídimos, sendo removidos completamente. Amostra de sangue venoso foi coletada por punção cardíaca do ventrículo direito em sístole, para análise dos níveis hormonais. Posteriormente os animais foram mortos por superdose do mesmo anestésico. As amostras de tecido excisadas tiveram sua massa (peso em gramas) determinada em balança digital de precisão (Sartorius BL2105, Gottingen, Alemanha), e feita avaliação macroscópica da ausência de hipóxia testicular. Os testículos do lado direito foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo em seguida estocados em freezer -80°C para posterior análise da expressão proteica por Western Blotting e os testículos do lado esquerdo foram fixados em formalina 10% para quantificação morfométrica, conforme processamento histológico de rotina.

Dentre os dez testículos estocados em freezer -80°C, seis foram utilizados para a realização da técnica de western blotting e quatro reservados para a realização da técnica de PCR em Tempo Real (dados não apresentados). Já dos testículos fixados em formalina 10%, três foram utilizados para análise quantitativa de proliferação e apoptose pela técnica de imunohistoquímica e cinco foram utilizados para análise da morfologia. Os dois testículos restantes estão processados e estão sendo utilizados para outras análises.

5.4 Western Blotting

Sessenta miligramas de tecido foram homogeneizados em 250 µL de tampão TEG adicionado de 1µg/mL de coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich®, MO, USA) e centrifugados a (33000 RPM-8600xg), duas vezes por 30 minutos em centrífuga refrigerada e o sobrenadante coletado e em seguida congelado. A dosagem de proteína foi realizada pela

técnica de Bradford (Bradford, 1976). Sessenta microgramas de proteína foram aplicados em gel de poliacrilamida - SDS a 10% e separadas em cuba de eletroforese por 120 minutos. Como padrão de peso molecular foi utilizado marcadores coloridos (**Bio-Rad®**, Hercules, USA). Ao término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF; **Amersham Biosciences®**, PiCataway, NJ, USA) em cuba de transferência semi-seca (Modelo: TE 70 – Fabricante: **Amersham Biosciences®**). Sequencialmente as membranas foram incubadas em leite desnatado em pó a 25% diluído em T-TBS (contendo Tris-HCL a 20 mM com pH 7,5, NaCl a 0,5 mM, Tween 20 a 0,05%) por uma hora em temperatura ambiente para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos em T-TBS *overnight* sendo, no dia seguinte, lavadas e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários por uma hora (relação de anticorpos e suas descrições na tabela 1). Seguindo protocolo de rotina para detecção das bandas, as membranas foram incubadas com reagente de detecção para reação de quimiluminescência aumentada (ECL, **Amersham BioSciences®**, PiCataway, NJ, USA) e fotodocumentada pelo sistema ChemiDoc (MP system **Bio-Rad®**, Life Science Research, USA). A análise densiométrica das imunomarcações foi realizada através do software Image J (Download ImageJ 1.45) e o valor da densitometria das bandas foi normalizado pela expressão de β -actina.

5.5 Imunohistoquímica

As amostras de testículo foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e fixadas por imersão em formalina 10% em tampão fosfato salino (PBS) por período mínimo de 24 horas. O material foi submetido às técnicas histológicas de rotina para processamento de tecidos: desidratação em álcool e clarificação em xilol para posterior inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos transversais na região mediana dos testículos, com cinco micrômetros de espessura, fixados em lâminas e posteriormente corados por Hematoxilina & Eosina para verificar a integridade do tecido. Para a análise imunohistoquímica foram utilizados três testículos de animais de cada grupo, a fim de demonstrar as possíveis alterações qualitativamente. Os cortes histológicos devidamente processados e acondicionados em

lâminas silanizadas (conforme protocolo de rotina) foram desparafinizados e hidratados com banhos de xilol e álcool crescente. Seguindo protocolo estabelecido para este estudo, os cortes histológicos foram submetidos à recuperação antigênica em tampão TRIS-EDTA (ph 9,0) “*overnight*” a 60°C e, no dia seguinte, tratados com solução de peróxido de hidrogênio em metanol por 10 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. O protocolo foi seguido por seções de lavagens em tampão PBS e posteriormente incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente com 10% de soro de cabra para bloqueio de ligações inespecíficas. Os cortes foram então incubados por 2 horas a 37°C com anticorpo específico para proliferação celular (tabela 2) diluído em PBS/BSA 1%. Os cortes foram então, lavados em temperatura ambiente por 20 minutos com anticorpo secundário biotilado, seguido de incubação em temperatura ambiente por 10 minutos com estreptavidina-peroxidase conjugado (Histostain-Plus Kit, Invitrogen, CA, USA). Os cortes foram lavados em PBS, em seguida revelados com DAB (diaminobenzidina - Histostain-Plus Kit, Invitrogen, CA, USA) e então contra corado com Hematoxilina. Os controles negativos foram processados através da substituição do anticorpo primário por solução PBS.

A detecção *in situ* de células apoptóticas no tecido em estudo também foi realizada de forma qualitativa, utilizando-se três animais por grupo, e feita a partir do kit Apoptag Plus (Apoptosis Detection Kit, Chemicon Int. Millipore, Billerica, MA), em cortes de testículo previamente fixados em lâminas. Após série de incubações com reagentes específicos do kit de detecção, os cortes foram então revelados com DAB (diaminobenzidina) específico do kit e contra corado com Metyl Green 0,5%.

Tanto para a análise dos núcleos apoptóticos, quanto para os núcleos em proliferação, foi feita a observação das células imunomarcadas, bem como as fotomicrografias das respectivas lâminas histológicas.

Tabela 1 - Descrição de anticorpos utilizados no estudo

Anticorpos primários	Diluição	Fabricante
AR (sc 816)	1:250	Santa Cruz, CA, USA
Aromatase (69653)	1:500	Millipore, MA, USA
β Actina (sc 81178)	1:1000	Santa Cruz, CA, USA
BAX (sc 493)	1:1000	Santa Cruz, CA, USA
ER- α (sc 8002)	1:250	Santa Cruz, CA, USA
ER- β (sc 53494)	1:500	Santa Cruz, CA, USA
FSHR (sc 7798)	1:500	Santa Cruz, CA, USA
LHR (sc 25828)	1:200	Santa Cruz, CA, USA
OBr (sc 1834)	1:500	Santa Cruz, CA, USA
PCNA (180110)	1:500	Life Technologies, CA, USA
StAR (ab 58013)	1:250	Abcam, MA, USA
VEGF (sc 8002)	1:500	Santa Cruz, CA, USA
Anticorpos secundários		
Anti-goat (sc 2768)	1:1000	Santa Cruz, CA, USA
Anti-mouse(sc 205)	1:2000	Santa Cruz, CA, USA
Anti-rabbit (12-348)	1:2000	Santa Cruz, CA, USA

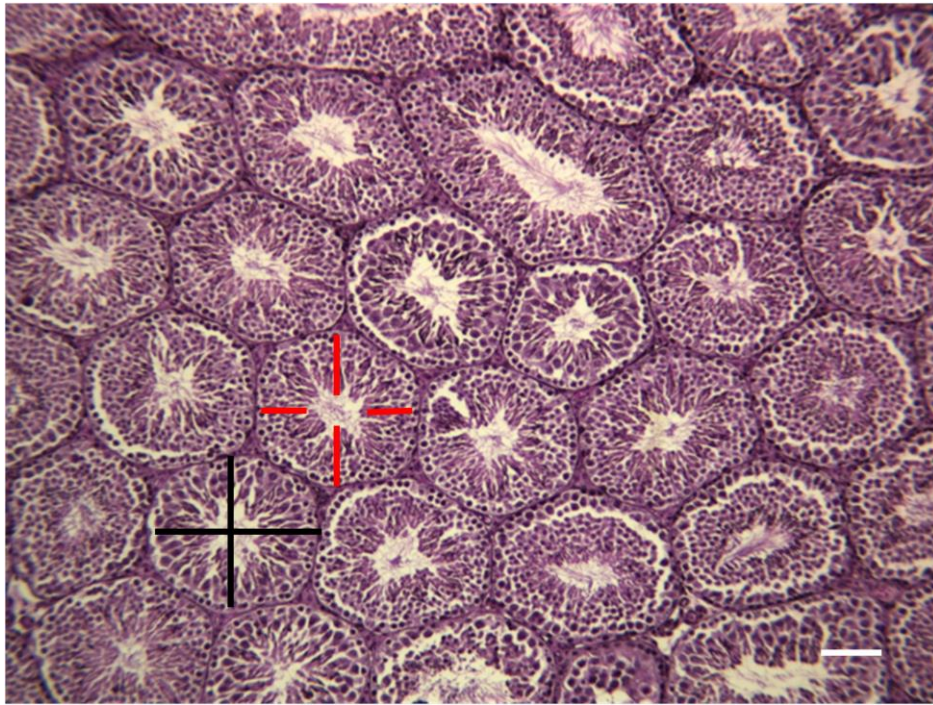
Nota: Diluição dos anticorpos protocolado previamente para o estudo.

5.6 Morfologia quantitativa dos testículos

Para a análise morfológica dos testículos foram utilizados cinco animais por grupo. O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 25 secções transversais de túbulos seminíferos apresentando contorno o mais circular possível, utilizando-se ocular de x10, com aumento final de x100. Nas mesmas secções, porém com aumento final de x200, foi mensurada a altura do epitélio seminífero, desde a membrana basal até a borda luminal. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo foi representado pela média de quatro medidas tomadas em bordos diametralmente opostos (Fig. 2). A determinação das medidas do lume tubular foi feita pela subtração da altura do epitélio seminífero pelo diâmetro tubular.

A análise das imagens para determinação dos parâmetros morfológicos dos túbulos seminíferos foi realizada utilizando-se o programa Imagepro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA), onde cortes histológicos dos testículos foram usados para obter fotomicrografias de cada animal, perfazendo um total de 125 imagens analisadas por grupo. As fotomicrografias foram realizadas após iluminação de Koehler em microscópio de luz **Leica®**, modelo DM-RBE.

Figura 2 - Fotomicrografia de secção transversal de túbulo seminífero, mostrando parâmetro de obtenção de medidas diametralmente opostas



Legenda: Altura do epitélio seminífero representada por linhas em vermelho e diâmetro do túbulo seminífero representado por linhas em preto. Animal do grupo controle. HE.

Nota: Aumento de 100 x. Barra = 100µm.

5.7 Níveis hormonais

O sangue coletado por punção cardíaca no momento da morte dos animais foi utilizado para a determinação dos níveis séricos de testosterona, estradiol e leptina.

A concentração sérica de testosterona e estradiol foi determinada por Kit específico para ensaio de quimiluminescência, onde o limite de detecção foi de 0,025ng/mL para testosterona (**Roche®**; cat#05200067) e de 5,0pg/mL para estradiol (**Roche®**; cat#03000079). As concentrações séricas de leptina foram determinadas através do ensaio de ELISA (**Millipore®**; cat#EZRL-83K) específico para camundongos, sendo o coeficiente de variação intra e inter ensaio de 1,9% e 33% e a sensibilidade de 0,08 ng/mL. A leitura dos resultados do ensaio de ELISA foi realizada seguindo as especificações do fabricante, no

leitor de microplaca multi-modo FLUOstar Omega (**BMG Labtech®**, Alemanha). Todas as análises séricas foram feitas em duplicata.

5.8 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla California USA). As amostras foram testadas para normalidade usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média e analisados pelo teste t *Student*. O nível de significância utilizado foi de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

A ingestão alimentar das progenitoras não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados. A massa corporal foi mensurada semanalmente para afastar qualquer influência deste parâmetro nas alterações encontradas nas proles. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o ganho de massa corporal e o período gestacional entre os grupos controle (C) e cafeína (CF). O tamanho da ninhada também não apresentou diferença estatística. Dados expressos na tabela 2.

A ingestão alimentar da prole cujas mães foram submetidas à administração de cafeína na gestação está apresentado na Fig. 3. Os animais do grupo cafeína apresentaram uma ingestão alimentar inferior em relação aos do grupo C, com redução significativa na 11^a e 13^a semanas ($p < 0,05$).

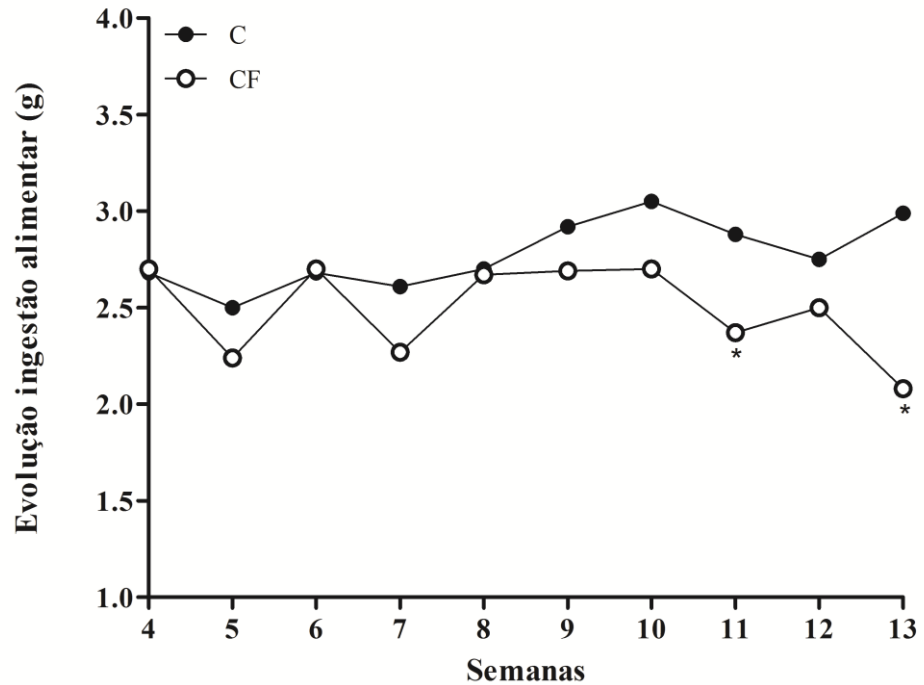
Tabela 2 - Dados referentes à resposta materna ao uso crônico de cafeína durante a gestação (ingestão alimentar, massa corporal e tamanho da ninhada)

Dados	Período	C	CF	P
Ingestão alimentar (g/dia)	Gestação	3,33 ± 0,25	3,34 ± 0,08	NS
	Lactação	7,84 ± 0,36	8,03 ± 0,28	NS
Massa Corporal (g)	1ª semana	20,56 ± 0,61	20,61 ± 0,60	NS
	2ª semana	21,09 ± 0,52	21,29 ± 0,66	NS
	3ª semana	28,52 ± 0,80	27,62 ± 1,41	NS
	Periparto	34,72 ± 0,47	33,09 ± 1,37	NS
Tamanho da ninhada (nº de filhotes)	Nascimento	8,60 ± 0,60	7,00 ± 0,63	NS

Valores apresentados em média±erro padrão da média (n= 10 animais por grupo).

Abreviaturas: g (grama), C (controle) e CF (cafeína). NS significa ‘não significativo estatisticamente’.

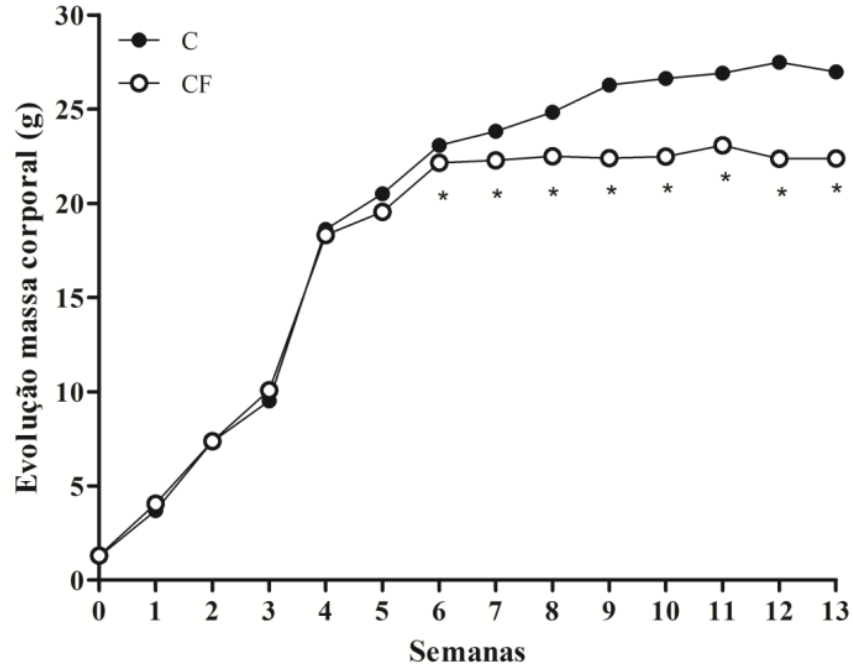
Figura 3 - Evolução de ingestão alimentar dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) a partir do desmame até o final do experimento



Legenda: Os animais do grupo CF apresentaram menor ingestão alimentar, com diferença estatística nas 11ª e 13ª semanas.

Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo; * $p < 0,05$.

Figura 4 - Evolução da massa corporal dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) por todo o experimento



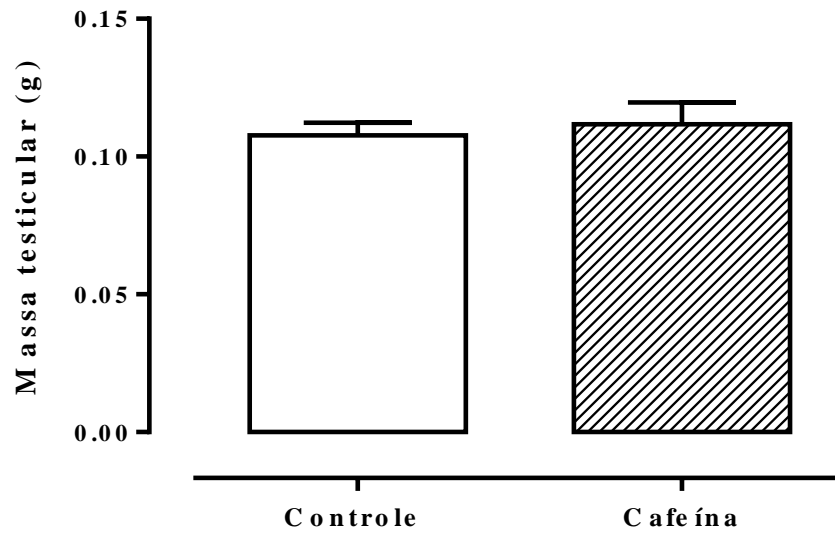
Legenda: Os animais do grupo CF apresentaram menor massa corporal a partir da 6ª semana, comparados com o grupo CF.

Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo; * $p < 0,0001$.

Durante a lactação não houve uma diferença significativa entre a massa corporal dos animais do grupo cafeína quando comparados ao grupo Controle. Já no período pós desmame, os animais cujas mães receberam cafeína na gestação apresentaram uma redução significativa da evolução da massa corporal a partir da 6ª semana, mantendo esta redução por todo o experimento. Ao final do experimento, o grupo cafeína apresentou uma massa corporal 17% menor, em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Fig. 4).

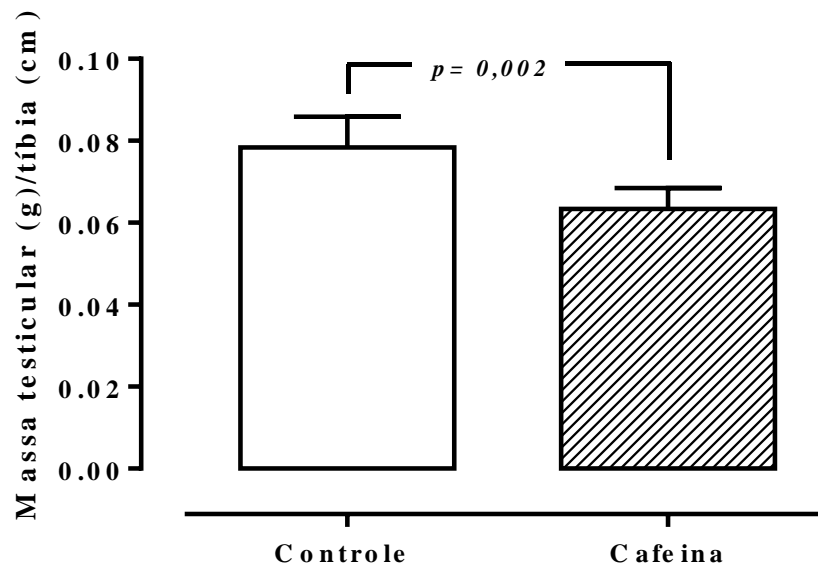
Os dados de massa testicular não demonstram diferenças entre os grupos, quando analisados os valores absolutos (Fig. 5). Entretanto, quando corrigido pelo comprimento da tibia (Yin, FC *et al*; 1982), os mesmos mostram redução estatisticamente significativa na massa testicular de animais do grupo cafeína (Fig. 6).

Figura 5 - Massa testicular absoluta expressa em gramas dos animais nos grupos controle e cafeína ao final do experimento



Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo

Figura 6 - Massa testicular relativa expressa em gramas, corrigida pelo comprimento da tíbia dos animais nos grupos controle e cafeína

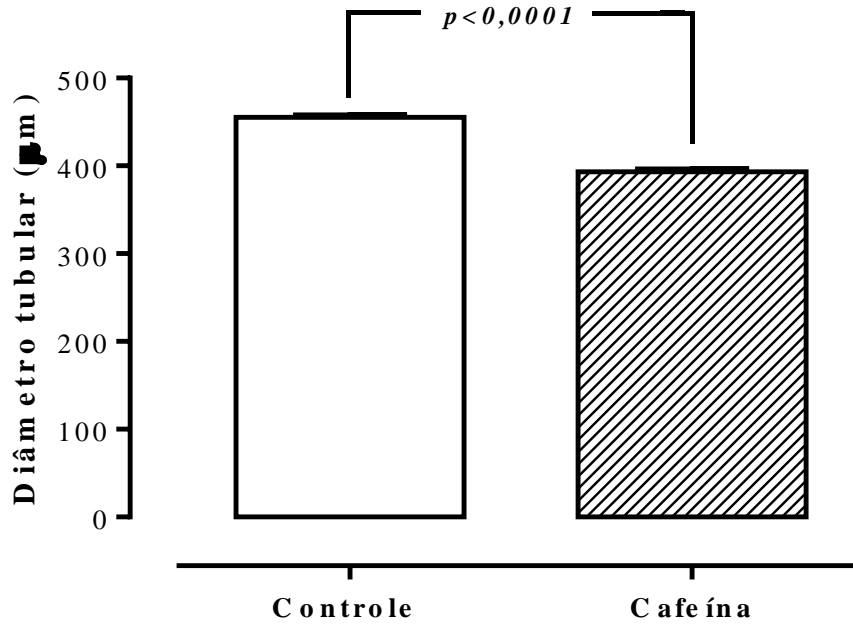


Legenda: Os animais do grupo cafeína apresentaram significativa redução na massa testicular com relação grupo controle.

Nota: Dados expressos como média ± erro padrão de 10 animais por grupo.

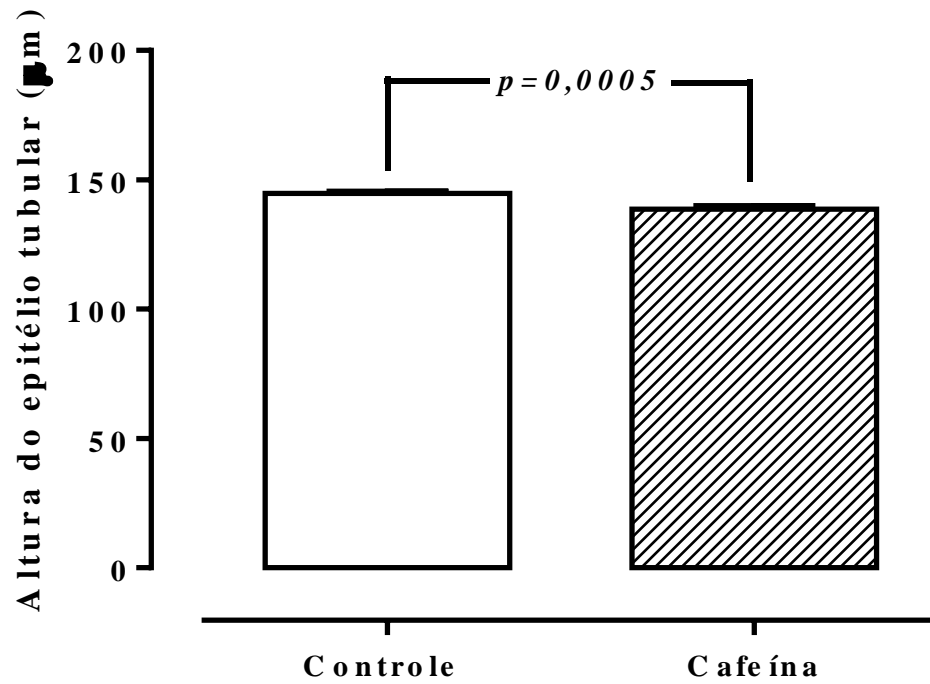
O estudo evidencia redução nos parâmetros morfométricos avaliados nos testículos dos animais do grupo cafeína em relação aos animais controle. Redução estatisticamente significativa foi observada no diâmetro dos túbulos seminíferos (Fig. 7), na altura do epitélio seminífero (Fig. 8) e área do lume seminífero (Fig. 9), representados por fotomicrografia (Fig. 10) e conforme gráficos a seguir:

Figura 7 - Diâmetro tubular médio expresso em micrômetros, com redução estatisticamente significativa no grupo cafeína em comparação ao grupo controle



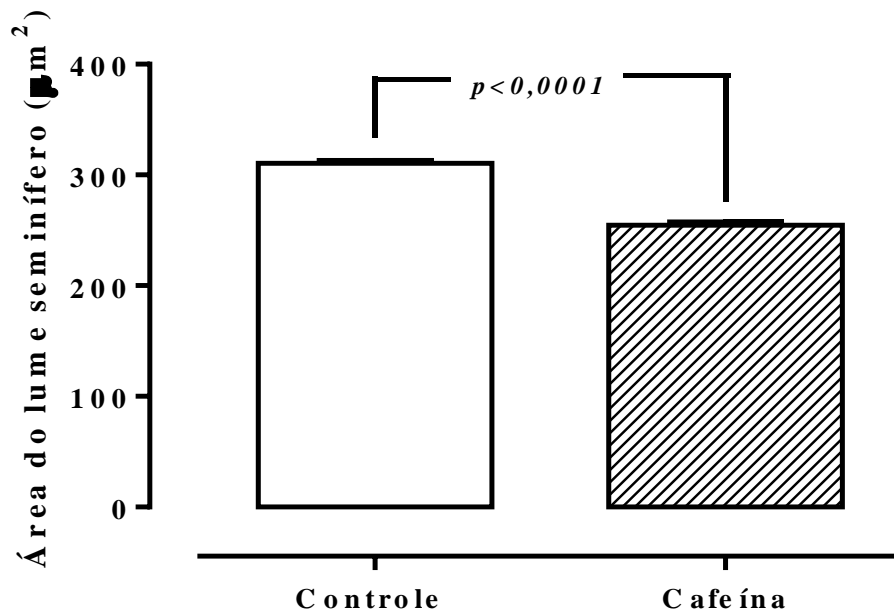
Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo.

Figura 8 - Altura do epitélio dos túbulos seminíferos expresso em micrômetros, com redução estatisticamente significativa no grupo cafeína em comparação ao grupo controle



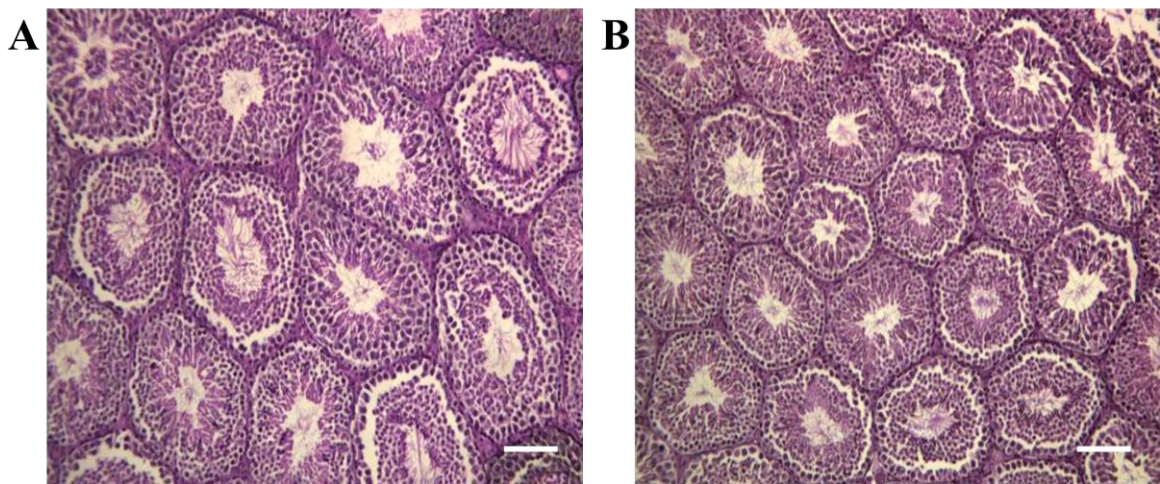
Legenda: Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo.

Figura 9 - Área do lume seminífero expresso em micrômetros quadrados, com redução estatisticamente significativa no grupo cafeína em comparação ao grupo controle



Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo.

Figura 10 - Fotomicrografia de secção transversal de túbulos seminíferos

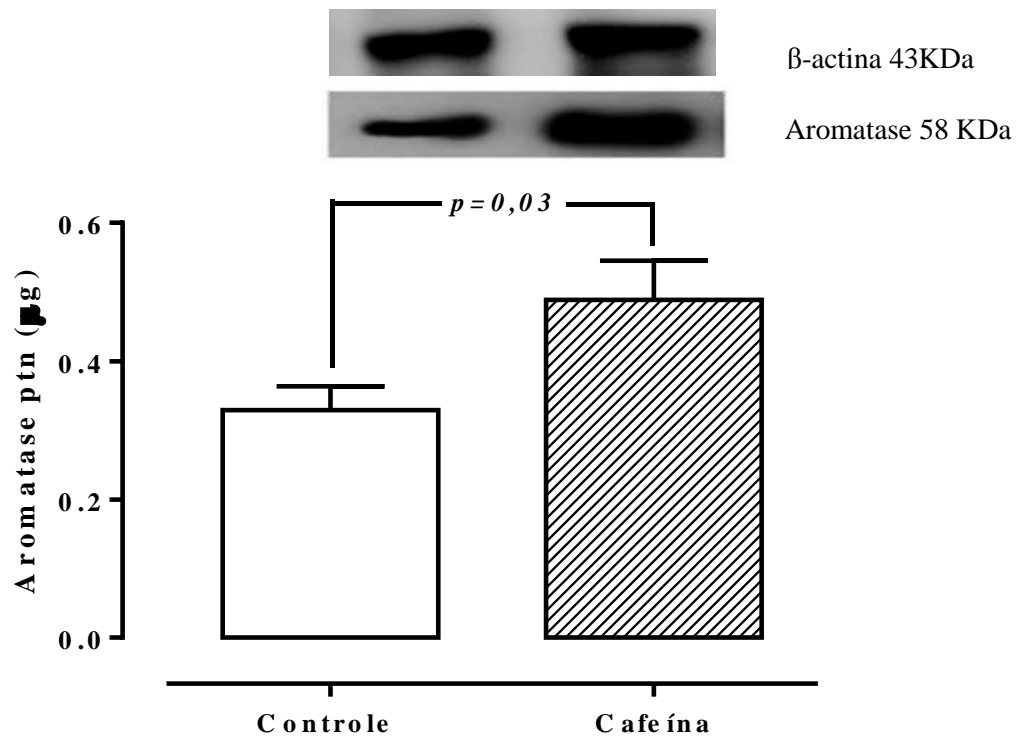


Legenda: Em **A** imagem representativa de animal do grupo controle e em **B** imagem representativa de animal do grupo cafeína, mostrando redução no diâmetro dos túbulos seminíferos nestes animais.

Nota: Coloração por Hematoxilina e Eosina. Aumento de 100 x. Barra = 100µm.

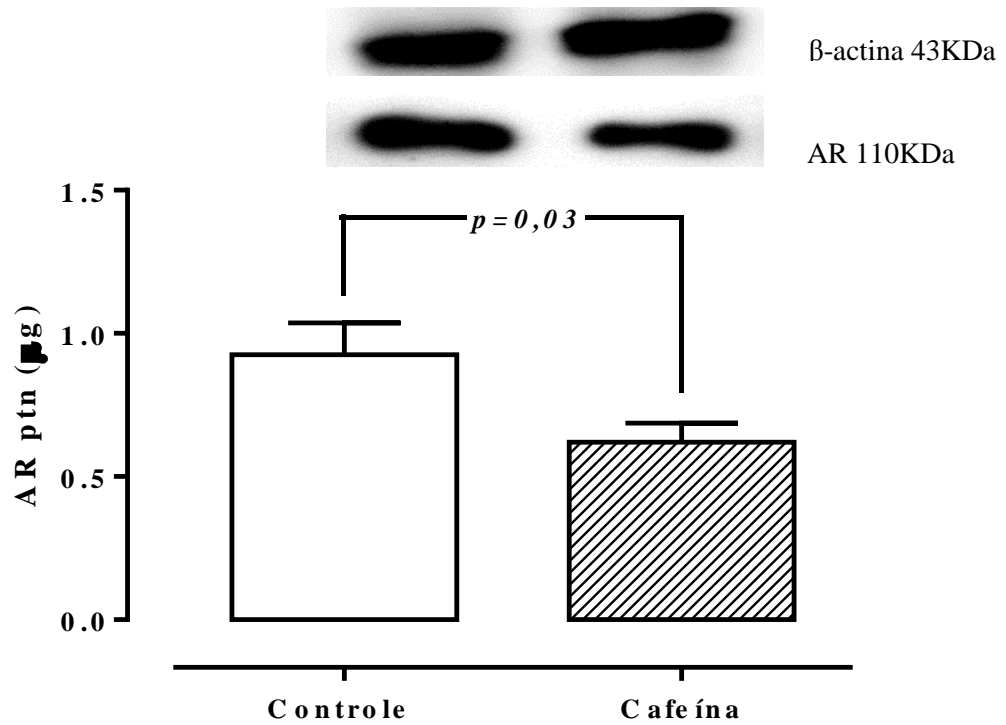
Alterações na expressão proteica foram evidenciadas neste estudo. No grupo cafeína houve um aumento estatisticamente significativo na expressão da enzima aromatase (Fig. 11), enquanto redução na expressão de AR (Fig. 12) e VEGF (Fig. 13) foram observadas nos animais do grupo cafeína em comparação aos animais do grupo controle. Entretanto, não houve alteração na expressão proteica de ER alfa e ER beta (Fig. s 14 e 15).

Figura 11 - Expressão proteica da enzima aromatase por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60µg de proteína total)



Legenda: Animais do grupo cafeína apresentaram aumento significativo com relação grupo controle.
Nota: Dados expressos como média ± erro padrão de seis animais por grupo.

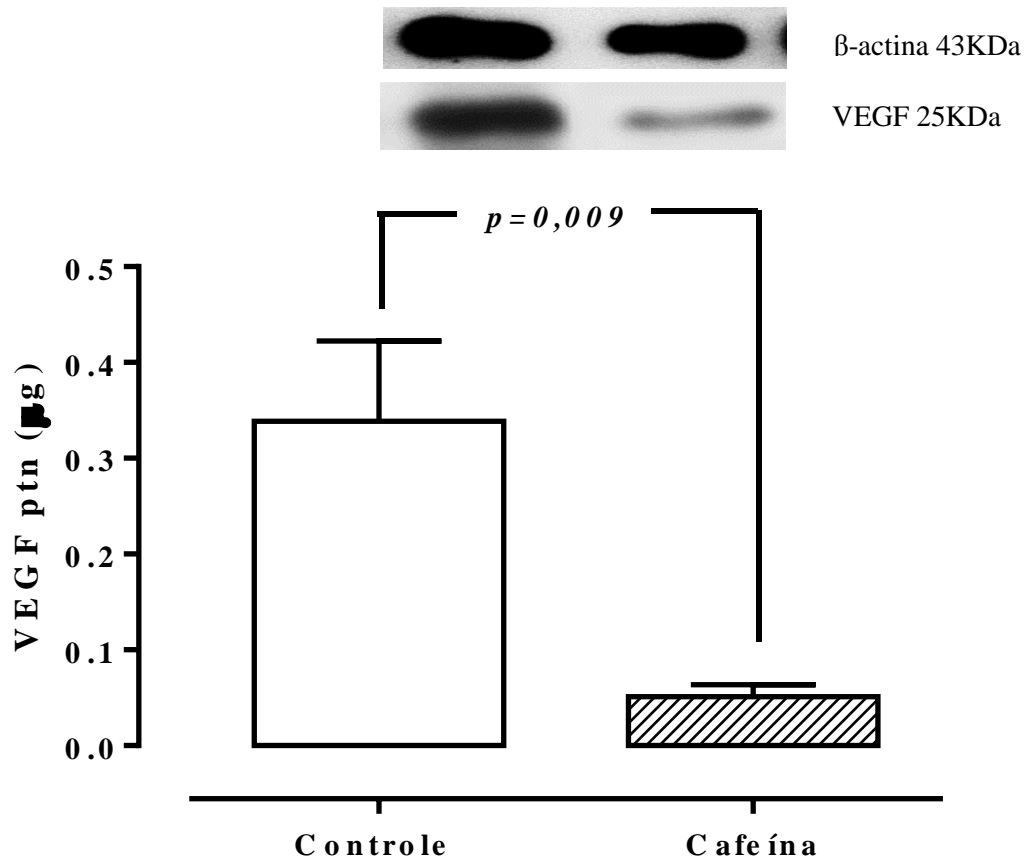
Figura 12 - Expressão proteica do receptor de androgênio (AR) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Legenda: Animais do grupo cafeína apresentaram redução significativa na expressão proteica do receptor de androgênio com relação grupo C.

Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

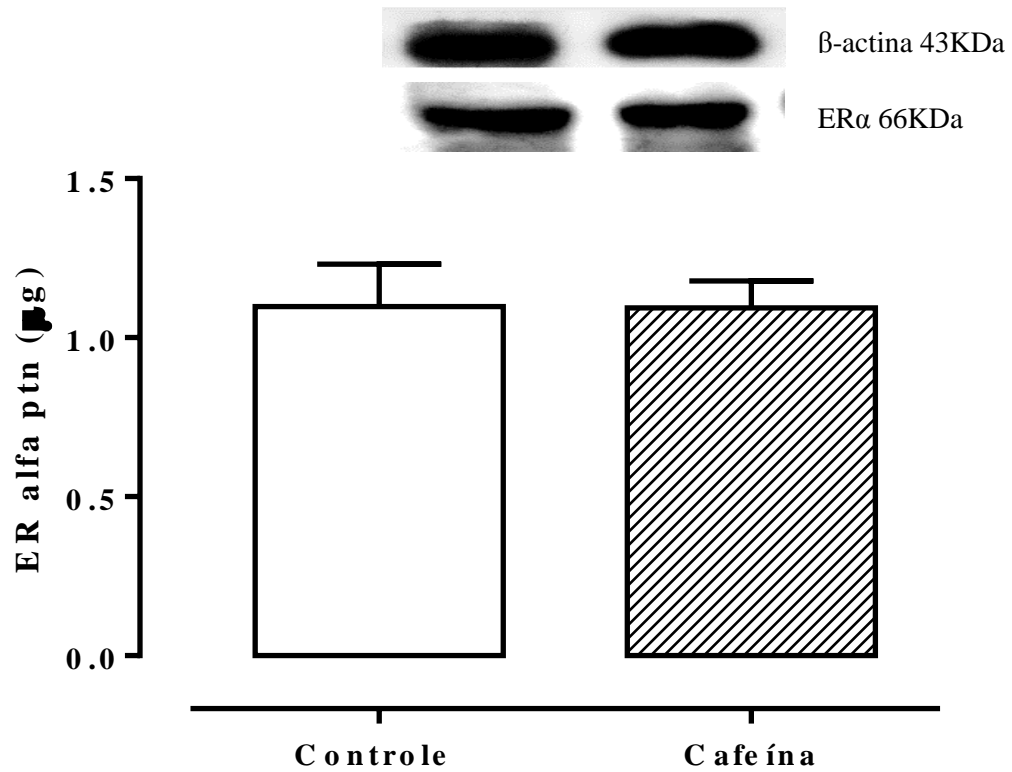
Figura 13 - Expressão proteica do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Legenda: Animais do grupo cafeína apresentaram redução significativa na expressão do fator de crescimento vascular endotelial com relação grupo C.

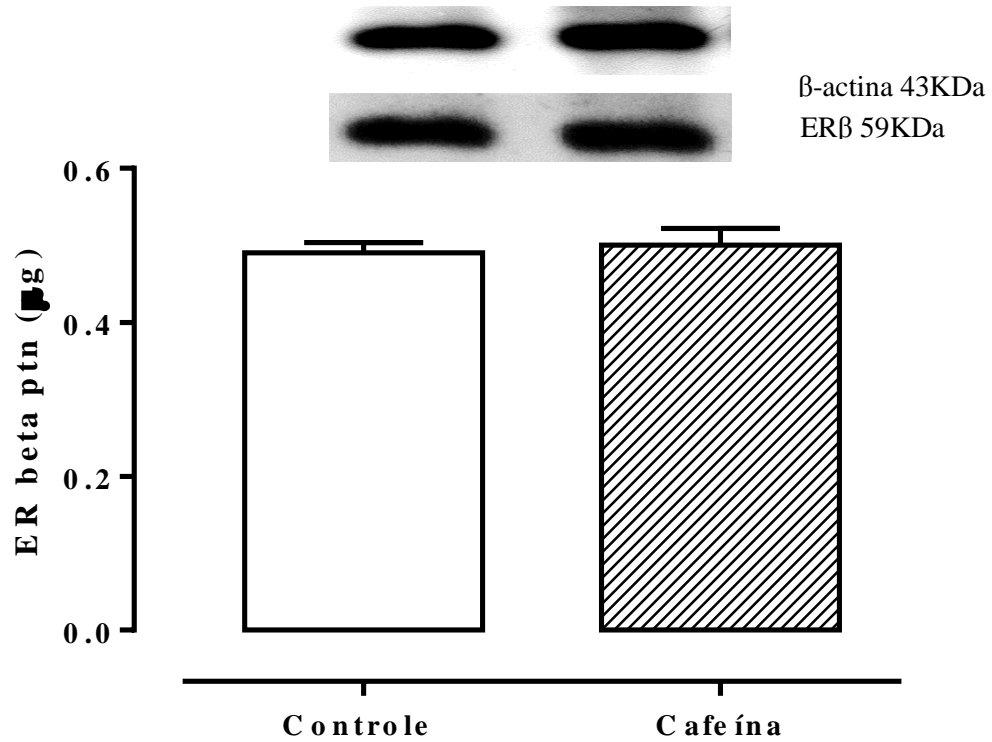
Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

Figura 14 - Expressão proteica do receptor de estrogênio do tipo alfa ($ER\alpha$) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Nota: Não foi observado diferença entre os grupos. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

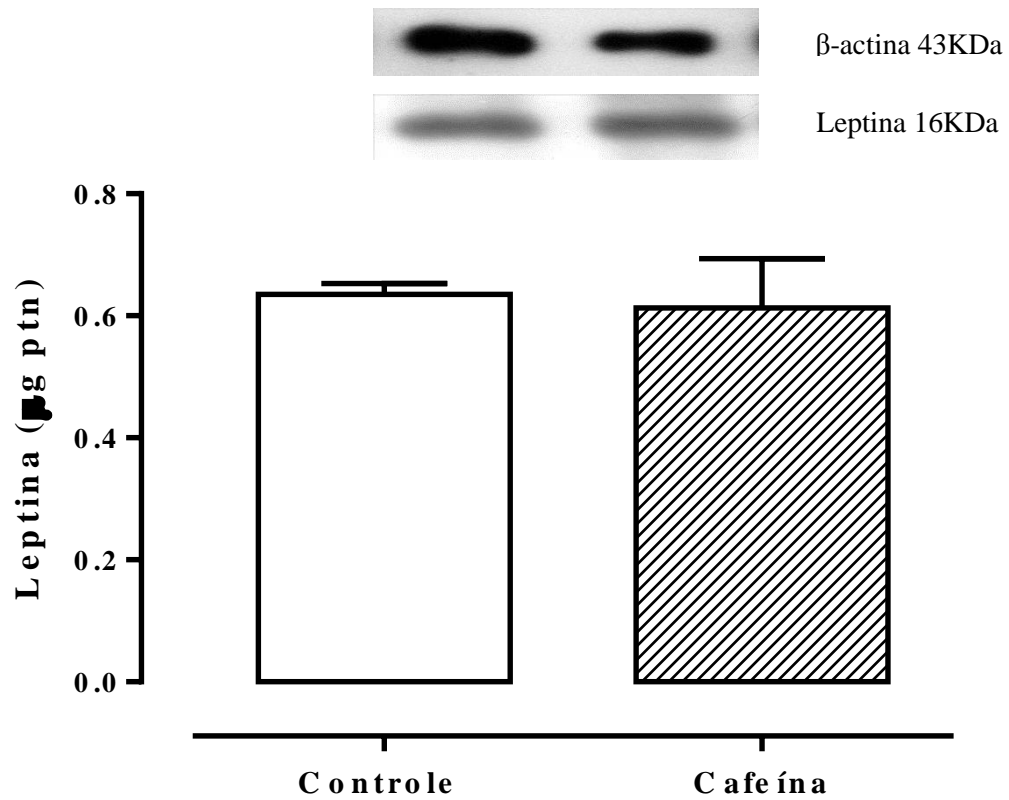
Figura 15 - Expressão proteica do receptor de estrogênio do tipo beta (ER β) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Nota: Não foi observado diferença entre os grupos. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

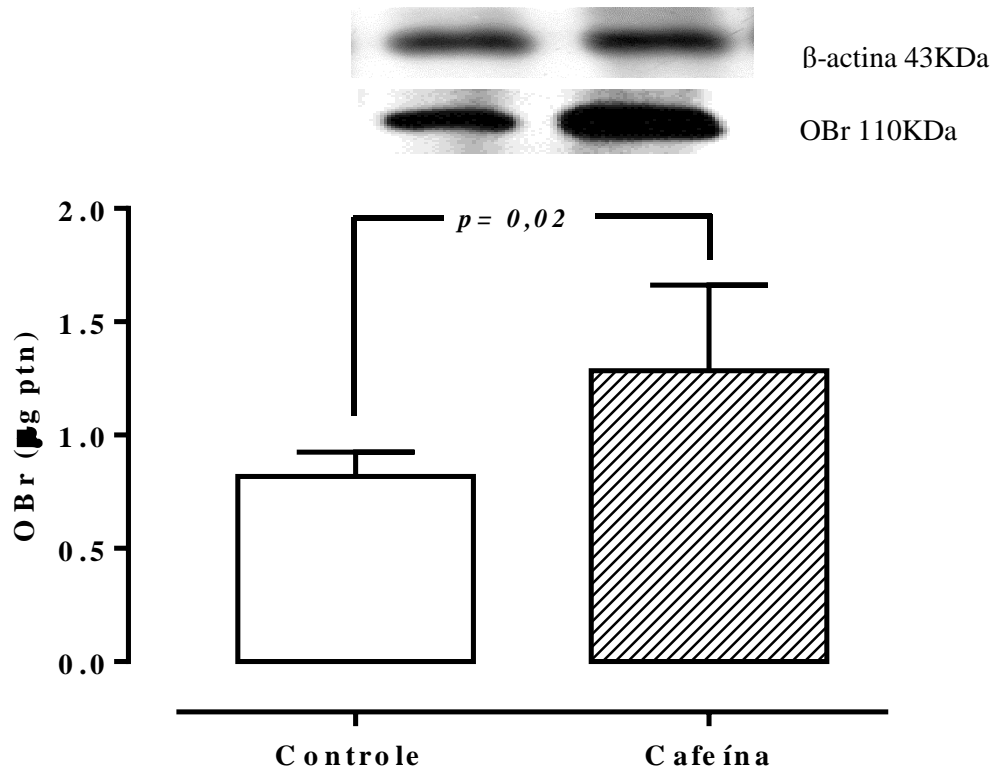
Com relação à expressão proteica de leptina não foi evidenciado diferenças entre os grupos (Fig. 16), entretanto a expressão proteica do seu receptor (OBr) se mostra significativamente aumentada nos animais do grupo cafeína em relação ao grupo controle (Fig. 17).

Figura 16 - Expressão proteica de Leptina por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Nota: Não foi observado diferença entre os grupos. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

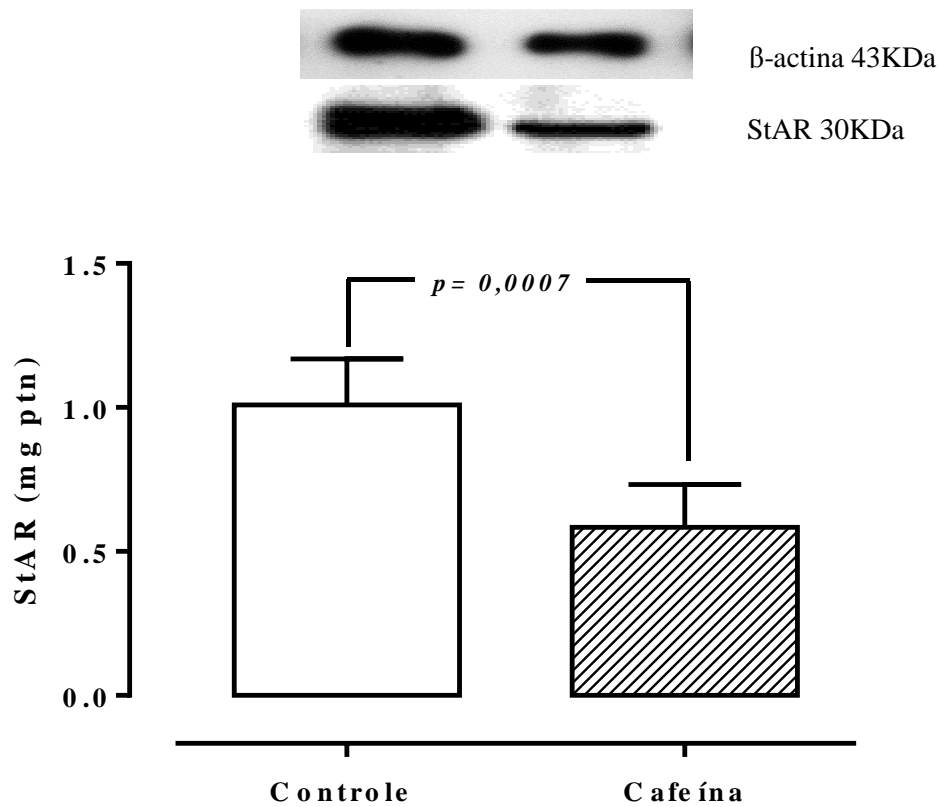
Figura 17 - Expressão proteica do receptor de leptina (OBr) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Nota: Não foi observado diferença entre os grupos. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

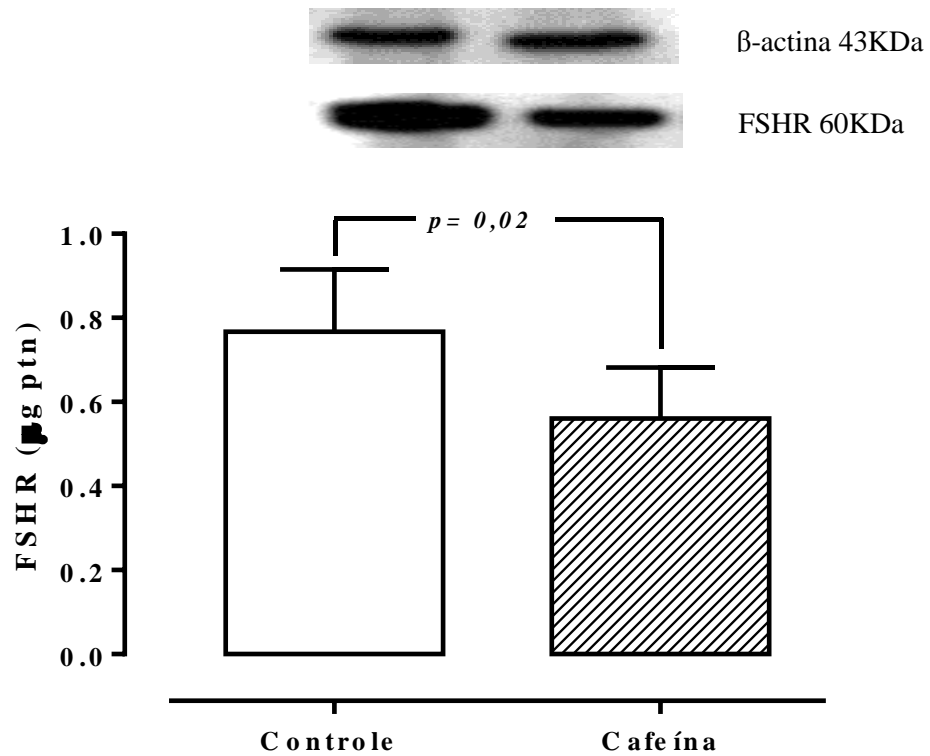
O estudo demonstra, ainda com relação à expressão proteica, alterações na via esteroidogênica evidenciadas pela redução significativa da proteína StAR (Fig. 18) e do receptor de FSH (Fig. 19).

Figura 18 - Expressão da proteína reguladora da esteroidogênese (StAR) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60µg de proteína total)



Nota: Demonstrando redução estatisticamente significativa no grupo cafeína. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

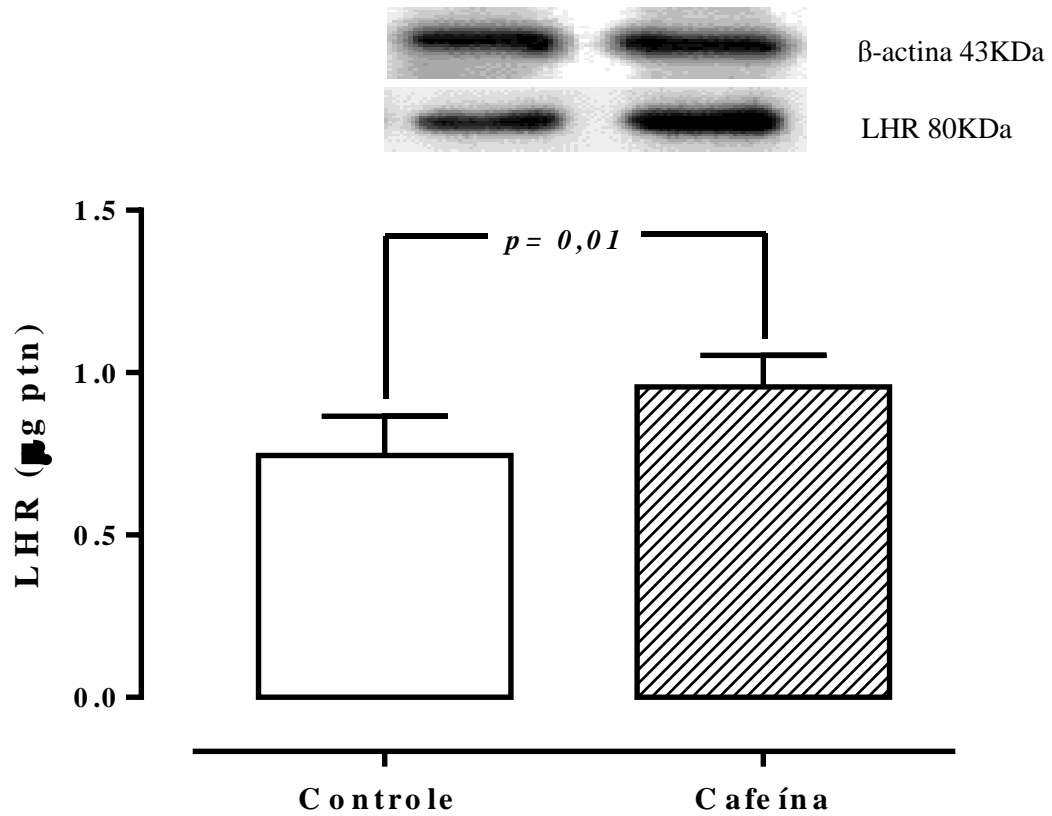
Figura 19 - Expressão proteica do receptor de hormônio folículo-estimulante (FSHR) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Nota: Demonstrando redução estatisticamente significativa no grupo cafeína. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

Embora tenha ocorrido redução em nível proteico relacionado à via esteroidogênica e receptor de FSH, o mesmo não ocorreu com a expressão do receptor de LH que se mostra significativamente aumentada nos animais do grupo cafeína (Fig. 20).

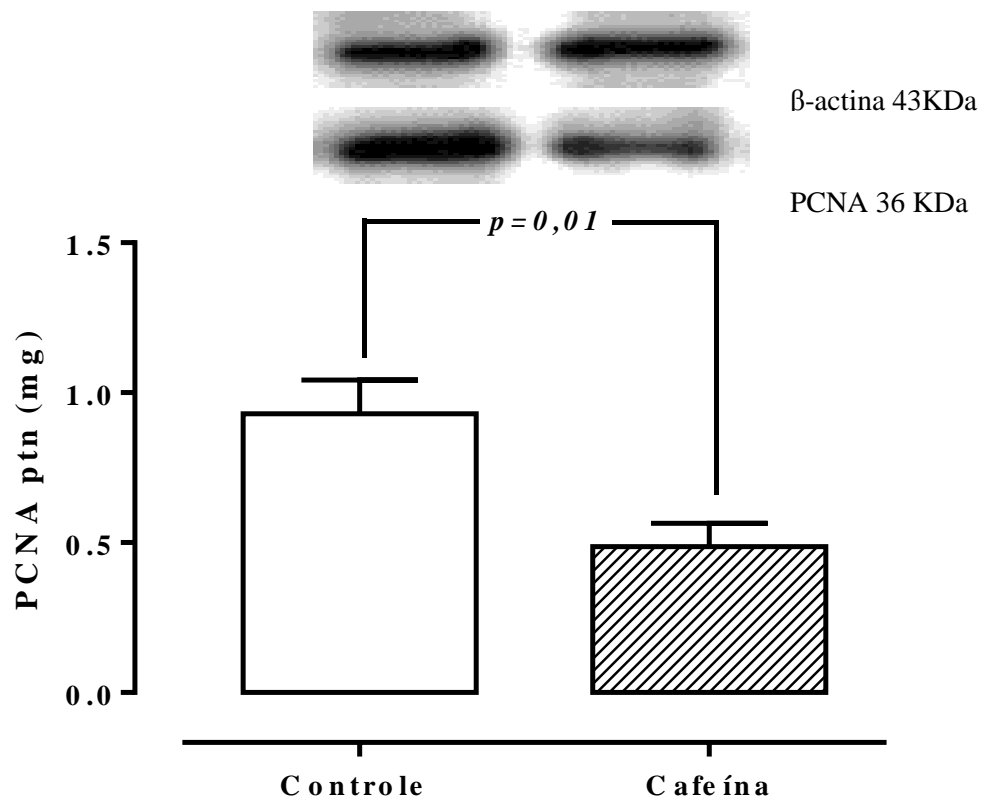
Figura 20 - Expressão proteica do receptor de hormônio luteinizante (LH) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total)



Nota: Demonstrando aumento estatisticamente significativo no grupo cafeína. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

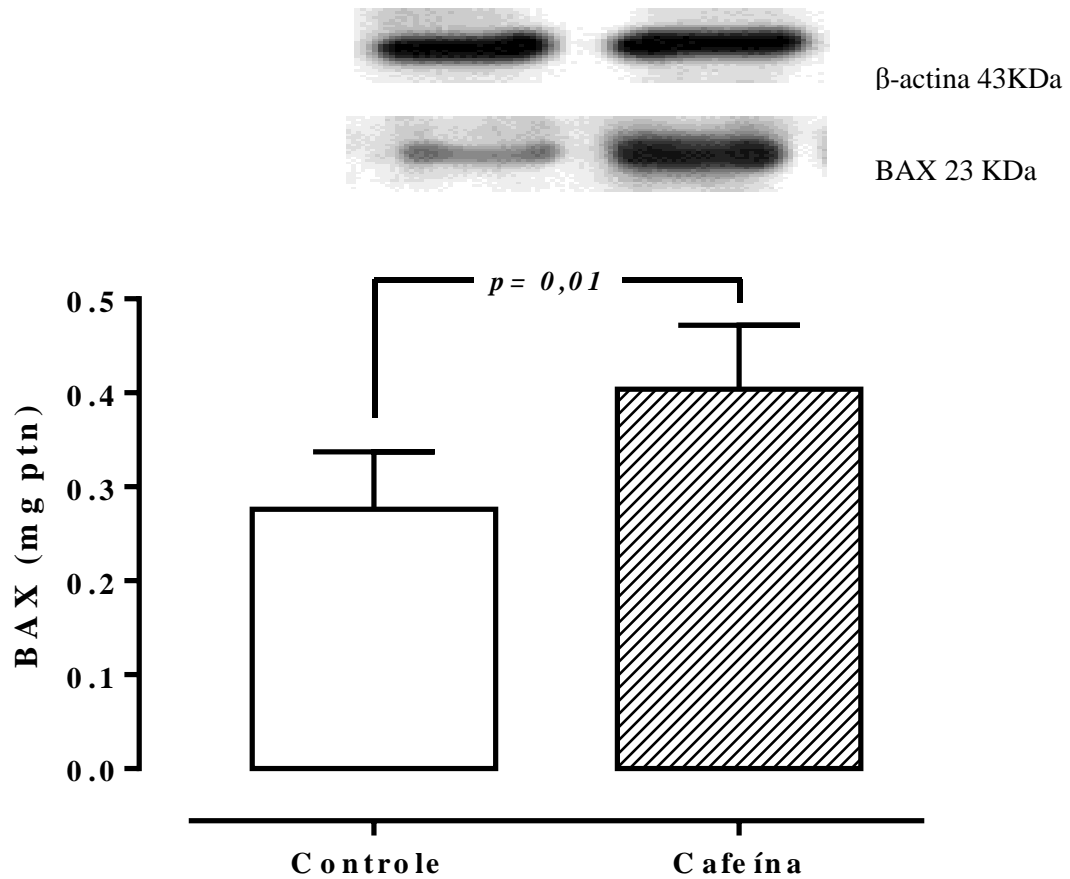
No que tange a manutenção do tecido testicular relacionado à proliferação e apoptose, observamos, neste estudo, a redução da expressão protéica de PCNA nos animais do grupo cafeína (Fig. 21) e de modo contrário, o aumento na expressão da proteína BAX nos animais do mesmo grupo (Fig.22).

Figura 21 - Expressão proteica do antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60µg de proteína total)



Nota: Demonstrando redução estatisticamente significativa no grupo cafeína. Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo

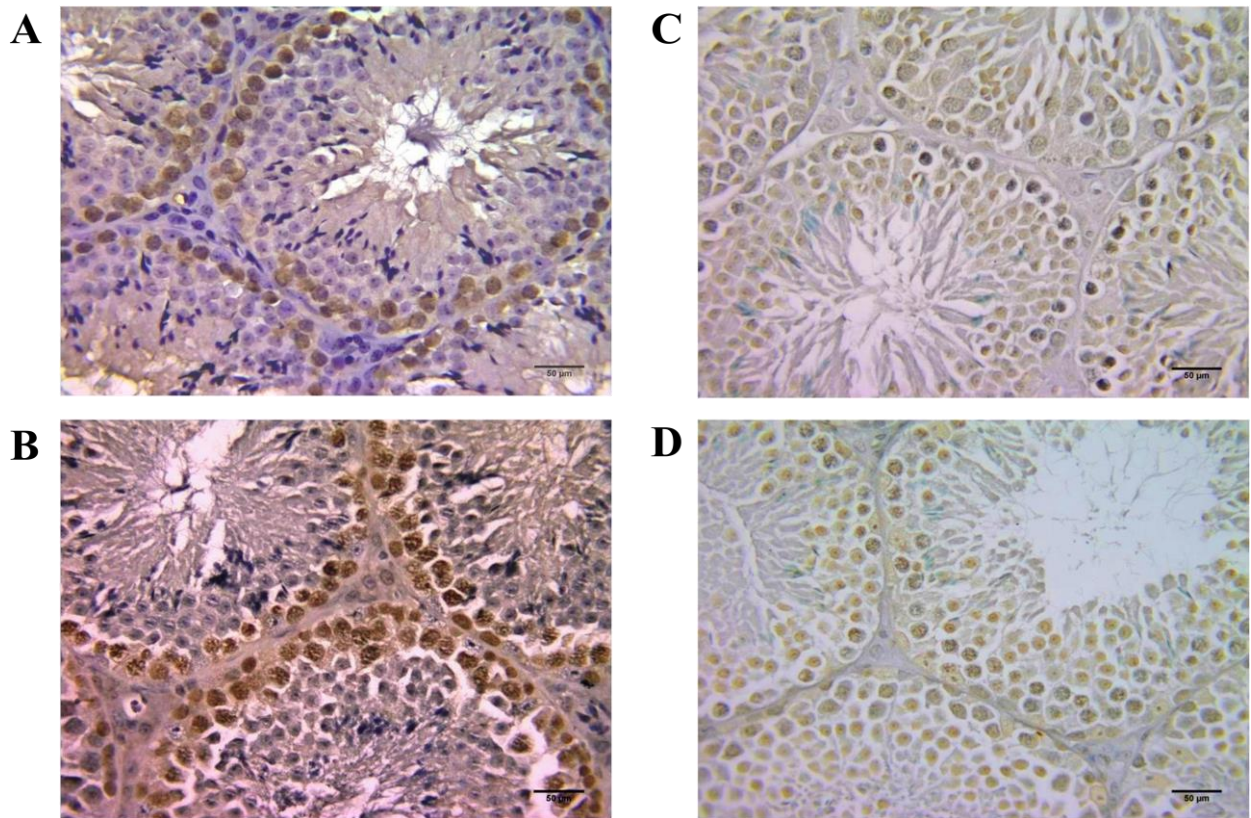
Figura 22 - Expressão proteica de regulador de apoptose (BAX) por *Western blotting* dos animais nos grupos controle e cafeína (60 μ g de proteína total), demonstrando aumento estatisticamente significativo no grupo cafeína



Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de seis animais por grupo.

A imunomarcação para PCNA e BAX mostrou marcação positiva nas células testiculares, sendo mais evidenciada a proliferação no ep t lio seminífero e a apoptose ao longo da linhagem germinativa, conforme mostra a figura 23.

Figura 23 - Imunomarcação qualitativa de células em proliferação e apoptose

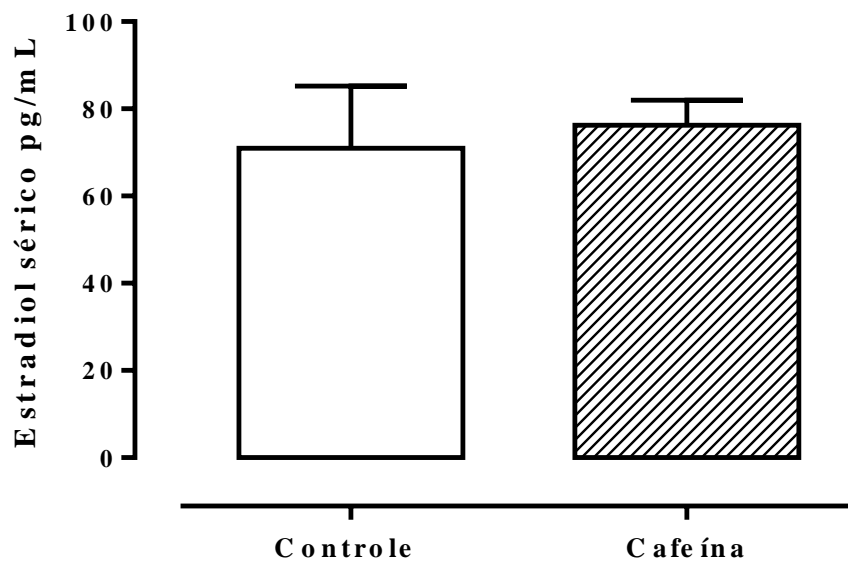


Legenda: Respectivamente (A e B: animais do grupo controle, C e D animais do grupo cafeína). N=3 animais por grupo.

Nota: Aumento de 400X. Barra = 50µm.

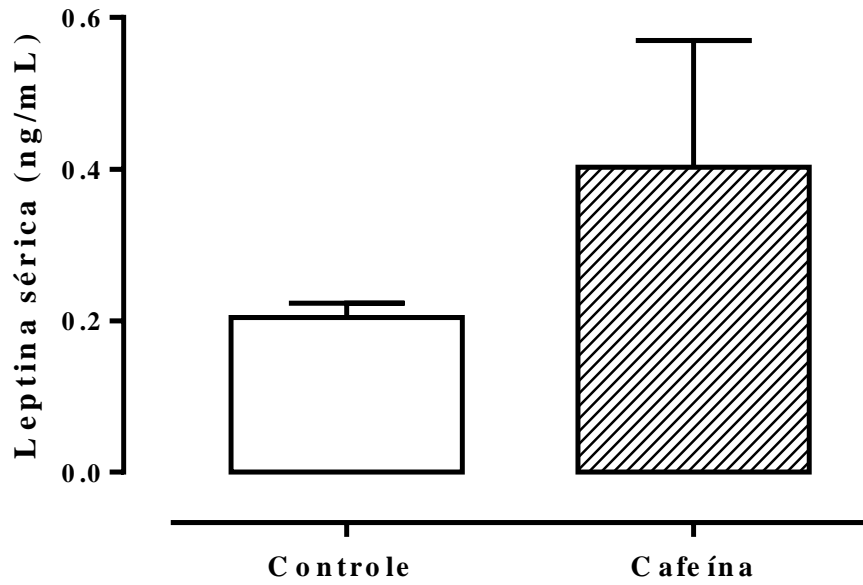
O ensaio de quimiluminescência para dosagem dos níveis séricos de estradiol não demonstrou diferença significativa entre os animais dos grupos de estudo (Fig. 24). Entretanto, embora não estatisticamente significativo, observa-se padrão de elevação nos níveis séricos de leptina no grupo cafeína (Fig. 25). Já os níveis séricos de testosterona foram estatisticamente reduzidos nos animais do grupo cafeína em comparação com animais do grupo controle (Fig. 26).

Figura 24 - Níveis séricos de estradiol determinado por ensaio de quimiluminescência (limite de detecção = 5,0 pg/mL) nos grupos controle e cafeína, demonstrando não haver diferença significativa entre os grupos



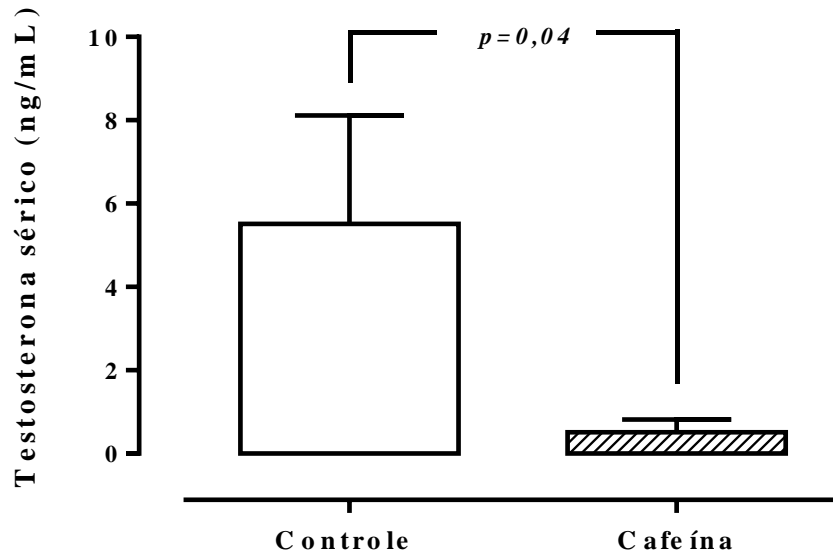
Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de cinco animais por grupo.

Figura 25 - Níveis séricos de leptina determinados por ELISA (coeficiente de variação intra e inter ensaio de 1,9% e 33% e a sensibilidade de 0,08 ng/mL) nos grupos controle e cafeína, demonstrando não haver diferença significativa entre os grupos



Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de cinco animais por grupo.

Figura 26 - Níveis séricos de testosterona, determinados por quimiluminescência (0,025ng/mL) mostrando redução significativa nos animais do grupo cafeína em comparação ao grupo controle (cinco animais por grupo)



Nota: Dados expressos como média \pm erro padrão de cinco animais por grupo.

7 DISCUSSÃO

Avaliamos a toxicidade do consumo materno de cafeína durante a gestação nos testículos da prole em camundongos C57BL/6. De acordo com os resultados obtidos, vimos que o consumo materno de cafeína pode alterar a função dos testículos na vida adulta. Nossos achados demonstraram que a exposição à cafeína no período gestacional tem efeitos adversos na massa corporal, massa testicular, na estrutura dos testículos, nos níveis séricos de testosterona e na expressão de várias proteínas responsáveis pela função testicular.

A dose de cafeína utilizada neste estudo está dentro da faixa de administração já relatada em trabalhos na literatura (Hughes e Beveridge, 1990, 1991) e teve efeitos comportamentais relatados nos estudos quando administrado diariamente durante gestação e lactação na água de beber. Dados da literatura demonstram que a ingestão $\geq 30\text{mg/kg/dia}$ de cafeína a ratos prejudica o sistema reprodutivo dos animais machos (Pollard *et al.*, 1990). Em um homem com 70 kg, 30mg/kg de cafeína implica em um consumo de mais de dois gramas de cafeína (ou mais de 20 xícaras de café contendo 100mg de cafeína/xícara), uma dose que é gravemente tóxico e próximo ao estimado para doses letais. No entanto, fazendo uma correção para considerar a taxa metabólica de roedores em relação aos seres humanos, uma dose de 30mg/kg de cafeína para um roedor é convertida em uma dose mais segura de 8,8 mg/kg (ou cerca de 6-7 xícaras de café) (Fredholm *et al.*, 1999).

A dose usada neste estudo foi inferior a 30mg/kg/dia, e corresponde a duas xícaras de café. Podemos considerar, ainda, que o consumo de cafeína não se dá apenas pela ingestão de café, sendo a substância consumida através de outros alimentos que contém xantinas e seus derivados, como chás, refrigerantes de cola e até mesmo medicamentos à base de cafeína. Deste modo, o nível de absorção de cafeína pode ser ainda mais elevado do que o estimado, quando se considera apenas o consumo de café. O tratamento das progenitoras com cafeína não produz quaisquer sinais visíveis de toxicidade materna. Não houve diferenças estatisticamente significativas com relação à massa corporal das progenitoras e consumo de alimentos entre as matrizes do grupo controle e as do grupo tratadas com cafeína. Nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem de fêmeas gestantes que deram à luz ou mesmo no número de filhotes vivos. Este achado está de acordo com a literatura (Soellner *et al.*, 2009; Dorostghoal *et al.*, 2012).

Em relação a massa corporal no nascimento, existem alguns estudos que mostraram que o consumo de cafeína durante a gestação pode levar a redução da massa corporal ao nascer (Aeschbacher *et al.*, 1980; West *et al.*, 1986), enquanto outros não mostraram nenhuma alteração (Soellner *et al.*, 2009). No presente estudo, não foi observada nenhuma diferença significativa na massa corporal ao nascimento da prole. Poderíamos atribuir essa discrepância à diferença para a dose de cafeína utilizada nos estudos. Demonstrou-se que a cafeína tem efeitos anorexígenos, promovendo a saciedade e reduzindo o ganho de massa corporal em animais adultos (Hussein *et al.*, 2011) na prole cujas mães foram submetidas ao consumo de cafeína durante a gestação (Serapiao-Moraes *et al.*, 2013), ou mesmo durante a gestação e lactação, conforme observado na literatura em trabalho que avaliou a ingestão de cafeína materna durante estas duas fases (Dorostghoal *et al.*, 2012).

Animais adultos que receberam a administração crônica de erva-mate (que contém um tipo de xantina, como a cafeína) também apresentaram um aumento nos níveis séricos de leptina o que poderia ser responsável pelos efeitos anorexígenos da cafeína (Crissman *et al.*, 2004; Yavasoglu *et al.*, 2008). Nossos resultados reforçam esta hipótese, já que o grupo tratado com cafeína apresentou uma redução no consumo de alimentos e no ganho de massa corporal, bem como níveis elevados de leptina no soro (embora sem significância estatística, provavelmente por grande variabilidade entre as amostras).

Nos resultados apresentados, a massa relativa dos testículos foi reduzida no grupo tratado com cafeína. Este achado está de acordo com um estudo recente em que os animais foram tratados com baixas e altas doses de cafeína na água potável (Dorostghoal *et al.*, 2012). Apesar da alteração da massa testicular em ambos os grupos tratados com altas e baixas dosagens de cafeína (26 e 45 mg/kg), outros tecidos reprodutivos, tais como epidídimo, vesículas seminais e próstata ventral foram alterados apenas nos animais tratados com doses elevadas de cafeína. A ingestão de cafeína em humanos é tida como baixa quando inferior a 150 mg/dia, moderada entre 150-300 mg/dia e alta quando maior que 300 mg/dia, ressaltando que mesmo doses moderadas levam a efeitos deletérios durante o período gestacional e em mulheres não gestantes reduz a taxa de fertilidade a metade (Loupis *et al.*, 1996). Mediante a classificação mencionada, a dose de cafeína administrada aos animais neste estudo (20 mg/dia) é considerada baixa.

A cafeína parece interferir na divisão celular levando a redução de células espermatogênicas (Ax *et al.*, 1976), e redução no diâmetro dos túbulos seminíferos (Dorostghoal *et al.*, 2012). A cafeína inibe significativamente a diferenciação dos túbulos seminíferos quando administrada durante a gestação (Pollard *et al.*, 1990). No entanto,

verificou-se que aos 13 dias de idade fragmentos de tecido testicular de fetos expostos a doses graduais de cafeína ou teobromina durante quatro dias *in vitro*, se diferenciaram normalmente, desenvolvendo cordões seminíferos constituídos de células de Sertoli e células germinativas. Em contraste, os fragmentos expostos a teofilina, outro metabólito da cafeína, não foram capazes de desenvolver túbulos seminíferos (Pollard *et al.*, 2001). Além disso, a atrofia dos túbulos seminíferos com pequenas áreas desiguais foi relatada em ratos albinos adultos que receberam doses elevadas de cafeína (Bachmann *et al.*, 1946).

A exposição de ratos adultos Wistar do sexo masculino a 30 mg/kg de cafeína diariamente, administrado via oral, durante 15 a 38 dias consecutivos, conduziram ao colapso do epitélio germinativo (Pollard e Smallshaw, 1988). A administração diária de 30 ou 60 mg/kg de cafeína em coelhos machos, durante quatro semanas consecutivas causou um decréscimo no tamanho dos túbulos seminíferos e inibiu a espermatogênese (Ezzat e el-Gohary, 1994). Atrofia testicular grave bilateral com azoospermia ou oligospermia foi observada em 85 a 100 por cento, em ratos machos de 4-6 semanas de idade, alimentados com cafeína ou teobromina por períodos longos (Ezzat e el-Gohary, 1994). No presente estudo, não avaliamos o epitélio germinativo, mas as alterações estruturais observadas no testículo dos animais tratados com cafeína durante a gestação (redução do diâmetro tubular, altura do epitélio, a área do lume) corroboram os achados anteriores, sugerindo o comprometimento da gônada.

A literatura sugere que a biodisponibilidade adequada da testosterona desempenha um papel importante na integridade estrutural e funcional dos órgãos reprodutivos (Mann, 1974) e a diminuição da massa destes órgãos pode ser devido à circulação inadequada do hormônio masculino. A diminuição do nível de testosterona também é um dos indicadores de toxicidade química no sistema reprodutivo (Yoshida *et al.*, 2002). No presente estudo, houve redução significativa no nível sérico de testosterona na prole do grupo tratado com cafeína.

Trabalho recente mostrou redução nos níveis séricos de testosterona nos animais submetidos a altas doses de cafeína durante a gestação e lactação (Dorostghoal *et al.*, 2012). Entretanto, outro estudo mostrou que mesmo a exposição de 30 mg/kg por dia de cafeína durante a gravidez inibiu significativamente a diferenciação do tecido intersticial e das células de Leydig, diminuiu o número de células de Leydig que exibe atividade da 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase, e também reduziu a biossíntese de testosterona nos testículos fetais na gestação (Pollard *et al.*, 1990). No entanto, verificou-se que aos 13 dias de idade fragmentos de testículos fetais expostos a doses graduais de cafeína ou teobromina durante quatro dias *in vitro* foi capaz de diferenciar células de Leydig funcionalmente ativas no

interstício recém-formado. Em contraste, fragmentos expostos à teofilina não foram capazes de desenvolver células de Leydig normais (Pollard *et al.*, 2001).

Além disso, tem sido demonstrado que os filhos de mães que ingerem 4-7 xícaras de café por dia apresentam baixos níveis de testosterona em comparação aos filhos de mães que bebem 0-3 xícaras por dia (Ramlau-Hansen *et al.*, 2008). Apesar das diferenças entre os estudos, os níveis séricos de testosterona parecem ter sido reduzidos pelo consumo de cafeína. Sabe-se que a leptina está envolvida na regulação da função reprodutiva (Keisler *et al.*, 1999), e diminui a expressão de vários elementos desencadeantes na via esteroidogênica resultando na inibição da esteroidogênese testicular (Tena-Sempere *et al.*, 2001). De fato, uma correlação inversa entre os níveis séricos de leptina e testosterona têm sido relatada (Luukkaa *et al.*, 1998). Neste estudo, demonstramos que os descendentes de animais submetidos a doses crônicas de cafeína durante a gestação apresentam uma diminuição na expressão de StAR (proteína reguladora da esteroidogênese) que é um fator limitante na via esteroidogênica que poderia facilmente explicar os baixos níveis de testosterona no soro.

Tem sido demonstrado que as catequinas de chá verde têm um efeito hipocolesterolêmico sendo capazes de inibir a absorção intestinal de colesterol (Muramatsu *et al.*, 1986; Ikeda *et al.*, 1992), o que também pode ter contribuído para a redução dos níveis de testosterona no soro uma vez que o colesterol é um importante substrato para a biossíntese de testosterona (Miller, 2002). Estes animais também apresentaram níveis elevados de leptina e um aumento na expressão OBR no testículo, possivelmente aumentando a resposta à leptina testicular levando a diminuição dos níveis de testosterona no soro. Outra possibilidade que deve ser considerada para explicar os baixos níveis de testosterona sérica no grupo tratado com cafeína é o fato de que a leptina é conhecida como um fator estimulante para a enzima aromatase (Catalano *et al.*, 2003; Alves-Pereira *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram que a expressão da proteína aromatase foi aumentada por tratamento com cafeína reforçando um efeito direto da leptina sobre o testículo. Este incremento na expressão da aromatase pode ter sido responsável por manter os níveis de estradiol no soro em níveis normais, uma vez que este hormônio é importante para a regulação do desenvolvimento e função testiculares (Sharpe, 1998).

A expressão de receptores de leptina no testículo está sob controle negativo das gonadotrofinas e leptina em si (Tena-Sempere *et al.*, 2001). No entanto, esta auto regulação parece ser tecido-específica uma vez que a leptina na próstata promove o aumento na expressão de OBR (Alves-Pereira *et al.*, 2012). Os resultados no presente estudo nos levam a acreditar que, apesar dos níveis de leptina sérica não terem apresentado diferença

estatisticamente significativa entre os grupos, seu padrão de elevação concomitante ao aumento na expressão do receptor da leptina sugere que o tratamento com cafeína possa alterar o processo de auto regulação negativa nos animais cujas mães receberam cafeína durante a gravidez. Poderíamos especular que o consumo de cafeína durante a gravidez programa o testículo aumentando a expressão de receptores de leptina.

Ambos os hormônios testosterona e estradiol são conhecidos por autorregular seus receptores (Blok *et al.*, 1992; Tena-Sempere *et al.*, 2000). Apesar de não ter nenhuma explicação razoável, parece que a cafeína não altera este processo; baixos níveis de testosterona podem ter sido responsáveis pela diminuição observada na expressão do receptor de androgênio enquanto que os receptores de estrogênio alfa e beta também não foram alterados em resposta aos níveis de estradiol sérico normais.

Infelizmente, não foi possível medir os níveis séricos de gonadotrofinas, mas a resposta dos testículos para eles foi avaliada através da análise da expressão proteica de LHR e FSHR. A prole do grupo tratado com cafeína apresentou um aumento na expressão de LHR e uma diminuição na expressão do FSHR, que também pode ser devido à programação do testículo pelo consumo de cafeína durante a gravidez. O aumento na expressão de LHR poderia ser uma resposta compensatória do órgão numa tentativa de aumentar a biossíntese de testosterona. Por outro lado, a resposta testicular ao FSH está relacionada com a espermatogênese e não com a biossíntese do hormônio. Tem sido relatado que o tratamento de cafeína durante a gestação e lactação diminui a densidade de espermatozoides, porcentagem de motilidade de espermatozoides morfológicamente normais e produção de esperma da prole na idade adulta (Dorostghoal *et al.*, 2012). Poderíamos sugerir que a redução na resposta testicular ao FSH pode ser responsável por essas alterações espermáticas observadas após o consumo de cafeína, conforme evidenciou estudo de Dorostghoal e colaboradores. Não se pode descartar que a contagem espermática pode ser também reduzida, embora não a tenhamos realizado neste estudo, sabemos que ocorre como resultado da diminuição nos níveis de testosterona e na resposta testicular ao hormônio, uma vez que, receptores de andrógenos são também reduzidos nestes animais do nosso estudo.

Um equilíbrio apropriado entre proliferação e apoptose é essencial para manter o crescimento normal das células espermáticas. Nossos resultados mostraram que, nos animais tratados com cafeína houve redução da proliferação e aumento da apoptose avaliados por expressão das proteínas PCNA e BAX, respectivamente. O que possivelmente poderia explicar dados anteriores de diminuição do número de espermatozoides em modelo experimental semelhante ao nosso (Dorostghoal *et al.*, 2012).

O fornecimento de sangue e nutrientes é outro fator importante para a espermatogênese. Neste trabalho nós mostramos que a expressão de VEGF é reduzida nos animais do grupo cafeína que está de acordo com os resultados prévios encontrados na literatura que mostraram redução na angiogênese pelo consumo de chá (Cao e Cao, 1999).

Fornecemos evidências de que a ingestão de cafeína pelas mães no período gestacional afetou a estrutura testicular da prole, levando a alterações na resposta testicular às gonadotrofinas, leptina e testosterona, nos níveis séricos de testosterona, e na expressão de várias proteínas importantes para a função testicular. Conseqüentemente, os resultados indicam que a gestação é um frágil período para a indução de efeitos adversos permanentes nos parâmetros reprodutivos da prole macho, que podem ser ocasionados pelo consumo de cafeína, ainda que em baixas doses e, portanto, seu consumo no período gestacional deve ser evitado ao máximo.

CONCLUSÃO

A indução de efeitos adversos durante o desenvolvimento fetal gera alterações permanentes nos parâmetros reprodutivos, ocasionados pelo consumo de cafeína. Em modelo animal, mostramos que a administração crônica de cafeína durante a gestação programa o testículo da prole adulta C57/BL6, através de perturbações na função testicular por alteração de parâmetros importantes para a maturidade reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- Aeschbacher HU, Milon H, Poot A, Wurzner HP. Effect of caffeine on rat offspring from treated dams. *Toxicol Lett* 1980; 7:71-77.
- Alves-Pereira JL, Colli S, Marques DS, Sampaio FJ, Ramos CF. Molecular and morphometric analysis of the rat ventral prostate injected with leptin. *Regul Pept* 2012; 176:6-12.
- Asadifar M, Yazdani M, Sadeghpour R, Bruno C, Green J, Nakamoto AT, Hosseini P, Fahami F, Gottschalk S, Nakamoto T. Combined effects of caffeine and malnutrition on the newborn rat's myocardium. *Food Chem Toxicol* 2005; 43:451-456.
- Ax RL, Collier RJ, Lodge JR. Effects of dietary caffeine on the testis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertil* 1976; 47:235-238.
- Bachmann G, Haldi J, et al. Reproductivity and growth of albino rats on a prolonged daily intake of caffeine. *J Nutr* 1946; 32:239-247.
- Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 1990; 301:1111.
- Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986; 1:1077-1081.
- Barone JJ, Roberts HR. Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol* 1996; 34:119-129.
- Bernstein GA, Carroll ME, Thuras PD, Cosgrove KP, Roth ME. Caffeine dependence in teenagers. *Drug Alcohol Depend* 2002; 66:1-6.
- Birkett NJ, Logan AG. Caffeine-containing beverages and the prevalence of hypertension. *J Hypertens Suppl* 1988; 6:S620-622.
- Bjorklund O, Kahlstrom J, Salmi P, Fredholm BB. Perinatal caffeine, acting on maternal adenosine A(1) receptors, causes long-lasting behavioral changes in mouse offspring. *PLoS ONE* 2008; 3:e3977.
- Blok LJ, Themmen AP, Peters AH, Trapman J, Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA. Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cell types. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 88:153-164.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- Brown RD, Thoren P, Steege A, Mrowka R, Sallstrom J, Skott O, Fredholm BB, Persson AE. Influence of the adenosine A1 receptor on blood pressure regulation and renin release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290:R1324-1329.
- Browne ML. Maternal exposure to caffeine and risk of congenital anomalies: a systematic review. *Epidemiology* 2006; 17:324-331.

Bruns RF LH, Pugsley TA. 1987. Adenosine Receptor Subtypes: Binding Studies. In: Eckehart Gerlach BFB, editor. Topics and Perspectives in Adenosine Research. New York: Springer-Verlag. p 59-73.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987; 79:1-6.

Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 1999; 398:381.

Catalano S, Marsico S, Giordano C, Mauro L, Rizza P, Panno ML, Ando S. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J Biol Chem* 2003; 278:28668-28676.

Cnattingius S, Ekbom A, Granath F, Rane A. Caffeine intake and the risk of spontaneous abortion. *Food Chem Toxicol* 2003; 41:1202; author reply 1203.

Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, Maronpot RR, Prater DA, Riley JH, Seaman WJ, Thake DC. Best practices guideline: toxicologic histopathology. *Toxicol Pathol* 2004; 32:126-131.

Dews P, Grice HC, Neims A, Wilson J, Wurtman R. Report of Fourth International Caffeine Workshop, Athens, 1982. *Food Chem Toxicol* 1984; 22:163-169.

Dorostghoal M, Erfani Majd N, Nooraei P. Maternal caffeine consumption has irreversible effects on reproductive parameters and fertility in male offspring rats. *Clin Exp Reprod Med* 2012; 39:144-152.

Eskenazi B. Caffeine--filtering the facts. *N Engl J Med* 1999; 341:1688-1689.

Eskenazi B, Stapleton AL, Kharrazi M, Chee WY. Associations between maternal decaffeinated and caffeinated coffee consumption and fetal growth and gestational duration. *Epidemiology* 1999; 10:242-249.

Ezzat AR, el-Gohary ZM. Hormonal and histological effects of chronic caffeine administration on the pituitary-gonadal and pituitary-adrenocortical axes in male rabbits. *Funct Dev Morphol* 1994; 4:45-50.

Fan M, Qin W, Mustafa SJ. Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:L1012-1019.

Fenster L, Eskenazi B, Windham GC, Swan SH. Caffeine consumption during pregnancy and fetal growth. *Am J Public Health* 1991; 81:458-461.

Fischbeck KL, Rasmussen KM. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr* 1987; 117:1967-1975.

Francavilla S, Santiemma V, Francavilla F, De Martino C, Santucci R, Fabbrini A. Ultrastructural changes in the seminiferous tubule wall and intertubular blood vessels in human cryptorchidism. *Arch Androl* 1979; 2:21-30.

Fredholm BB. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol* 1995; 76:93-101.

Fredholm BB. Notes on the history of caffeine use. *Handb Exp Pharmacol* 2011; 10.1007/978-3-642-13443-2_1:1-9.

Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999; 51:83-133.

Friedman L, Weinberger MA, Farber TM, Moreland FM, Peters EL, Gilmore CE, Khan MA. Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *J Environ Pathol Toxicol* 1979; 2:687-706.

Ghidini A. Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. *Obstet Gynecol Surv* 1996; 51:376-382.

Gilbert RM. Dietary caffeine and alcohol consumption by rats. *J Stud Alcohol* 1976; 37:11-18.

Goldstein A, Warren R. Passage of caffeine into human gonadal and fetal tissue. *Biochem Pharmacol* 1962; 11:166-168.

Greenwood DC, Alwan N, Boylan S, Cade JE, Charvill J, Chipps KC, Cooke MS, Dolby VA, Hay AW, Kassam S, Kirk SF, Konje JC, Potdar N, Shires S, Simpson N, Taub N, Thomas JD, Walker J, White KL, Wild CP. Caffeine intake during pregnancy, late miscarriage and stillbirth. *Eur J Epidemiol* 2010; 25:275-280.

Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol* 2005; 15:460-466.

Guarch R, Pesce C, Puras A, Lazaro J. A quantitative approach to the classification of hypospermatogenesis in testicular biopsies for infertility. *Hum Pathol* 1992; 23:1032-1037.

Hartley TR, Lovallo WR, Whitsett TL, Sung BH, Wilson MF. Caffeine and stress: implications for risk, assessment, and management of hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2001; 3:354-361.

He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res* 2003; 63:4396-4401.

Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* 2007; 72:R138-151.

- Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci* 2010; 75:R77-87.
- Hellmann W, Suzuki F, Ohkubo H, Nakanishi S, Ludwig G, Ganten D. Angiotensinogen gene expression in extrahepatic rat tissues: application of a solution hybridization assay. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 338:327-331.
- Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Hypoxia-inducible factors and the prevention of acute organ injury. *Crit Care* 2011; 15:209.
- Hughes RN, Beveridge IJ. Sex- and age-dependent effects of prenatal exposure to caffeine on open-field behavior, emergence latency and adrenal weights in rats. *Life Sci* 1990; 47:2075-2088.
- Hughes RN, Beveridge IJ. Behavioral effects of exposure to caffeine during gestation, lactation or both. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13:641-647.
- Hussein GM, Matsuda H, Nakamura S, Hamao M, Akiyama T, Tamura K, Yoshikawa M. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. *Biol Pharm Bull* 2011; 34:1849-1855.
- Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1127:141-146.
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rats. *Biol Reprod*. 1980 Jun;22(5):1233-43.
- Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Kalow W, Tang BK. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50:508-519.
- Katsuragi T, Sato C, Usune S, Ueno S, Segawa M, Migita K. Caffeine-inducible ATP release is mediated by Ca²⁺-signal transducing system from the endoplasmic reticulum to mitochondria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 378:93-101.
- Keisler DH, Daniel JA, Morrison CD. The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54:425-435.
- Kennedy DO, Wightman EL. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv Nutr (Bethesda)* 2011; 2:32-50.
- Kirkinen P, Jouppila P, Koivula A, Vuori J, Puukka M. The effect of caffeine on placental and fetal blood flow in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147:939-942.

Leon D, Albasanz JL, Ruiz MA, Fernandez M, Martin M. Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem* 2002; 82:625-634.

Liu YA, Ostlund E, Fried G. Endothelin-induced contractions in human placental blood vessels are enhanced in intrauterine growth retardation, and modulated by agents that regulate levels of intracellular calcium. *Acta Physiol Scand* 1995; 155:405-414.

Loupis A, Ryan J, Waite K, Pollard I. Preconceptual caffeine exposure increases glucose utilization and accelerates development in the preimplantation rat embryo. *J Matern Fetal Med* 1996; 5:321-327.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; 156:38-50; discussion 50-35.

Lucas A, Morley R. Does early nutrition in infants born before term programme later blood pressure? *BMJ* 1994; 309:304-308.

Luukkaa V, Pesonen U, Huhtaniemi I, Lehtonen A, Tilvis R, Tuomilehto J, Koulu M, Huupponen R. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3243-3246.

Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol* 2010; 611:211-225.

Mann T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fertil* 1974; 37:179-188.

Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Mechanisms linking suboptimal early nutrition and increased risk of type 2 diabetes and obesity. *J Nutr* 2010; 140:662-666.

Martin TR, Bracken MB. The association between low birth weight and caffeine consumption during pregnancy. *Am J Epidemiol* 1987; 126:813-821.

McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; 85:571-633.

Miller RC, Watson WJ, Hackney AC, Seeds JW. Acute maternal and fetal cardiovascular effects of caffeine ingestion. *Am J Perinatol* 1994; 11:132-136.

Miller WL. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 198:7-14.

Momoi N, Tinney JP, Liu LJ, Elshershari H, Hoffmann PJ, Ralphe JC, Keller BB, Tobita K. Modest maternal caffeine exposure affects developing embryonic cardiovascular function and growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H2248-2256.

Morrissey RE, Collins JJ, Lamb JcT, Manus AG, Gulati DK. Reproductive effects of theophylline in mice and rats. *Fundam Appl Toxicol* 1988; 10:525-536.

Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1986; 32:613-622.

Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* 1992; 17:139-170.

Osswald H, Schnermann J. Methylxanthines and the kidney. *Handb Exp Pharmacol* 2011; 10.1007/978-3-642-13443-2_15:391-412.

Parazzini F, Marchini M, Tozzi L, Mezzopane R, Fedele L. Risk factors for unexplained dyspermia in infertile men: a case-control study. *Arch Androl* 1993; 31:105-113.

Pollard I, Locquet O, Solvar A, Magre S. Effects of caffeine and its reactive metabolites theophylline and theobromine on the differentiating testis. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13:435-441.

Pollard I, Smallshaw J. Male mediated caffeine effects over two generations of rats. *J Dev Physiol* 1988; 10:271-281.

Pollard I, Williamson S, Magre S. Influence of caffeine administered during pregnancy on the early differentiation of fetal rat ovaries and testes. *J Dev Physiol* 1990; 13:59-65.

Porter GA, Jr., Rivkees SA. Ontogeny of humoral heart rate regulation in the embryonic mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281:R401-407.

Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Bonde JP, Olsen J, Bech BH. Semen quality according to prenatal coffee and present caffeine exposure: two decades of follow-up of a pregnancy cohort. *Hum Reprod* 2008; 23:2799-2805.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.

Rivkees SA. Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology* 1994; 135:2307-2313.

Rivkees SA, Wendler CC. Adverse and protective influences of adenosine on the newborn and embryo: implications for preterm white matter injury and embryo protection. *Pediatr Res* 2011; 69:271-278.

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

Santamaria L, Martin R, Nistal M, Paniagua R. The peritubular myoid cells in the testes from men with varicocele: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative study. *Histopathology* 1992; 21:423-433.

Santos IS, Victora CG, Huttly S, Carvalhal JB. Caffeine intake and low birth weight: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 1998; 147:620-627.

Sato A, Terata K, Miura H, Toyama K, Loberiza FR, Jr., Hatoum OA, Saito T, Sakuma I, Gutterman DD. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:H1633-1640.

Sawynok J. Methylxanthines and pain. *Handb Exp Pharmacol* 2011; 10.1007/978-3-642-13443-2_11:311-329.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007; 2007:cm8.

Serapiao-Moraes DF, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Faria TS. Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring. *Eur J Nutr* 2013; 10.1007/s00394-012-0490-6.

Sharpe RM. Local control of testicular function. *Q J Exp Physiol*. 1983 Jul;68(3):265-87.

Sharpe RM. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab* 1998; 9:371-377.

Shono T, Suita S. The effect of the excision of future scrotal skin on testicular descent in neonatal rats: a new experimental model of cryptorchidism. *J Pediatr Surg* 1995; 30:734-738.

Signorello LB, Nordmark A, Granath F, Blot WJ, McLaughlin JK, Anneren G, Lundgren S, Ekblom A, Rane A, Cnattingius S. Caffeine metabolism and the risk of spontaneous abortion of normal karyotype fetuses. *Obstet Gynecol* 2001; 98:1059-1066.

Soellner DE, Grandys T, Nunez JL. Chronic prenatal caffeine exposure impairs novel object recognition and radial arm maze behaviors in adult rats. *Behav Brain Res* 2009; 205:191-199.

Solinas M, Ferre S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 2002; 22:6321-6324.

Soyka LF. Effects of methylxanthines on the fetus. *Clin Perinatol* 1979; 6:37-51.

Srisuphan W, Bracken MB. Caffeine consumption during pregnancy and association with late spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:14-20.

Stein Z, Susser M. The Dutch famine, 1944-1945, and the reproductive process. I. Effects on six indices at birth. *Pediatr Res* 1975a; 9:70-76.

Stein Z, Susser M. The Dutch famine, 1944-1945, and the reproductive process. II. Interrelations of caloric rations and six indices at birth. *Pediatr Res* 1975b; 9:76-83.

Tena-Sempere M, Navarro J, Pinilla L, Gonzalez LC, Huhtaniemi I, Aguilar E. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor alpha and beta mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J Endocrinol* 2000; 165:345-357.

- Tena-Sempere M, Pinilla L, Zhang FP, Gonzalez LC, Huhtaniemi I, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E. Developmental and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Biol Reprod* 2001; 64:634-643.
- Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243:47-59.
- Vine MF, Setzer RW, Jr., Everson RB, Wyrobek AJ. Human sperm morphometry and smoking, caffeine, and alcohol consumption. *Reprod Toxicol* 1997; 11:179-184.
- Wardas J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. *Pol J Pharmacol* 2002; 54:313-326.
- Walsh P, Retik A, Staney T, Vaughan E, Wein A. *Campbell's Urology*. 8 ed. Philadelphia: Elsevier; 2002.
- Wendler CC, Busovsky-McNeal M, Ghatpande S, Kalinowski A, Russell KS, Rivkees SA. Embryonic caffeine exposure induces adverse effects in adulthood. *FASEB J* 2009; 23:1272-1278.
- West GL, Sobotka TJ, Brodie RE, Beier JM, O'Donnell MW, Jr. Postnatal neurobehavioral development in rats exposed in utero to caffeine. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1986; 8:29-43.
- Wilcox A, Weinberg C, Baird D. Caffeinated beverages and decreased fertility. *Lancet* 1988; 2:1453-1456.
- Wink CS, Rossowska MJ, Joseph F, Jr., Yazdani M, Nakamoto T. Effects of caffeine on heart mitochondria in newborn rats. *Biol Neonate* 1999; 76:114-119.
- Winkelmayer WC, Stampfer MJ, Willett WC, Curhan GC. Habitual caffeine intake and the risk of hypertension in women. *JAMA* 2005; 294:2330-2335.
- Yavasoglu A, Karaaslan MA, Uyanikgil Y, Sayim F, Ates U, Yavasoglu NU. Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 60:391-396.
- Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*. 1982 Dec;243(6):H941-7
- Yoshida M, Kitani T, Takenaka A, Kudoh K, Katsuda SI, Taya K, Kurokawa Y, Maekawa A. Lack of effects of oxolinic acid on spermatogenesis in young adult and aged Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:1815-1825.

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa

	<p>UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES</p>	
<p>COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS</p>		
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>Certificamos que o Protocolo nº CEUA/029/2012 sobre “Dose crônica de cafeína durante a gestação e alterações no sistema renina angiotensina da prole adulta”, sob a responsabilidade de Márcia Barbosa Águila, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 24/04/2012. Este certificado expira em 24/04/2016.</p>		
<p>Rio de Janeiro, 24 de Abril de 2012.</p>		
 <hr/> <p>Profa. Patricia Cristina Lisboa CEA/IBRAG/UERJ</p>	 <hr/> <p>Prof. Israel Felzenszwalb CEA/IBRAG/UERJ</p>	
<p>Prof. Patricia Cristina Lisboa da Silva Sub-Chefe do Deptº de Ciências Fisiológicas IBRAG/UERJ - Mat. 34765-8</p>		
<p>255</p>		
<p>☎ (21) 2587-6486 / 2587-8109 - Fax (21) 2284-9748 biologia@uerj.br</p>		

ANEXO B – Artigo aceito para publicação

----- Mensagem encaminhada -----

De: Saul Goldenberg <sgolden@terra.com.br>

Data: 30 de outubro de 2013 16:31

Assunto: RESPOSTA artigo ActaCirBras

O artigo **The testis of the mice C57/BL6 offspring in adulthood have alterations due to maternal caffeine consumption¹**

dos autores: Fernanda Silveira Cavalcante ^I Verônica Aiceles ^{II} Diana de Freitas Serapião Moraes ^{III} Jorge Luiz Alves-Pereira ^{IV} Tatiane Silva Faria ^V Cristiane da Fonte Ramos ^{VI}.

Está aceito para publicação e agendado para Janeiro de 2014, em fase de preparação.

Att. Prof. Saul Goldenberg

ANEXO C – Outras publicações no período

- [LEPTIN REGULATES GONADOTROPINS AND STEROID RECEPTORS IN THE RATS OVARY.](#)
 1. Silveira Cavalcante F, Aiceles V, da Fonte Ramos C.
Nutr Hosp. 2013 Enero-Febrero;28(1):164-168.
PMID: 23808445 [PubMed - as supplied by publisher] **Free Article**
[Related citations](#)

- [Leptin regulates proliferation and apoptosis in human prostate.](#)
 2. Leze E, Alves-Pereira JL, Colli S, Cavalcante FS, José Sampaio F, da Fonte Ramos C.
ScientificWorldJournal. 2012;2012:842301. doi: 10.1100/2012/842301. Epub 2012 May 2.
PMID: 22654635 [PubMed - indexed for MEDLINE] **Free PMC Article**
[Related citations](#)

- [Leptin role in the rat prostate ventral lobe.](#)
 3. Colli S, Silveira Cavalcante F, Peixoto Martins M, Sampaio FJ, da Fonte Ramos C.
Fertil Steril. 2011 Mar 15;95(4):1490-3.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.12.029. Epub 2011 Jan 22.
PMID: 21257164 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)