

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**NICOLLAS DOS SANTOS DA SILVA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE GELEIA REAL SOBRE  
PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E REPRODUTIVOS EM  
CAMUNDONGOS SWISS MACHOS EM DIFERENTES IDADES**

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2025**

**NICOLLAS DOS SANTOS DA SILVA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE GELEIA REAL SOBRE  
PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E REPRODUTIVOS EM  
CAMUNDONGOS SWISS MACHOS EM DIFERENTES IDADES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Moraes de Andrade  
Coorientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Sabine Langie

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S856e Silva, Nicollas dos Santos da.

Efeitos da suplementação de geleia real sobre parâmetros genéticos, bioquímicos e reprodutivos em camundongos *Swiss* machos em diferentes idades / Nicollas dos Santos da Silva. - 2025.

79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

Coorientação: Sabine Langie.

1. Geleia real - Efeito fisiológico. 2. Saúde do homem. 3. Fertilidade. 4. Análise do Sêmen. 5. Estresse oxidativo. 6. Genotoxicidade. I. Título.

CDD. 22. ed. 615.36




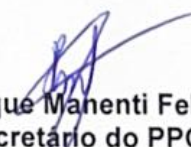
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 499

Com início às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 18 (dezoito) de fevereiro de 2026 (dois mil e vinte e seis), realizou-se, na Sala 227 do Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **NICOLLAS DOS SANTOS DA SILVA**, sob a orientação da **Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade** e coorientação da **Profa. Dra. Sabine Langie**, intitulada “EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE GELEIA REAL SOBRE PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E REPRODUTIVOS EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS EM DIFERENTES IDADES”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Eduarda Behenck Medeiros (Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino – IDOR) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 13h (treze) horas, dos quais eu, Henrique Manenti Felisberto, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 18 (dezoito) de fevereiro de 2026 (dois mil e vinte e seis).

  
Profa. Dra. Josiane Budni  
Coordenadora do PPGCS

  
Henrique Manenti Felisberto  
Secretário do PPGCS

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Toxicológica do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para sua realização.

## AGRADECIMENTOS

Só tenho a agradecer a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho durante esses anos e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, eu não seria eu sem conhecer vocês e acredito que vocês também não seriam vocês sem me conhecerem, em especial:

À minha família e especialmente aos meus pais, Angélico e Sônia, por me criarem com dedicação, respeito e amor. Agradeço por todos os ensinamentos que me fizeram ser quem eu sou hoje, mesmo que eu escreva 1000 páginas, ainda assim, não conseguiria demonstrar meu amor por vocês, pois no fim, meu amor por vocês é infinito!

Em especial à minha orientadora Dr<sup>a</sup> Vanessa Moraes de Andrade, obrigado por todos os direcionamentos e paciência ao longo desses anos, obrigado pela sua confiança, por me motivar e me acolher, você sempre foi e será minha grande inspiração.

À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup>. Sabine Langie, obrigado por fazer parte disso, embora a distância, foram grandes passos para a minha internacionalização!

À Adriani e Marina, que muitas vezes me ajudaram e me orientaram neste percurso, o conhecimento que compartilharam comigo foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Biomedicina Translacional, do Grupo de Pesquisa em Genética Toxicológica, agradeço pelas experiências que compartilhamos. Sem vocês nada disso seria possível. Em especial, agradeço aos alunos de Iniciação Científica, Otávio, Helen, Rafaela, Davi e Guilherme que participaram ativamente desse projeto com muita dedicação e sempre me apoiaram. Aos meus colegas da pós-graduação Isadora de Oliveira, Isadora Luciano e Roberta por toda ajuda e por tornarem os dias no laboratório mais divertidos, em especial ao Marcelo Morganti Sant'Anna, não me esquecerei de ter empatia quando lecionar, sou muito grato por compartilhar um pouco da sua experiência comigo.

Fica aqui também meu muito obrigado aos alunos do Laboratório de Doenças Neurometabólicas, ao Prof<sup>o</sup> Emílio, Carol, Micaela e à Bela. Foi muito bom ter vocês ao longo desses anos, as trocas literárias, os cafés e as críticas cinematográficas.

A todos os professores do PPGCS, que por meio das aulas compartilharam não somente conhecimento e pesquisa, mas também contribuíram para minha formação pessoal.

Aos animais que involuntariamente cederam à vida em prol do conhecimento científico, sem vocês nada disso seria possível.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) por toda infraestrutura disponibilizada, pela oportunidade de realizar minha graduação e mestrado.

À banca examinadora pelo tempo, leitura e colaboração para este trabalho que fizeram parte da minha formação.

Ao órgão de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste sonho, o meu muito obrigado!

“Seguir em frente é como tatear no escuro; a luz ao longe é frágil e incerta.  
Mas a luz interior — essa sim — se agita loucamente.  
Quero sempre me sentir desse jeito.”

Takehiko Inoue.

## RESUMO

A saúde masculina é marcada por uma menor procura por serviços médicos e maior exposição a fatores de risco, o que impacta negativamente o *healthspan* e a capacidade reprodutiva. O envelhecimento e o estilo de vida inadequado podem levar ao estresse oxidativo e à instabilidade genômica, comprometendo a espermatogênese através de danos acumulativos ao DNA e disfunções metabólicas. A complexidade do sistema reprodutor e sua interdependência com a saúde hepática tornam os gametas masculinos particularmente vulneráveis a falhas de reparo e oxidação, exigindo estratégias de intervenção eficazes. Nesse contexto, a geleia real destaca-se como um agente nutracêutico com potentes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras epigenéticas. Contudo, há uma lacuna no conhecimento sobre seus efeitos no consumo contínuo em organismos saudáveis. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade da suplementação com geleia real (150 mg/kg) em camundongos *Swiss* machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com o protocolo número N° 40/2023. Foram utilizados no total 100 camundongos divididos em três faixas etárias: jovens (3 meses), adultos-jovens (6 meses) e adultos-velhos (12 meses). O delineamento experimental teve duração total de 90 dias, organizado em três etapas independentes, cada uma com 30 dias de administração diária por gavagem de geleia real (150 mg/kg) ou água. Foram utilizados 20 animais em cada uma das duas primeiras etapas (jovens e adultos-jovens) e 60 animais na terceira etapa (adultos-velhos), distribuídos em seis grupos experimentais de 10 animais. No 31° dia de administração, em todas as etapas, foi coletado sangue periférico dos animais para realização do ensaio cometa. Logo após foram eutanasiados, para a dissecação dos fêmures à retirada da medula óssea para o teste de micronúcleos, à dissecação do fígado para realização dos testes referentes a estresse oxidativo e à dissecação dos epidídimos para a avaliação espermática. Nos resultados, observou-se que a suplementação de geleia real não promoveu efeitos genotóxicos e mutagênicos, não apresentando diferenças significativas no teste de micronúcleo, em nenhuma das faixas etárias, contudo o ensaio cometa apresentou uma diminuição da porcentagem de dano ao DNA em animais adultos-jovens no grupo geleia real quando comparado ao grupo controle, confirmando assim a segurança da geleia real nesse período. Em relação ao fígado, verificou-se modulação dependente da idade nos marcadores de estresse oxidativo, animais adultos-jovens e adultos-velhos apresentaram aumento de sulfidrilas no grupo geleia real, enquanto o conteúdo oxidado de 2',7'-diclorofluoresceína não demonstrou diferenças referente ao grupo controle em nenhuma idade. Já a enzima catalase demonstrou um aumento no grupo geleia real em adultos-jovens e adultos-velhos, porém a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase apresentaram aumento apenas em adultos-velhos quando comparadas ao grupo controle de mesma idade, assim a geleia real exerceu efeito modulador discreto nas enzimas hepáticas. Quando realizada a comparação entre as diferentes idades, as enzimas catalase, superóxido dismutase e o conteúdo oxidado de 2',7'-diclorofluoresceína nos adultos-velhos apresentaram diminuição em relação aos jovens e adultos-jovens, enquanto a glutatona peroxidase apresentou aumento nos adultos-velhos comparado as outras idades. Na avaliação espermática, a idade foi o principal determinante das alterações, com piora progressiva da motilidade, integridade de membrana e morfologia nos grupos mais velhos. A suplementação não induziu danos, porém não reverteu o declínio associado à idade. De forma geral, os dados demonstram que a geleia real é segura para consumo em diferentes idades, reforçando seu uso como agente nutracêutico voltado à manutenção da saúde e da estabilidade genômica, mas sem demonstrar efeito na saúde dos espermatozoides.

**Palavras-chave:** Fertilidade masculina, Qualidade espermática; Estresse oxidativo; Genotoxicidade; Ensaio cometa; Micronúcleo.

## ABSTRACT

Male health is characterized by lower utilization of medical services and greater exposure to risk factors, which negatively impacts both *healthspan* and reproductive capacity. Aging and inadequate lifestyle habits can lead to oxidative stress and genomic instability, compromising spermatogenesis through cumulative DNA damage and metabolic dysfunctions. The complexity of the reproductive system and its interdependence with liver health make male gametes particularly vulnerable to repair failures and oxidation, demanding effective intervention strategies. In this context, royal jelly stands out as a nutraceutical agent with potent antioxidant, anti-inflammatory, and epigenetic-modulating properties. However, a knowledge gap remains regarding its effects when consumed continuously by healthy organisms. Thus, the objective of this study was to evaluate the genotoxicity and mutagenicity of royal jelly supplementation (150 mg/kg) in young, young-adult, and older-adult male Swiss mice. This study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA), protocol No. 40/2023. A total of 100 mice were used, divided into three age groups: young (3 months), young-adult (6 months), and older-adult (12 months). The experimental design lasted 90 days, organized into three independent stages, each with 30 days of daily gavage administration of royal jelly (150 mg/kg) or water. Twenty animals were used in each of the first two stages (young and young-adult), and 60 animals in the third stage (older-adult), distributed into six experimental groups of ten animals each. On the 31st day of administration, in all stages, peripheral blood was collected for the comet assay. Immediately afterwards, animals were euthanized for femur dissection and bone marrow collection for the micronucleus test, liver dissection for oxidative stress assays, and epididymis dissection for sperm evaluation. The results showed that royal jelly supplementation did not promote genotoxic or mutagenic effects, with no significant differences in the micronucleus test at any age. However, the comet assay revealed a reduction in the percentage of DNA damage in young-adult animals in the royal jelly group when compared to the control group, thus confirming the safety of royal jelly at this stage. Regarding the liver, age-dependent modulation was observed in oxidative stress markers: young-adult and older-adult animals showed an increase in sulfhydryls in the royal jelly group, whereas oxidized 2',7'-dichlorofluorescein content showed no differences relative to the control group at any age. Catalase activity increased in the royal jelly groups of young-adult and older-adult animals, but superoxide dismutase and glutathione peroxidase increased only in older-adult animals compared with age-matched controls, indicating a modest modulatory effect of royal jelly on hepatic enzymes. When comparing across age groups, catalase, superoxide dismutase, and oxidized 2',7'-dichlorofluorescein levels decreased in older-adult animals relative to young and young-adult animals, while glutathione peroxidase increased in older-adults compared with the other ages. In sperm analysis, age was the main determinant of alterations, with progressive decline in motility, membrane integrity, and morphology in the older groups. Supplementation did not induce harm, but it also did not reverse age-related decline. Overall, the findings demonstrate that royal jelly is safe for consumption at different ages, supporting its use as a nutraceutical agent aimed at maintaining health and genomic stability, although no beneficial effects were observed on sperm health.

**Keywords:** Oxidative stress; Genotoxicity; Male fertility; Comet assay; Micronucleus; Sperm quality.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico da lacuna entre expectativa de vida e expectativa de vida saudável.....	18
Figura 2 – Desenho experimental de jovens.....	30
Figura 3 – Desenho experimental de adultos-jovens.....	31
Figura 4 – Desenho experimental de adultos-velhos.....	31
Figura 5 – Avaliação dos danos do DNA pelo parâmetro Tail intensity (%) em sangue de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).....	39
Figura 6 – Conteúdo de sulfidrilas no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).....	41
Figura 7 – Oxidação do 2',7'-diclorofluoresceína no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).....	42
Figura 8 – Atividade da enzima catalase no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).....	43
Figura 9 – Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).....	44
Figura 10 – Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg). .....	40
Tabela 2 – Peso testicular, concentração, integridade de membrana, motilidade e aglutinação em porcentagem de espermatozoides em cada categoria, de camundongos jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg). .....	46
Tabela 3 – Morfologia dos espermatozoides em camundongos jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg). .....	47
Tabela 4 – Peso testicular, concentração, integridade de membrana, motilidade e aglutinação em porcentagem de espermatozoides em cada categoria, de camundongos adultos-jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg). .....	48
Tabela 5 – Morfologia dos espermatozoides em camundongos adultos-jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg). .....	50
Tabela 6 – Peso testicular, concentração, integridade de membrana, motilidade e aglutinação em porcentagem de espermatozoides em cada categoria de camundongos adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg). .....	51
Tabela 7 – Morfologia dos espermatozoides em camundongos adultos-velhos suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg). .....	52
Tabela 8 – Comparações entre os animais jovens, adultos-jovens e adultos-velhos referente as análises genotóxicas, mutagênicas, de estresse oxidativo e avaliação espermática. ....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
CYP11A1	Citocromo P450 Família 11 Subfamília A Membro 1 (do inglês, Cytochrome P450 Family 11 Subfamily A Member 1)
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína (do inglês, <i>Dichlorofluorescein</i> )
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
ENC	Eritrócitos Normocromáticos
EPC	Eritrócitos Policromáticos
EPCMn	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante (do inglês, <i>Follicle-Stimulating Hormone</i> )
GPx	Glutathione Peroxidase (do inglês, <i>Glutathione Peroxidase</i> )
GR	Geleia real
H3K23Ac	Acetilação da lisina 23 da histona H3 (do inglês, Histone H3 Lysine 23 Acetylation)
H3K27me3	Trimetilação da lisina 27 da histona H3 (do inglês, Histone H3 Lysine 27 Trimethylation)
HHG	Eixo Hipotálamo–Hipófise–Gônadas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LH	Hormônio Luteinizante (do inglês, <i>Luteinizing Hormone</i> )
MMS	Metanossulfonato de metila (do inglês, <i>Methyl methanesulfonate</i> )
MRJP1	Proteína Principal da Geleia Real 1 (do inglês, <i>Major Royal Jelly Protein 1</i> )
MRJPs 1–9	Proteínas Principais da Geleia Real 1 a 9 (do inglês, <i>Major Royal Jelly Proteins 1 to 9</i> )
mtDNA	Mitochondrial DNA (do inglês, <i>Mitochondrial DNA</i> )
PNAISH	Política Nacional de Atenção Integral à Saúde do Homem
SOD	Superóxido Dismutase
StAR	Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese (do inglês, <i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i> )
SUS	Sistema Único de Saúde
10-HDA	Ácido 10-hidroxi-2-decenóico (do inglês, <i>10-Hydroxy-2-Decenoic Acid</i> )
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 A SAÚDE DO HOMEM E A INSTABILIDADE GENÔMICA .....	17
1.2 GELEIA REAL .....	22
1.3 GELEIA REAL E INSTABILIDADE GENÔMICA.....	24
1.4 FERTILIDADE E GELEIA REAL .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 ANIMAIS E CRITÉRIOS ÉTICOS .....	29
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.3 TRATAMENTO COM GELEIA REAL.....	32
3.4 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	32
<b>3.4.1 Ensaio Cometa Alcalino</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4.2 Teste de micronúcleos (MN)</b> .....	<b>33</b>
3.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	33
<b>3.5.1 Dosagem do conteúdo de sulfidrilas</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5.2 Medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5.3 Medida da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5.4 Catalase (CAT)</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5.5 Superóxido dismutase (SOD)</b> .....	<b>35</b>
3.6 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS.....	35
<b>3.6.1 Teste de integridade de membrana</b> .....	<b>36</b>
<b>3.6.2 Motilidade</b> .....	<b>36</b>
<b>3.6.3 Concentração</b> .....	<b>36</b>
<b>3.6.4 Morfologia</b> .....	<b>37</b>
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	39
<b>4.1.1 Ensaio cometa</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1.2 Teste de micronúcleos</b> .....	<b>40</b>
4.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	41
4.3 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA.....	45

4.5 COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS ENTRE IDADES DOS ANIMAIS: JOVENS, ADULTOS-JOVENS E ADULTOS-VELHOS .....	52
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A SAÚDE DO HOMEM E A INSTABILIDADE GENÔMICA

A saúde do homem é um campo de estudo crucial, que abrange não apenas a longevidade e a qualidade de vida, mas também a preservação da capacidade reprodutiva ao longo do tempo. Essa abordagem, no entanto, demanda uma compreensão integrada entre os determinantes biológicos, comportamentais e socioculturais que influenciam a vulnerabilidade masculina a diversos agravos. Observa-se que o perfil epidemiológico masculino no Brasil revela um conjunto expressivo de vulnerabilidades que justificam a necessidade de políticas públicas específicas (IBGE, 2020).

Dados do Ministério da Saúde (2023) indicam que os homens acessam menos os serviços de atenção básica, tendem a buscar cuidados apenas em estágios avançados de adoecimento e apresentam maior prevalência de fatores de risco evitáveis. A frequência de fumantes entre homens é de 11,7%, consideravelmente superior à observada nas mulheres (7,2%). O risco de morbidade e mortalidade prematura é intensificado pelo consumo abusivo de álcool (ingestão de cinco ou mais doses em uma única ocasião nos últimos 30 dias), reportado por 27,3% dos homens, quase o dobro da frequência feminina (15,2%). Estes hábitos se somam a padrões alimentares inadequados, com o homem apresentando maior frequência de excesso de peso ( $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), atingindo 63,4%, em comparação com 59,6% das mulheres. Ainda, a ingestão de cinco ou mais grupos de alimentos ultraprocessados é mais prevalente no público masculino (22,0% versus 14,1%).

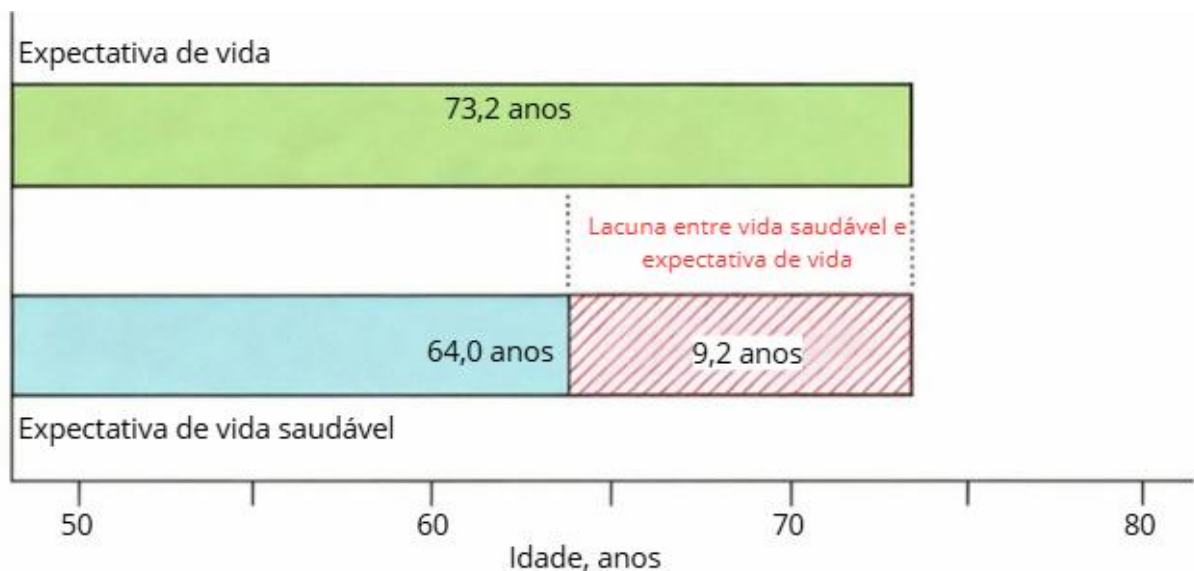
No contexto do Sistema Único de Saúde (SUS), a sub-representação masculina no uso dos serviços de saúde é evidente. Em 2022, apenas 28% dos atendimentos individuais na atenção primária foram destinados aos homens, e estima-se que cerca de um terço da população masculina entre 20 e 59 sequer esteja cadastrada na atenção primária a saúde (Ministério da Saúde, 2024). Essas disparidades persistem também em indicadores de consulta médica, conforme a Pesquisa Nacional de Saúde de 2019, apenas 66,6% dos homens declararam ter consultado um médico nos últimos 12 meses, contra cerca de 82% das mulheres (IBGE, 2021). Ademais, embora o SUS responda por mais da metade dos atendimentos ambulatoriais no país, sua utilização permanece assimétrica (Araújo et al., 2017).

Neste contexto, destaca-se a Política Nacional de Atenção Integral à Saúde do Homem (PNAISH), instituída em 2009, que busca melhorar as condições de saúde da população masculina entre 20 e 59 anos. A política visa reduzir a morbidade e a mortalidade

por meio do enfrentamento dos fatores de risco e vulnerabilidades, ampliando o acesso às ações e aos serviços de atenção integral à saúde, respeitando as diferentes expressões de masculinidades, a partir da perspectiva de gênero, que considera a masculinidade como construções socioculturais envolvidas nas relações de poder entre homens e mulheres mediante a atuação nos aspectos socioculturais, sob a perspectiva relacional de gênero.

Neste contexto, o termo *healthspan* tem ganhado destaque na literatura científica, sendo utilizado principalmente para definir o período da vida vivido com boa saúde, livre de doenças crônicas e incapacidades do envelhecimento (Kaeberlein, 2018; Masfiah et al., 2025). Embora seja um conceito relativamente novo, sua definição é de grande importância para orientar políticas e intervenções voltadas à promoção da expectativa de vida saudável (Masfiah et al., 2025). O termo surge na necessidade de preencher uma lacuna, entre expectativa de vida saudável e expectativa de vida total, uma diferença estimada em aproximadamente 9 anos, conforme ilustrado na Figura 1 (Garmany; Yamada; Terzic, 2021). Assim, embora o prolongamento da vida seja necessário, o principal objetivo das estratégias baseadas no *healthspan* é garantir melhores condições de saúde ao longo dos anos, priorizando a qualidade de vida em vez de apenas aumentar sua duração (Falshaw; Sagner; Siow, 2024).

Figura 1 – Gráfico da lacuna entre expectativa de vida e expectativa de vida saudável.



Fonte: Adaptado de Garmany, Yamada e Terzic (2021).

A manutenção de um *healthspan* prolongado, especialmente no organismo masculino, depende diretamente da integridade celular e da capacidade de resposta aos estressores biológicos (Liao et al., 2010). A instabilidade genômica, caracterizada pelo acúmulo progressivo de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), constitui um marcador fundamental

que compromete essa integridade (López-Otín et al., 2023a). Nos homens, a estabilidade do material genético é ameaçada por fatores como o declínio da eficiência dos mecanismos de reparo de DNA e pelo aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo, por sua vez, resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a defesa antioxidante, sendo um dos principais causadores do dano celular (Hemagirri; Sasidharan, 2022; Sharma; Sampath, 2019; Takalani et al., 2023).

A influência da idade é evidente quando se observam as diferenças na incidência de danos genéticos entre diferentes faixas etárias. Estudos demonstram que a frequência de danos ao material genético, como a fragmentação do DNA espermático, aumenta progressivamente com o avanço da idade paterna (Agudo-Rios et al., 2023). Indivíduos jovens tendem a apresentar mecanismos de defesa antioxidante mais eficientes e maior capacidade de reparo celular, enquanto indivíduos adultos mais velhos exibem um aumento significativo de mutações e fragmentação de DNA espermático, comprometendo a qualidade dos gametas (Agudo-Rios et al., 2023; Hamilton; Assumpção, 2020).

Essa tendência é reforçada pelos achados de Vaughan et al. (2020), em um estudo de coorte retrospectivo envolvendo 16.945 amostras de sêmen de homens avaliados por infertilidade. Os autores observaram um aumento significativo do índice de fragmentação do DNA, mensurado por citometria de fluxo, em todas as faixas etárias. Além disso, os níveis de adutos associados ao estresse oxidativo foram menores em indivíduos com menos de 30 anos, elevando-se progressivamente com o aumento da idade.

Considerando que a função testicular e a qualidade do esperma se deterioram com o avanço da idade, não surpreende que estudos apontem uma influência negativa da idade paterna sobre a fertilidade e a concepção natural, além de associarem o envelhecimento masculino a maiores atrasos para alcançar a gestação (Kasman; Del Giudice; Eisenberg, 2020). Isso reforça a necessidade de intervenções que envolvam tanto a oferta de informações, quanto estratégias preventivas (Dong et al., 2022; Łakoma; Kukharuk; Šliž, 2023).

A função reprodutiva em ambos os sexos é regulada por um sistema neuroendócrino, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), que regula a gametogênese e a esteroidogênese (Plunk; Richards, 2020). Assim, a integridade estrutural e funcional dos órgãos reprodutivos pode ser impactada não apenas por alterações decorrentes do envelhecimento, mas também por condições exógenas (Isola et al., 2024).

Nesse contexto, a saúde reprodutiva feminina e masculina desempenha um papel importante na programação metabólica, uma vez que alterações hormonais, nutricionais e epigenéticas presentes no período pré-concepcional podem influenciar diretamente a qualidade

dos gametas, a fecundação e o desenvolvimento inicial do embrião (Sánchez-Garrido; García-Galiano; Tena-Sempere, 2022). No sistema reprodutivo feminino, a fecundidade está intrinsecamente ligada à reserva ovariana e à qualidade dos oócitos. Os ovários, além de produzirem os gametas, são responsáveis pela secreção cíclica de hormônios esteroides, como o estrogênio e a progesterona, que preparam o útero para a implantação e sustentam a gestação (Bendsen et al., 2006; Isola et al., 2024). A idade materna avançada, fator central no adiamento da maternidade, constitui o principal preditor de declínio da fertilidade feminina. Isso ocorre devido à redução progressiva da quantidade e da qualidade dos folículos ovarianos, culminando em um aumento na incidência de aneuploidias e falhas de implantação (Wang et al., 2024).

Por sua vez, o sistema reprodutivo masculino depende da produção contínua de espermatozoides viáveis nos testículos, um processo conhecido como espermatogênese, também sob controle do eixo HHG (Dong et al., 2022). A qualidade seminal, avaliada por parâmetros como concentração, motilidade e morfologia espermática, é um indicador direto da capacidade reprodutiva masculina (Farahani et al., 2021; WHO, 2021). Fatores ambientais, estilo de vida e condições médicas podem comprometer a espermatogênese, contribuindo significativamente para a prevalência global da infertilidade (Farahani et al., 2021; Pintus; Ros-Santaella, 2021).

A manifestação de alterações metabólicas pode aparecer então, como diminuição da motilidade espermática, alteração dos componentes citoplasmáticos, modificações no material genético ou mesmo morte espermática, contribuindo para a infertilidade masculina (Takalani et al., 2023). De fato, o estresse oxidativo é um dos principais fatores que contribui para a infertilidade masculina, condição que afeta aproximadamente 15% dos casais em todo o mundo, sendo que os fatores atribuídos aos homens correspondem a quase 50% desses casos (Wang et al., 2025; WHO, 2023b).

Apesar disso, o cuidado masculino com a própria saúde ainda é frequentemente negligenciado. Este cenário está associado a estigmas culturais de masculinidade que associam a busca por auxílio médico à fraqueza, na falta de uma cultura de prevenção comparável à saúde feminina, e na priorização de responsabilidades externas em detrimento do autocuidado (Abdullahzadeh et al., 2025). Consequentemente, a detecção tardia de condições que afetam a espermatogênese, como varicocele, desequilíbrios hormonais ou o acúmulo de danos genéticos induzidos pelo estilo de vida, perpetua o ciclo de comprometimento da saúde reprodutiva e da estabilidade genômica masculina (Agarwal et al., 2021; Roudsari; Sharifi; Goudarzi, 2023).

Portanto, entender o processo de espermatogênese é essencial para o cuidado com a saúde reprodutiva masculina. A espermatogênese é um processo cíclico, complexo e

altamente organizado, que ocorre no interior dos túbulos seminíferos e é regulado pelas células de Sertoli (Bhattacharya; Dey; Banerjee, 2023). Este processo de diferenciação celular transforma espermatogônias diploides em espermatozoides haploides altamente especializados (Maroto et al., 2025). A duração total da espermatogênese varia significativamente entre as espécies, sendo de aproximadamente 74 dias em humanos e cerca de 35 dias em camundongos, o que exige um ciclo contínuo e eficiente para a produção de gametas viáveis (Cho; Easley, 2023; Maroto et al., 2025).

Os espermatozoides produzidos nos testículos são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, percorrem os ductos eferentes até chegarem ao epidídimo. Nesse estágio inicial, ainda não são funcionais e, por isso passam por um processo de maturação epididimária que envolve modificações morfológicas e bioquímicas essenciais que adquiram motilidade e capacidade de fertilizar o ovócito (Hoque et al., 2022). O epidídimo é dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda, cada uma desempenhando funções específicas ao longo desse processo. A maturação espermática ocorre através de interações dos espermatozoides com o microambiente epididimário, cuja composição varia ao longo do ducto conforme mudanças de osmolaridade, da proporção iônica, das reservas energéticas e no perfil proteico secretado (James et al., 2020; Koch et al., 2015). Essas interações modificam a membrana plasmática dos espermatozoides em relação à sua composição, aumentando ligações dissulfídicas e formando associações entre proteínas, algumas delas andrógeno-dependentes (James et al., 2020).

A cabeça do epidídimo é a região mais ativa metabolicamente, responsável por aproximadamente 70 a 80% da secreção proteica (Koch et al., 2015). No corpo e na cauda do epidídimo ocorre a remoção da gota citoplasmática dos espermatozoides e a eliminação de ERO devido a expressão de enzimas da família da glutathione peroxidase (GPx), além do transporte de água e eletrólitos (Cooper, 2011; Drevet, 2006). A aquisição da motilidade progressiva e da capacidade de reconhecimento do ovócito ocorre na cabeça e no corpo, enquanto a cauda é principalmente responsável pelo armazenamento e remoção dos espermatozoides anormais (Hoque et al., 2022; James et al., 2020; Koch et al., 2015).

Apesar de sua precisão biológica, a espermatogênese permanece suscetível a erros, especialmente durante a fase de intensa proliferação celular e as divisões meióticas, momentos cruciais nos quais a instabilidade genômica pode ser intensificada (Stavros et al., 2024). A replicação e o reparo de DNA são mecanismos essenciais em cada etapa desse processo, e qualquer falha nesses mecanismos pode resultar na formação de gametas com fragmentação de DNA ou aneuploidias, comprometendo tanto a fertilidade quanto a saúde da prole (Middelkamp et al., 2020). Mesmo após o processo testicular, os espermatozoides permanecem vulneráveis a

danos durante a maturação epididimária, período em que o microambiente regula a aquisição de motilidade, remodelamento proteico e eliminação de EROs por meio de enzimas como as glutationala peroxidases (Aitken; De Iuliis; McLachlan, 2009).

Entretanto, a reprodução não é o único sistema afetado pela instabilidade genômica e pelo estresse oxidativo. O fígado, órgão central na homeostase metabólica, detoxificação, biotransformação de xenobióticos e síntese de antioxidantes, desempenha papel fundamental na manutenção do *healthspan* masculino (Falshaw; Sagner; Siow, 2024). Alterações hepáticas decorrentes de estresse oxidativo, como esteatose, inflamação crônica ou disfunção mitocondrial, contribuem para o acúmulo sistêmico de EROs e metabólitos reativos, amplificando o dano ao DNA em diversos tecidos. Assim, o fígado e o sistema reprodutivo masculino configuram um eixo interdependente: disfunções hepáticas aumentam a carga oxidativa sistêmica, enquanto a vulnerabilidade dos espermatozoides à oxidação e às falhas de reparo amplifica a instabilidade genômica observada com o avançar da idade e com estilos de vida não saudáveis (Drevet, 2006; Grossmann et al., 2019).

Paradoxalmente, apesar da importância biológica destes processos e da crescente prevalência da infertilidade masculina, os cuidados de saúde masculinos permanecem historicamente negligenciados (Roudsari; Sharifi; Goudarzi, 2023). Essa negligência decorre de múltiplos fatores, incluindo estigmas culturais de masculinidade que associam a busca por auxílio médico à fragilidade, a ausência de uma cultura preventiva semelhante à observada na saúde feminina e na priorização de responsabilidades externas em detrimento do autocuidado (Abdullahzadeh et al., 2025).

Diante da vulnerabilidade do sistema reprodutivo masculino ao estresse oxidativo e à instabilidade genômica, bem como da lacuna existente em intervenções eficazes e acessíveis, cresce o interesse pela investigação de agentes nutracêuticos com potencial protetor. Entre os produtos naturais propostos, destaca-se a geleia real (GR), devido às suas reconhecidas propriedades terapêuticas.

## 1.2 GELEIA REAL

A GR é uma substância secretada pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas operárias, um composto único, rico e com um pH fortemente ácido (3,1-3,9) que desempenha um papel fundamental na nutrição das larvas e na diferenciação da rainha (El-Guendouz et al., 2020). Embora as abelhas rainhas e as operárias possuam o mesmo genoma, a alimentação

diferenciada com GR resulta em notáveis diferenças anatômicas, fisiológicas e comportamentais (Collazo et al., 2021; Kocot et al., 2018).

A GR é um líquido branco-amarelado e cremoso, utilizado como alimento especial para as larvas e rainhas nas colmeias. Todas as larvas consomem GR nos três primeiros dias de vida. A partir desse período, apenas aquelas destinadas a se tornarem rainhas continuam recebendo-a durante toda sua existência (Oršolić; Jazvinščak Jembrek, 2024). Essa diferença nutricional ocasiona mudanças na expressão genética, que acabam permitindo o desenvolvimento ovariano completo na rainha. Destacando sua capacidade de viver por até cinco anos, enquanto as operárias geralmente vivem cerca de 45 dias. Além disso, ela pode produzir diariamente ovos equivalentes ao seu peso (2.000–3.000 ovos) (Fratini et al., 2016).

A composição química consiste principalmente em água (50%–60%), proteína (18%), carboidratos (15%), lipídios (3%–6%) e outros biocompostos (Kanelis et al., 2015; Nainu et al., 2021). Alguns açúcares presentes na GR incluem frutose e glicose. Além disso, sacarose e outros oligossacarídeos como erlose, gentobiose, isomaltose, maltose, melezitose, rafinose e trealose estão presentes em concentrações muito pequenas (Nainu et al., 2021). No entanto, a composição exata da GR pode variar conforme a origem geográfica, a estação do ano, as condições regionais de alimentação das abelhas, os métodos de armazenamento e a diversidade genética entre as colônias de abelhas (Collazo et al., 2021).

Um estudo publicado por Bagameri et al. (2023) demonstrou que o consumo de GR possui efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e moduladores do sistema imunológico, o que pode contribuir para a melhora de condições relacionadas a processos inflamatórios crônicos. Além disso, os principais componentes bioativos, como lipídios, flavonoides, ácidos orgânicos e vitaminas, desempenham um papel fundamental na regulação das vias inflamatórias, ajudando a reduzir o estresse oxidativo e promovendo a proteção das células contra danos (Collazo et al., 2021; Nainu et al., 2021).

As proteínas são os elementos mais ativos e mais abundante na GR, destacando-se as proteínas principais da geleia real 1–9 (MRJPs 1–9) que representam 80% do total proteico e possuem funções diversas, incluindo a regulação do crescimento, a modulação do sistema imunológico, a participação em processos hormonais e de diferenciação celular (Ali; Kunugi, 2020; Kunugi; Mohammed Ali, 2019).

Kamakura et al. (2011) demonstraram que a proteína royalactina (MRJP1), de 57 kDa, promove o desenvolvimento de larvas em rainhas, aumentando o tamanho corporal e do ovário e reduzindo o tempo de desenvolvimento. As proteínas presentes na GR, especialmente a royalactina, desempenham um papel fundamental na diferenciação entre rainha e operária,

atuando como fatores morfogênicos que estimulam vias de sinalização específicas, como o receptor de fator de crescimento epidérmico, levando a mudanças fisiológicas e morfológicas que definem a casta (Collazo et al., 2021).

A GR e seus componentes bioativos exibem uma potente atividade antioxidante, atuando como sequestradores EROs (Botezan et al., 2023). Essa capacidade é fundamental para mitigar o estresse oxidativo. Adicionalmente, a GR possui propriedades anti-inflamatórias (Kocot et al., 2018), o que é relevante, visto que a inflamação crônica é um componente do envelhecimento que pode afetar negativamente a qualidade seminal (Isola et al., 2024).

Além das proteínas, o ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA), um ácido graxo exclusivo da GR tem sido amplamente estudado por suas propriedades bioativas (Cornara et al., 2017; Miyata; Sakai, 2018; Pasupuleti et al., 2017). Estudos sugerem que o 10-HDA (2-5%) pode atuar como um inibidor da histona desacetilase (HDAC), regulando a expressão gênica e influenciando a diferenciação das castas em abelhas melíferas (*Apis mellifera*) (Polsinelli; Yu, 2018).

A ligação mecanicista entre a GR e a saúde reprodutiva masculina tem sido explorada em diversos estudos. Abdelnour et al. (2020) demonstram que a suplementação de doses moderadas (100-200mg/kg) de GR aumentam a produção de testosterona e melhoram motilidade, viabilidade e integridade da membrana espermática em coelhos. Além disso, as evidências sugerem que a GR pode reduzir o dano ao DNA espermático, um fator associado a menores taxas de fertilização e maior incidência de aborto espontâneo, tendo sido observada em estudos realizados em camundongos (Gillespie et al., 2025).

Embora o mecanismo exato ainda esteja sob investigação, a GR emerge como uma promissora intervenção nutracêutica, capaz de atuar sobre fatores centrais que afetam o sistema reprodutivo masculino em diferentes idades, especialmente o estresse oxidativo e a instabilidade genômica (Ahmad et al., 2020). Apesar das evidências que apontam para sua capacidade de atenuar o estresse oxidativo e melhorar os parâmetros seminais, o mecanismo molecular exato pelo qual seus componentes bioativos modulam a instabilidade genômica em diferentes idades do sistema reprodutivo masculino ainda permanece como uma lacuna no conhecimento.

### 1.3 GELEIA REAL E INSTABILIDADE GENÔMICA

A integridade e a estabilidade do genoma são amplamente ameaçadas por agentes químicos, físicos e biológicos, além de fatores endógenos, como erros de replicação de DNA,

defeitos de segregação cromossômica, processos oxidativos e reações hidrolíticas espontâneas (Ferrucci et al., 2020; Lemoine, 2020; López-Otín et al., 2023b; Siametis; Niotis; Garinis, 2021). As fontes extrínsecas ou intrínsecas de danos incluem mutações pontuais, deleções, translocações, encurtamento de telômeros, quebras de fita simples e dupla, rearranjos cromossômicos e defeitos na arquitetura nuclear (López-Otín et al., 2023a). Exposições ambientais também podem promover mudanças epigenéticas ao afetar a regulação genética por meio de alteração na metilação de DNA e modificações de histonas (López-Otín et al., 2023a; Siametis; Niotis; Garinis, 2021).

Em um estudo recente em camundongos, a administração de GR induziu alterações significativas nas modificações de histonas em células epiteliais, incluindo o aumento de H3K27me3 e a diminuição de H3K23Ac em genes relacionados ao ciclo celular e à regulação metabólica (Kobayashi et al., 2024). Tais achados demonstram que a GR pode influenciar a expressão gênica em mamíferos através de vias epigenéticas, o que reforça a hipótese de que seus efeitos protetores na estabilidade genômica e na saúde reprodutiva podem ir além da simples neutralização de EROs (Polsinelli; Yu, 2018).

O epigenoma, composto por modificações como metilação do DNA e alterações em histonas, é dinâmico e sujeito a alterações ao longo da vida. Algumas dessas modificações são programadas, enquanto outras ocorrem de forma estocástica, podendo impactar funções biológicas (Cristofalo; Gerhard; Pignolo, 1994; De Magalhães, 2025). Evidências sugerem que o dano ao DNA é um dos principais impulsionadores de mudanças epigenéticas, uma vez que a resposta ao reparo pode alterar marcas epigenéticas e influenciar a estabilidade da cromatina (Schumacher et al., 2021; Siametis; Niotis; Garinis, 2021). O acúmulo de danos causados por EROs nas moléculas, especialmente no DNA mitocondrial (mtDNA), leva a uma disfunção mitocondrial progressiva (López-Otín et al., 2023a). Essa disfunção agrava o ciclo vicioso ao aumentar a produção de EROs e diminuir a eficiência energética, o que resulta em danos a componentes essenciais, como lipídios e proteínas (Hemagirri; Sasidharan, 2022). A geração desregulada de EROs contribui para a perda de homeostase celular e para o desenvolvimento de diversas patologias, como distúrbios neurodegenerativos e cardiovasculares, levando à deterioração das células e tecidos e consolidando o papel das mitocôndrias como um agente central na patogênese dessas condições. (Ferrucci et al., 2020; Hemagirri; Sasidharan, 2022; López-Otín et al., 2023a; Potukuchi et al., 2018).

Esses radicais livres podem danificar lipídios, proteínas e o DNA, comprometendo a integridade e o funcionamento celular ao longo do tempo (Hajam et al., 2022). Além disso, mutações somáticas derivadas de acúmulos de danos ao DNA contribuem para o

desencadeamento de uma instabilidade genômica (López-Otín et al., 2013b). O estresse oxidativo, resultante do desequilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante, emerge como um dos mecanismos cruciais e bem estabelecidos do envelhecimento celular (Luo et al., 2020). Este desequilíbrio leva à modificação oxidativa de biomoléculas, comprometendo a estrutura e função de membranas e organelas, tornando o organismo mais vulnerável a estressores e patógenos (Potukuchi et al., 2018).

Nesse contexto, Damiani et al. (2022) buscaram avaliar se a administração da GR poderia reduzir os danos ao DNA causados pelo agente alquilante metilmetanossulfonato (MMS) em sangue de camundongos *Swiss* albinos machos. Os animais receberam doses de 150 mg/kg, 300 mg/kg e 1000 mg/kg de GR, tanto no pré-tratamento quanto no pós-tratamento. Independentemente da dose utilizada, a GR não apresentou efeitos genotóxicos ou mutagênicos, mas quando administrada como pós-tratamento, reduziu significativamente os danos ao DNA induzidos pelo MMS no sangue. Ainda, no mesmo estudo foi demonstrado uma correlação negativa entre a dose administrada e os danos ao DNA, sugerindo que a GR foi protetiva.

Embora existam estudos demonstrando os efeitos da GR em condições patológicas ou após exposição a agentes genotóxicos, ainda se sabe pouco sobre sua atuação ao longo das diferentes fases da vida e sobre o impacto direto em parâmetros de integridade do material genético.

#### 1.4 FERTILIDADE E GELEIA REAL

A GR tem sido historicamente utilizada na medicina tradicional chinesa para promover a saúde e a longevidade, e seu potencial para melhorar a fertilidade masculina tem sido objeto de crescente interesse científico. A infertilidade masculina está frequentemente associada a parâmetros seminais comprometidos, como baixa concentração, motilidade reduzida e morfologia anormal dos espermatozoides, além da fragmentação do DNA espermático (WHO, 2021).

Estudos *in vivo* em modelos animais têm consistentemente demonstrado o efeito positivo da suplementação com GR sobre esses parâmetros. Em coelhos, por exemplo, a suplementação com doses moderadas de GR resultou em um aumento na produção de testosterona, um hormônio essencial para a espermatogênese, e uma melhora significativa na motilidade, viabilidade e integridade da membrana espermática (Abdelnour et al., 2020). Adicionalmente, a GR tem sido relacionada ao aprimoramento do eixo HHG, com aumento dos

níveis séricos de LH, FSH e testosterona, além da maior expressão de genes esteroidogênicos essenciais, como StAR e CYP11A1 (Bhattacharya; Dey; Banerjee, 2023; Iegaki et al., 2020).

Em um estudo, Gawish et al. (2016) demonstraram que, em ratos adultos com idades entre 3 a 4 meses, a administração de GR foi capaz de reduzir as alterações na forma e na contagem de espermatozoides induzidas pelo imunossupressor ciclosporina A. Além disso, a GR protegeu os espermatozoides contra danos induzidos pela droga, melhorando a morfologia e a integridade dos espermatozoides e diminuindo as taxas de alterações na cabeça e na cauda dos gametas.

Em outro estudo realizado em ratos diabéticos, um modelo de estresse oxidativo crônico, observou-se que a GR reduziu a deformidade espermática e diminuiu o dano ao DNA (Ghanbari et al., 2015). Assim, a literatura demonstra que a maior parte das investigações não avalia a GR apenas como suplemento nutricional, mas como um recurso terapêutico voltado à reparação de danos reprodutivos (Acar, 2021; Delkhoshe-Kasmaie et al., 2014; Miyata; Sakai, 2018). Essa tendência é evidente nos diversos modelos experimentais, nos quais a GR ou seus componentes são empregados para neutralizar efeitos de insultos externos, tais como exposição a metais tóxicos ou condições metabólicas desfavoráveis (Acar, 2021; Ahmed et al., 2014; Amirshahi; Najafi; Nejati, 2014; Delkhoshe-Kasmaie et al., 2014; Tohamy; Gad El-Karim; El-Sayed, 2019).

A maior parte das pesquisas já publicados avaliam predominantemente a GR como estratégia para reverter danos induzidos e, permanece pouco explorado se o consumo contínuo desse composto é capaz de influenciar os níveis basais de integridade genômica. Diante deste cenário, o objetivo deste estudo foi analisar a genotoxicidade e mutagenicidade da suplementação de geleia real em camundongos *Swiss* albinos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, com o intuito de ampliar a compreensão sobre o potencial protetor da geleia real na integridade do material genético e espermático em diferentes idades.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade da suplementação de GR em camundongos *Swiss* albinos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito da GR em nível de danos ao DNA em sangue de camundongos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos suplementados ou não com GR;
2. Analisar a atividade mutagênica em medula óssea de camundongos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos suplementados ou não com GR;
3. Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no fígado de camundongos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos suplementados ou não com GR;
4. Avaliar a qualidade espermática dos animais machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos suplementados ou não com GR;
5. Comparar as variáveis entre idades dos animais jovens, adultos-jovens e adultos-velhos suplementados ou não com a GR.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados um total de 100 camundongos *Swiss* machos (30 - 35g), sendo 20 com 3 meses de idade, 20 com 6 meses de idade e 60 com 12 meses de idade. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e alojados em caixas de polietileno, com comida e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada às 6h da manhã), com temperatura controlada de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com o protocolo número N° 40/2023 (ANEXO A), conforme Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008 da cidade de Criciúma – SC. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei Arouca n° 11.794/2008. Ainda, cuidados foram tomados de modo a evitar o mínimo de desconforto e sofrimento para os animais.

#### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O desenho experimental consistiu em 90 dias totais de experimento, sendo composto por três etapas. Inicialmente, na primeira etapa, foi administrada GR ou água por meio de gavagem (1 vez ao dia) em 20 animais jovens (20 machos com 3 meses de idade) por 30 dias. Na segunda etapa foi administrada a GR ou água por meio de gavagem (1 vez ao dia) em 20 animais jovens-adultos (20 machos com 6 meses de idade) por 30 dias. Já na terceira etapa, foi administrada GR ou água por meio de gavagem (1 vez ao dia) em 60 animais adultos-velhos (60 machos com 12 meses de idade) por 30 dias. A quantidade de animais por grupo garante melhor homogeneidade para posteriores análises, uma vez que para esses testes o número mínimo de animais por grupo é de 8 (Krishna; Hayashi, 2000; Singh et al., 1988). Devido ao longo período de administração e à idade avançada dos animais, tornou-se necessário utilizar um número maior de indivíduos na última etapa, uma vez que o risco de morte natural era mais elevado. Essa medida considerou a mortalidade associada ao processo de envelhecimento, conforme relatado em estudos prévios realizados com camundongos em modelos de envelhecimento (Damiani et al., 2017, 2020; Garcez, 2013; Mendonça, 2011).

Por se tratar de três idades diferentes, o tempo de experimento de cada idade ocorreu em momentos distintos, uma vez que os animais jovens e adultos-jovens atingiram a idade antes

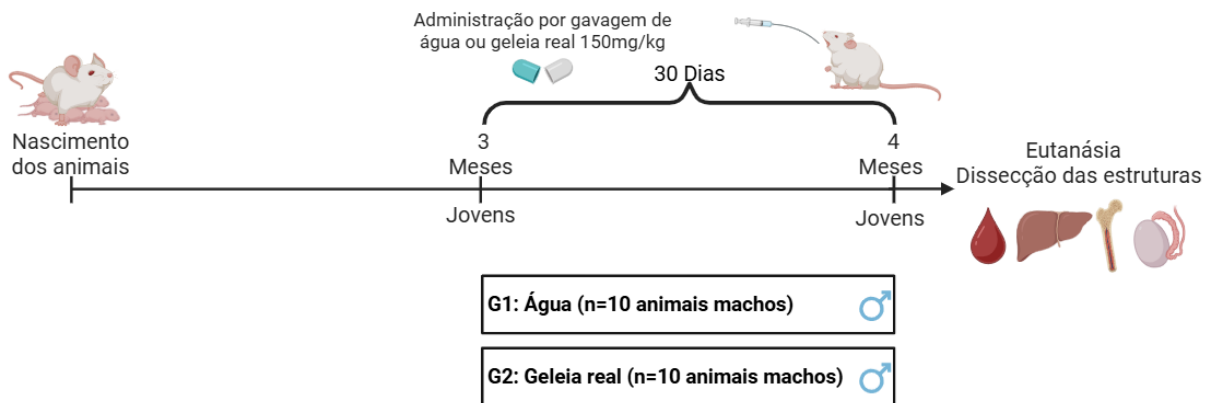
dos adultos-velhos. O desenho experimental está ilustrado na Figura 2 (jovens), Figura 3 (adultos-jovens) e Figura 4 (adultos-velhos) abaixo:

### 1ª Etapa: Jovens

Grupo 1 – Controle (água) jovens machos (n=10 animais): que receberam água (10 mL/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia;

Grupo 2 – Geleia real (150 mg/kg) jovens machos (n=10 animais): que receberam GR (150 mg/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia.

Figura 2 – Desenho experimental de jovens.



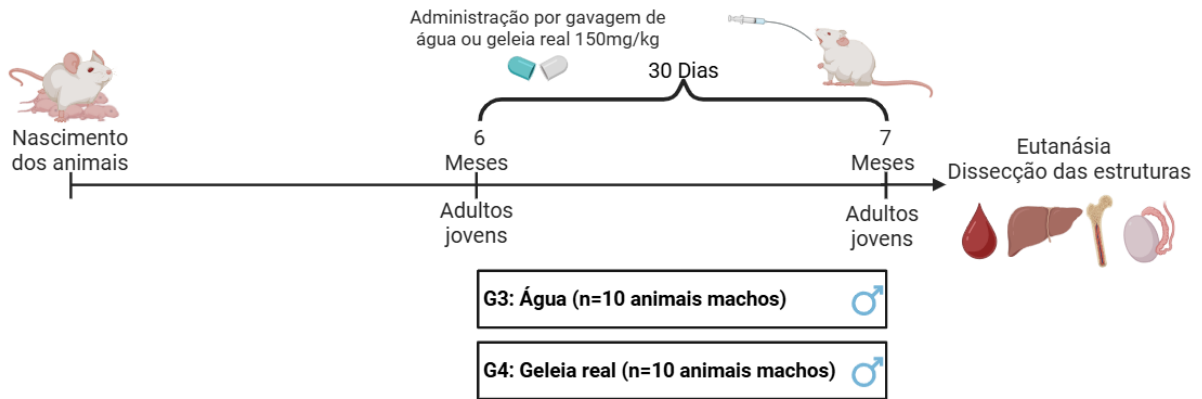
Grupo 1 – Controle (água) jovens machos (n=10 animais): que receberam água (10 mL/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia; Grupo 2 – Geleia real (150 mg/kg) jovens machos (n=10 animais): que receberam geleia real (150 mg/kg) via gavagem durante 30 dias, 1 vez ao dia. Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

### 2ª Etapa: Adultos-Jovens

Grupo 3 – Controle (água) adultos-jovens machos (n=10 animais): que receberam água (10 mL/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia;

Grupo 4 – Geleia real (150 mg/kg) adultos-jovens machos (n=10 animais): que receberam GR (150 mg/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia.

Figura 3 – Desenho experimental de adultos-jovens.



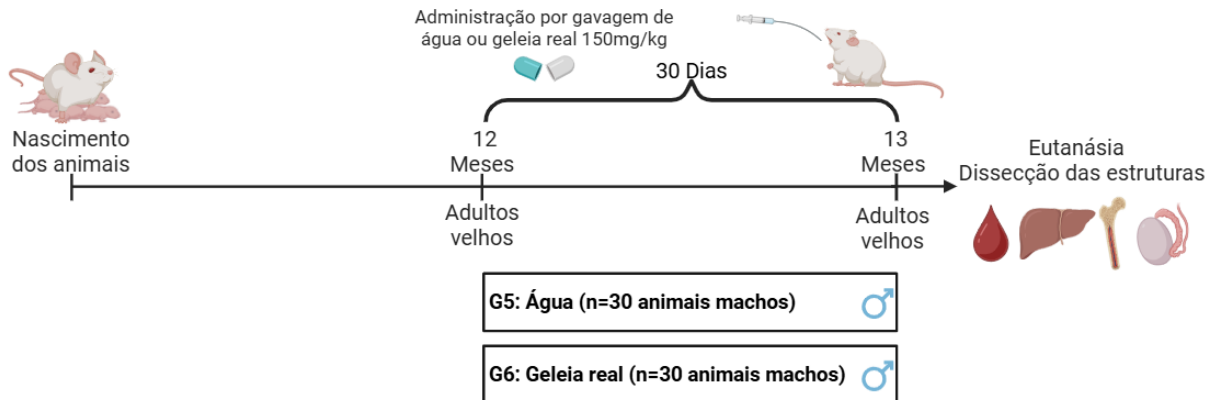
Grupo 3 – Controle (água) adultos jovens machos (n=10 animais): que receberam água (10 mL/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia; Grupo 4 – Geleia real (150 mg/kg) adultos jovens machos (n=10 animais): que receberam geleia real (150 mg/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia. Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

### 3ª Etapa: Adultos-velhos

Grupo 5 – Controle (água) adultos-velhos machos (n=30 animais): que receberam água (10 mL/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia;

Grupo 6 – Geleia real (150 mg/kg) adultos-velhos machos (n=30 animais): que receberam GR (150mg/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia.

Figura 4 – Desenho experimental de adultos-velhos.



Grupo 5 – Controle (água) adultos velhos machos (n=30 animais): que receberam água (10 mL/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia; Grupo 6 – Geleia real (150 mg/kg) adultos velhos machos (n=30 animais): que receberam geleia real (150 mg/kg), via gavagem, durante 30 dias, 1 vez ao dia. Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

No fim das etapas, sempre no 31º dia, foi realizado uma coleta de sangue da veia caudal, e após os animais foram eutanasiados, para a dissecação do fígado e epidídimo para ensaios bioquímicos, avaliação espermática e ainda, dissecação dos fêmures para retirada da medula óssea para o teste de micronúcleos. As amostras foram cuidadosamente processadas, aliquotadas e armazenadas para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

### 3.3 TRATAMENTO COM GELEIA REAL

O experimento foi conduzido através da administração da GR liofilizada em uma dose de 150 mg/kg ou água, via gavagem, uma vez ao dia, às 07:00 a.m., durante o período de 30 dias. A GR liofilizada foi diluída em água para que se possa atingir a dose da qual foi testada. A via de administração, a dosagem e o período de tratamento foram escolhidos de acordo com trabalhos já publicados na literatura (Damiani et al., 2022; Mohamed; Galal; Elewa, 2015). A GR foi obtida da empresa BeeWays® onde, uma cápsula de geleia contém 150 mg (33%) de GR liofilizada, que corresponde a 500mg de geleia fresca, 7,5% de 10HDA (ácido 10-hidroxi-2-decenóico), 66% de água e 34% de matéria seca.

### 3.4 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Para a realização do teste de genotoxicidade, foram utilizadas as seguintes amostras biológicas dos camundongos: sangue para o ensaio cometa e medula óssea obtida a partir do fêmur dos animais para o teste do micronúcleo, ao qual avalia a mutagenicidade.

#### 3.4.1 Ensaio Cometa Alcalino

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Collins et al. (2023). O sangue foi coletado e colocado em microtubos com EDTA e refrigerados, as células do sangue (alíquotas de 5  $\mu$ L ou alíquotas de 15  $\mu$ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (1%, w/v, 115  $\mu$ L) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%) em dois pontos (50  $\mu$ L em cada ponto), cobrindo posteriormente com duas lamínulas e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana. As lâminas foram incubadas em solução alcalina (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos para desdobramento do DNA, seguido de eletroforese a ~ 1V/cm por aproximadamente 20 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com Sybr Gold

(1:10.000) (Invitrogen, EUA) para posterior análise. Para avaliação dos danos, as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 200x utilizando o programa Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK), onde foram avaliadas 100 células/animal. As células foram classificadas de forma automática quanto às proporções do tail length (consiste na distância do meio do núcleo até o final da cauda em  $\mu\text{m}$ ) e tail moment (tail length x intensidade da fluorescência da cauda), através do Tail Intensity (%). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Ainda, todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

### **3.4.2 Teste de micronúcleos (MN)**

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Krishna; Hayashi, 2000; Mavournin et al., 1990). Para a realização do teste foi realizada a extração da medula óssea. Após a extração da medula óssea do fêmur dos animais, um esfregaço foi preparado diretamente na lâmina com uma gota de soro bovino fetal. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, secas e codificadas para análises às cegas. Como uma medida de toxicidade na medula óssea, a relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) foi analisada em 500 eritrócitos/animal. A incidência de micronúcleos (MN) foi observada em 4000 EPCs para cada animal (ou seja, 2000 a partir de cada uma das duas lâminas preparadas em duplicata), usando microscópio óptico de luz branca com ampliação de 1000x. O número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) individual foi utilizado como unidade experimental.

## **3.5 ESTRESSE OXIDATIVO**

Para a realização dos testes referentes ao estresse oxidativo, foram utilizadas amostras biológicas de fígado dos camundongos para a dosagem do conteúdo de sulfidrilas, medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína, medida da atividade das enzimas antioxidantes GPx, catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

### **3.5.1 Dosagem do conteúdo de sulfidrilas**

Foi determinado o conteúdo de sulfidrilas de acordo com método adaptado de Aksenov; Markesbery (2001), sendo o princípio do método baseado na redução do reagente de cor DTNB por tióis, gerando o ânion 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB<sup>2-</sup>). Dessa forma, após homogeneização, em uma placa de Elisa, foi pipetado 245 µL Tampão PBS com EDTA 1 M e 5 µL de DTNB no branco reagente. Para as amostras foi pipetado 22 µL de amostra, 223 µL de Tampão PBS com EDTA 1 M e 5 µL de DTNB, para a determinação do conteúdo de sulfidrilas. Após pipetar o DTNB, deixa-se a placa em temperatura ambiente, protegida da luz. Após os 15 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmols de TNB/mg de proteína.

### **3.5.2 Medida da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH)**

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com método de (LeBel; Ischiropoulos; Bondy (1992). Dessa forma, amostras foram previamente homogeneizadas, adicionando diacetato do DCF, sendo as alíquotas incubadas durante 30 minutos à 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCFH-DA, gerando a forma reduzida DCFH. Dessa forma, espécies reativas de oxigênio realizam a oxidação de dois elétrons de DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Tampo et al.,2003; Lee et al.,2009). A fluorescência foi determinada utilizando comprimentos de onda de 488nm (excitação) e 525 nm (emissão), sendo a curva de calibração realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM). Os resultados foram expressos como µmol de DCF/mg de proteína.

### **3.5.3 Medida da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Em cubeta de quartzo foram adicionados os seguintes reagentes: 600 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 1 mM, 10 µL de azida sódica 40 mM, 15 µL de glutathiona 100 mM, 15 µL glutathiona redutase 10 U / ml, 10 µL NADPH 10 mM e 10 µL de amostra (0,1 – 0,3 µg de proteína). Esta mistura foi incubada a 25 °C durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio, e após adicionados 50 µL de hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo a amostra por tampão fosfato. A queda da absorbância a 340 nm foi acompanhada durante 240 segundos e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção

do NADPH a 340 nm de  $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade da GPx foi calculada como U / mg de proteína (1U = 1  $\mu\text{mol}$  NADPH consumido / min).

### 3.5.4 Catalase (CAT)

Foi determinada a atividade desta enzima através do método de Aebi, 1984. Em 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados 10  $\mu\text{l}$  de Triton 0,1 % seguido de agitação, esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v). Foram pipetados 600  $\mu\text{l}$  deste meio em cubeta de quartzo, e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição de 25  $\mu\text{l}$  de amostra e realizada a leitura da queda da absorbância do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em espectrofotômetro a 240 nm, à temperatura ambiente ( $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ ), durante 100 segundos. Para o cálculo da CAT foi utilizado o coeficiente de extinção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $43,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados da atividade da CAT foram expressos em U / mg proteína (1U = 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido / min).

### 3.5.5 Superóxido dismutase (SOD)

Foram homogenizadas as amostras na proporção 1:10, em tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM pH 7,4. Para serem centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , foi armazenado o sobrenadante. Em uma placa de Elisa, pipeta-se 190  $\mu\text{L}$  de tampão glicina e 5  $\mu\text{L}$  de catalase no branco; 5  $\mu\text{L}$  de amostra, 185  $\mu\text{L}$  de tampão glicina e 5  $\mu\text{L}$  de catalase para a primeira amostra; 10  $\mu\text{L}$  de amostra, 180  $\mu\text{L}$  de tampão glicina e 5  $\mu\text{L}$  de catalase para a segunda amostra; 15  $\mu\text{L}$  de amostra, 175  $\mu\text{L}$  de tampão glicina e 5  $\mu\text{L}$  de catalase para a terceira amostra, sendo assim, realizada uma leitura em triplicada de cada amostra. Em seguida foi realizado a leitura pontual em espectrofotômetro a 480 nm. Após isso foi pipetado 5  $\mu\text{L}$  de adrenalina em todos os poços. Posteriormente, realizado uma nova leitura em espectrofotômetro a 412 nm durante 20 minutos, com leitura de 40 em 40 segundos. A atividade da enzima expressa foi expressa em U/mg de proteína (unidade de atividade da SOD por mg de proteína) (Bannister; Calabrese, 1987).

## 3.6 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

Os espermatozoides foram obtidos através da dissecção dos epidídimos e diluídos em microtubos contendo 500 µL de solução de 1% BSA diluído em PBS. Todas as análises foram realizadas em acordo com um protocolo previamente padronizado e avaliados em microscópio óptico, no aumento de 400x (Vieira et al., 2024).

### **3.6.1 Teste de integridade de membrana**

O teste de integridade de membrana foi realizado a partir da adição de 5 µL de eosina (0,5% de eosina Y dissolvida em 0,9% de solução salina de NaCl) em 5 µL da suspensão espermática sobre lâmina de vidro a qual foi recoberta com uma lamínula 22 mm x 22 mm. Os espermatozoides corados foram considerados com a membrana plasmática danificada ou muito permeável, enquanto os não corados foram contados como íntegros. Foram avaliados no total 200 espermatozoides e obtida a porcentagem correspondente à cada classificação (Lin et al., 1998; Santos et al., 2020).

### **3.6.2 Motilidade**

A motilidade foi avaliada usando 10 µL da amostra espermática e foram classificados como progressivos, não progressivos ou imóveis. Caso apresente aglutinação, foram classificados como isolada, moderada, alta ou bruta. Foram avaliados 200 espermatozoides e obtida a porcentagem correspondente à cada classificação (Vieira et al., 2024).

### **3.6.3 Concentração**

A concentração foi calculada utilizando 10 µL da suspensão de espermatozoides imobilizados com 1 µL de Glutaraldeído, e avaliada no grid central da câmara de Neubauer 4x4, em que pelo menos 200 espermatozoides foram contados em colunas completas. A concentração foi obtida através da seguinte expressão:

$$C = (N/n) \times (1/25) \times FD \quad (1)$$

Em que N representa o número total de espermatozoides contados, n o número de colunas avaliadas multiplicado por 1/25 e pelo fator de diluição (FD; no caso de 1:50, FD=50) (Vieira et al., 2024; WHO, 2021).

### 3.6.4 Morfologia

A morfologia foi analisada através do esfregaço de espermatozoides, fixado em álcool 95% por 15 minutos e corado com 17 gotas de Giemsa adicionadas por gotejamento, logo após foi adicionado 5 mL de água destilada, as lâminas ficaram por 20 minutos com a solução, após isso foram lavadas com água destilada e deixada secar. Os espermatozoides foram classificados como normais e anormais, sendo categorizados os defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda. Assim, os defeitos de cabeça incluem: sem gancho, banana-like, mais fino, amorfo, macrocéfalo, duas cabeças ou sem cabeça; os defeitos de peça intermediária: inserção irregular, mais grossa, menor ou somente a peça; e por fim, os defeitos de cauda contemplam dobrados, enrolados e duas caudas (Lingappa et al., 2015; Ruthrakumar et al., 2024; Vieira et al., 2024).

## 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inicialmente avaliados quanto à sua distribuição de normalidade utilizando o Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância por meio do Teste de Levene. Para a comparação entre dois grupos, quando os dados apresentaram distribuição normal, foi aplicado o Teste *T de Student* para amostras independentes. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o Teste U de *Mann-Whitney*.

Para as avaliações genéticas e bioquímicas, a diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando o valor de F foi significativo, comparações post hoc foram realizadas pelo Teste de Tukey. Para comparar as diferentes idade e tratamentos, utilizou-se ANOVA duas vias, seguido de *post hoc de Bonferroni*. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 9.0*.

Para as avaliações espermáticas, a escolha do teste estatístico seguiu a natureza dos dados, para os parâmetros contínuos, como peso testicular e concentração espermática, foi aplicado o Teste *T de Student* para amostras independentes. Para os dados de morfologia espermática (defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda), que não apresentaram distribuição

normal, foi utilizado o Teste U de *Mann-Whitney* para amostras independentes, utilizando o software *GraphPad Prism 9.0*.

Para a avaliação espermática categórica (integridade de membrana, motilidade e aglutinação), foi aplicado o Teste Qui-quadrado de Pearson. Nos casos em que o teste Qui-quadrado indicou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), foi realizada uma análise post-hoc para identificar as categorias responsáveis pela diferença no pacote estatístico IBM SPSS versão 21.

Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p$  foi inferior a 0,05. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), conforme apropriado.

## 4. RESULTADOS

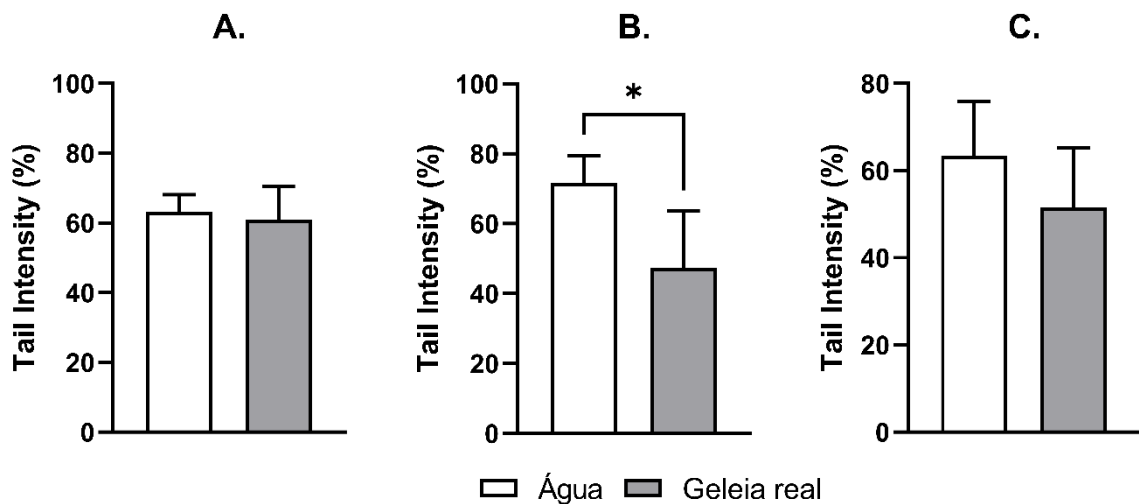
### 4.1 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

#### 4.1.1 Ensaio cometa

Os resultados do ensaio cometa realizado em sangue periférico para avaliar o nível de danos no DNA através do parâmetro *Tail Intensity* (%), indicaram que o consumo de GR (150 mg/kg) não causou genotoxicidade nos animais jovens (3 meses) e nos adultos-velhos (12 meses) (Figura 5, A e C respectivamente). Os níveis de danos ao DNA foram semelhantes entre os grupos suplementados com GR e o grupo controle não apresentando diferenças estatisticamente significativas.

Entretanto, nos adultos-jovens (6 meses), a suplementação com GR demonstrou um efeito protetor (Figura 5B). O grupo suplementado com GR apresentou uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos danos ao DNA em comparação com o grupo controle. Este achado sugere que, nesta fase específica da vida dos animais, a GR exerceu uma atividade antigenotóxica.

Figura 5 – Avaliação dos danos do DNA pelo parâmetro *Tail intensity* (%) em sangue de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).



Danos em DNA avaliados através do parâmetro *Tail Intensity* (%), em sangue periférico de camundongos Swiss machos jovens, com 3 meses de idade (A), adultos-jovens, com 6 meses de idade (B) e adultos-velhos, com 12 meses de idade (C). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=6 animais por grupo). Asteriscos denotam significância estatística ( $*p < 0,05$ ). Fonte: Do Autor, 2025.

#### 4.1.2 Teste de micronúcleos

O teste de micronúcleos avaliou se a suplementação de GR apresenta efeito mutagênico nos camundongos. A Tabela 1 apresenta os resultados do grupo controle tratado com água (10 mL/kg) e grupo teste, tratado com GR (150mg/kg), nas diferentes idades: jovens (3 meses), adultos-jovens (6 meses) e adultos-velhos (12 meses).

Tabela 1 – Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) observados nas amostras de medula óssea de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).

<b>Tratamento</b>	<b>EPCMn</b>	<b>EPC/ENC</b>
<b>Jovens</b>		
Controle	0,00 ± 0,00	0,53 ± 0,02
Geleia real	0,70 ± 1,06	0,52 ± 0,04
<b>Adultos-jovens</b>		
Controle	0,83 ± 0,98	0,51 ± 0,03
Geleia real	0,42 ± 0,53	0,53 ± 0,03
<b>Adultos-velhos</b>		
Controle	0,57 ± 0,78	0,51 ± 0,01
Geleia real	0,62 ± 0,74	0,51 ± 0,02

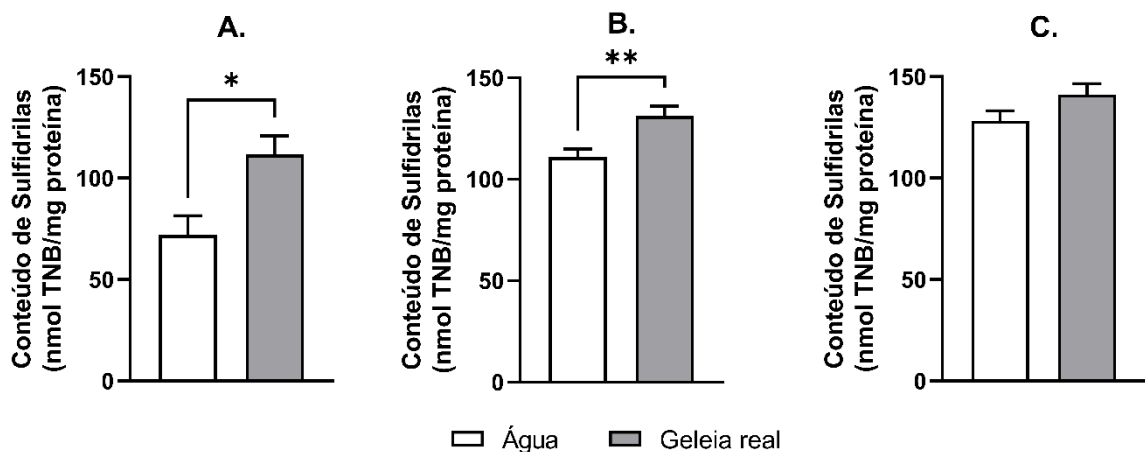
Foram analisadas 4000 células por amostra e estão demonstradas na tabela como média ± desvio padrão da média (n = 10 animais por grupo). Os dados foram analisados com Mann Whitney ( $p < 0.05$ ). EPC: eritrócitos policromáticos. ENC: eritrócitos normocromáticos. Fonte: Do Autor, 2025.

Os resultados do teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos demonstraram que não houve diferença significativa na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMn) entre os grupos suplementados com geleia real e os grupos controle na mesma etapa, em todas as três idades do estudo. Sugerindo que a suplementação de GR, na dose administrada e durante 30 dias, não induz efeito mutagênico. Não houve alteração na relação EPC/ENC, indicando que o tratamento não foi citotóxico.

## 4.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O efeito da suplementação com GR sobre os níveis de grupamentos sulfidrila no tecido hepático em três idades distintas também foram observados, e os resultados estão demonstrados na Figura 6. Nos animais jovens (Fig 6A) e nos adultos-jovens (Fig 6B), os grupos que receberam GR exibiram um conteúdo de sulfidrilas significativamente maior em comparação aos seus respectivos grupos controle (tratados com água), com valores de  $p = 0,010$  e  $p = 0,002$ , respectivamente. Contudo, nos animais adultos-velhos (Fig 6C), a diferença observada entre os grupos não apresentou significância estatística.

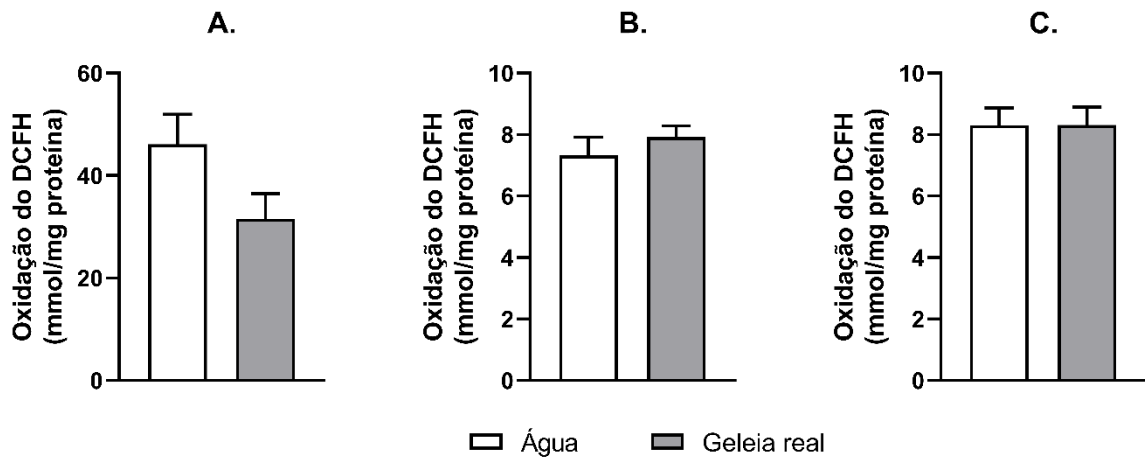
Figura 6 – Conteúdo de sulfidrilas no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).



Conteúdo de sulfidrilas no fígado de camundongos machos. Os gráficos comparam o grupo controle (água) com o grupo tratado (geleia real) em camundongos *Swiss* machos jovens, com 3 meses de idade (A), adultos-jovens, com 6 meses de idade (B) e adultos-velhos, com 12 meses de idade (C). Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 10$ ). As diferenças foram analisadas pelo teste t de Student (dados paramétricos) ou pelo teste U de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Asteriscos denotam significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Fonte: Do autor, 2025.

Na Figura 7, pode-se observar que os níveis da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) foram estatisticamente semelhantes entre os grupos suplementado com GR e os grupos controle em todas as diferentes idades.

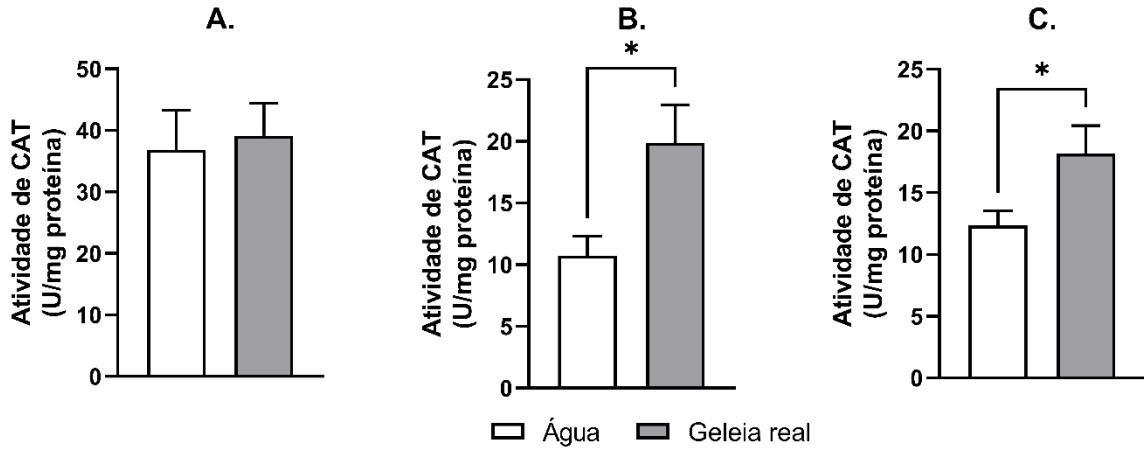
Figura 7 – Oxidação do 2',7'-diclorofluoresceína no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).



Nível de oxidação do 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) no fígado de camundongos machos. Os gráficos comparam o grupo controle (água) com o grupo tratado (geleia real) em camundongos Swiss machos jovens, com 3 meses de idade (A), adultos-jovens, com 6 meses de idade (B) e adultos-velhos, com 12 meses de idade (C). Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 10$ ). As diferenças foram analisadas pelo teste t de Student (dados paramétricos) ou pelo teste U de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Fonte: Do autor, 2025.

Conforme observado na Figura 8, a suplementação com GR não alterou significativamente a atividade da enzima catalase nos animais jovens (Fig 8A), quando comparado ao grupo controle. No entanto, nos animais adultos-jovens (Fig 8B) e nos animais adultos-velhos (Fig 8C), o grupo suplementado com GR apresentou um aumento estatisticamente significativo na atividade desta enzima ( $p < 0,05$ ).

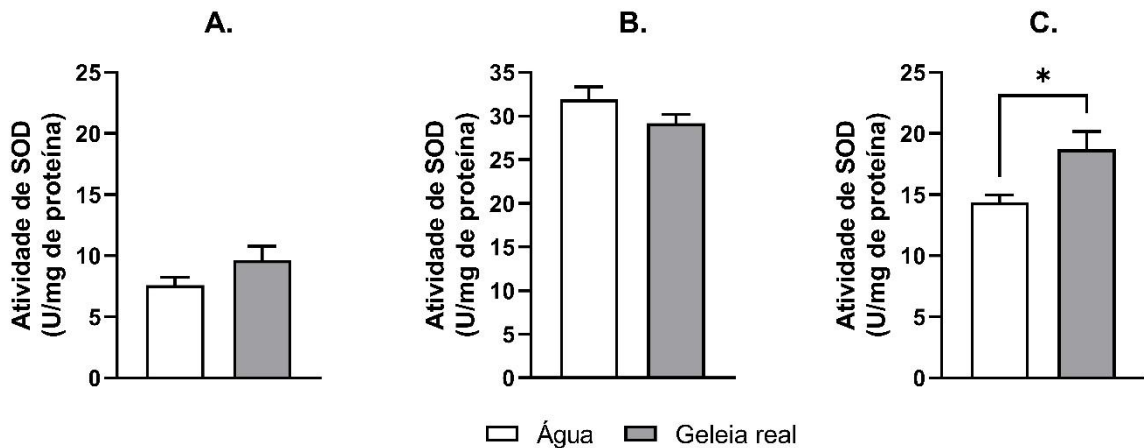
Figura 8 – Atividade da enzima catalase no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).



Atividade da enzima Catalase (CAT) no fígado de camundongos machos. Os gráficos comparam o grupo controle (água) com o grupo tratado (geleia real) em camundongos Swiss machos jovens, com 3 meses de idade (A), adultos-jovens, com 6 meses de idade (B) e adultos-velhos, com 12 meses de idade (C). A atividade enzimática é expressa em (U/mg proteína) e os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 10$ ). As diferenças foram analisadas pelo teste t de Student (dados paramétricos) ou U de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Asteriscos denotam significância estatística ( $*p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Fonte: Do autor, 2025.

Na Figura 9 estão demonstrados os resultados da atividade da enzima SOD. Podemos observar que a suplementação com GR não alterou significativamente a atividade da SOD nos animais jovens (Fig 9A) e adultos-jovens (Fig 9B), quando comparado ao grupo controle. No entanto, nos animais adultos-velhos (Fig 9C), o grupo suplementado com GR apresentou um aumento estatisticamente significativo na atividade da enzima ( $p < 0,05$ ).

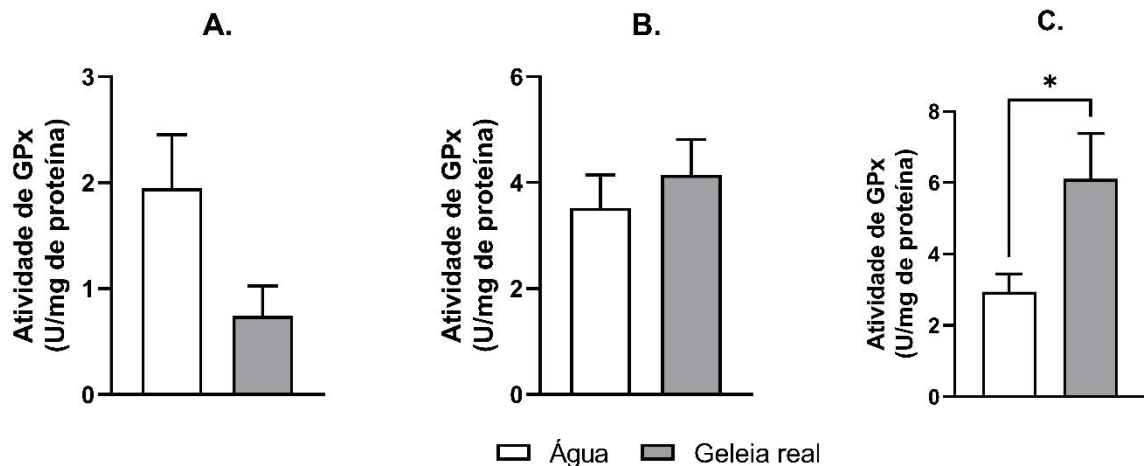
Figura 9 – Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).



Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) no fígado de camundongos machos. Os gráficos comparam o grupo controle (água) com o grupo tratado (geleia real) em camundongos Swiss machos jovens, com 3 meses de idade (A), adultos-jovens, com 6 meses de idade (B) e adultos-velhos, com 12 meses de idade (C). A atividade enzimática é expressa em (U/mg proteína) e os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 10$ ). As diferenças foram analisadas pelo teste t de Student (dados paramétricos) ou U de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Asteriscos denotam significância estatística ( $*p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Fonte: Do autor, 2025.

Na Figura 10, a suplementação com GR não alterou significativamente a atividade da enzima GPx nos animais jovens (Fig 10A) e adultos-jovens (Fig 10B), quando comparado ao grupo controle. No entanto, nos animais adultos-velhos (Fig 10C), o grupo suplementado com GR apresentou um aumento estatisticamente significativo na atividade da enzima ( $p < 0,05$ ).

Figura 10 – Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx) no fígado de camundongos machos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).



Atividade da enzima Glutaciona peroxidase (GPx) no fígado de camundongos machos. Os gráficos comparam o grupo controle (água) com o grupo tratado (geleia real) em camundongos Swiss machos jovens, com 3 meses de idade (A), adultos-jovens, com 6 meses de idade (B) e adultos-velhos, com 12 meses de idade (C). A atividade enzimática é expressa em (U/mg proteína) e os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 10$ ). As diferenças foram analisadas pelo teste t de Student (dados paramétricos) ou U de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Asteriscos denotam significância estatística ( $*p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Fonte: Do autor, 2025.

### 4.3 AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

A fim de avaliar a saúde reprodutiva, foi quantificado o peso testicular, concentração, integridade de membrana, motilidade, aglutinação em porcentagem em cada categoria e a morfologia dos espermatozoides de camundongos jovens, adultos-jovens e adultos-velhos em relação a suplementação ou não de GR (150 mg/kg).

As Tabelas 2 e 3, mostram a avaliação espermática dos camundongos jovens. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e GR para os parâmetros de peso testicular e concentração espermática ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, a análise da integridade da membrana não apresentou diferença significativa na proporção de espermatozoides corados e não corados entre os grupos ( $p < 0,05$ ), como mostrado na Tabela 2. No entanto, foram encontradas diferenças significativas na distribuição da motilidade espermática ( $p < 0,05$ ). O grupo controle apresentou uma proporção maior de espermatozoides com motilidade não progressiva, enquanto o grupo GR mostrou uma maior motilidade progressiva ( $p < 0,05$ ).

A associação mais forte foi observada no padrão de aglutinação ( $p < 0,001$ ). O grupo controle apresentou uma frequência significativamente maior de espermatozoides sem aglutinação. Em contrapartida, o grupo suplementado com GR exibiu proporções significativamente maiores de aglutinação do tipo isolada e alta.

Tabela 2 – Peso testicular, concentração, integridade de membrana, motilidade e aglutinação em porcentagem de espermatozoides em cada categoria, de camundongos jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).

		Média ± DP, Porcentagem (%)		Valor <i>p</i>
		Controle	Geleia Real	
		n = 6	n = 10	
<b>Peso testicular</b>		0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,277 <sup>†</sup>
<b>Concentração (×10<sup>6</sup> /mL)</b>		66,08 ± 29,92	74,57 ± 26,04	0,595 <sup>†</sup>
<b>Integridade de membrana (%)</b>	Não corados	59,8%	61,9%	< 0,241 <sup>§</sup>
	Corados	40,2%	38,1%	
<b>Motilidade (%)</b>	Progressiva	45,4%	50,5%*	0,047 <sup>§</sup>
	Não progressiva	34,9%*	30,8%	
	Imóvel	19,7%	18,7%	
<b>Aglutinação (%)</b>	Nenhuma	16,6%*	2,6%	< 0,001 <sup>§</sup>
	Isolada	12,3%	24,7%*	
	Moderada	45,8%	41,7%	
	Alta	25,3%	30,7%*	

Peso testicular e concentração expressos em média ± desvio padrão (DP). Distribuição percentual de espermatozoides segundo a integridade de membrana, motilidade e aglutinação em animais de 3 meses de idade. <sup>†</sup> Valor obtido após aplicação do teste T de Student. <sup>§</sup> Valor obtido após aplicação do teste Qui-quadrado de Pearson. (\*) indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Tabela elaborada pelo autor.

Em relação a análise da morfologia espermática (Tabela 3) não foi observado diferença estatisticamente significativa no número total de espermatozoides normais ou anormais entre os grupos controle e GR. Da mesma forma, os danos totais de defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda não diferiram entre os grupos. No entanto, os subtipos de defeitos de cabeça, foram observados efeitos específicos do tratamento. O grupo suplementado com GR apresentou uma contagem significativamente menor de espermatozoides com defeitos do tipo

'sem gancho' e 'amorfo' em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Para os demais subtipos de defeitos morfológicos, não foram encontradas diferenças estatísticas.

Tabela 3 – Morfologia dos espermatozoides em camundongos jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).

	Média ± EPM		Valor $p$
	Controle n = 6	Geleia Real n = 10	
<b>Morfologia</b>			
Normal	127,00 ± 7,62	127,08 ± 4,07	< 0,920 <sup>†</sup>
Anormal	73,00 ± 7,62	72,20 ± 4,07	< 0,920 <sup>†</sup>
<b>Defeitos de cabeça (total)</b>	18,83 ± 6,05	22,43 ± 2,75	0,467 <sup>††</sup>
Sem gancho	0,67 ± 0,21	0,00 ± 0,00*	0,021 <sup>††</sup>
Banana-like	0,33 ± 0,21	0,00 ± 0,00	0,192 <sup>††</sup>
Mais fino	0,16 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,461 <sup>††</sup>
Macrocéfalo	2,50 ± 1,11	2,28 ± 0,71	0,742 <sup>††</sup>
Sem cabeça	10,17 ± 4,87	18,43 ± 2,70	0,083 <sup>††</sup>
Amorfo	5,00 ± 0,93	1,57 ± 0,57*	0,014 <sup>††</sup>
Duas cabeças	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,14	>0,999 <sup>††</sup>
<b>Defeitos peça intermediária</b>	0,67 ± 0,21	0,90 ± 0,27	0,735 <sup>††</sup>
Somente a peça	0,33 ± 0,21	0,88 ± 0,30	0,326 <sup>††</sup>
Mais grossa	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Mais fina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Inserção irregular	00,33 ± 00,21	0,00 ± 0,00	0,143 <sup>††</sup>
<b>Defeitos de cauda</b>	53,67 ± 3,95	44,25 ± 3,57	0,105 <sup>†</sup>
Duas caudas	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
Dobrada	31,33 ± 2,62	28,50 ± 1,28	0,314 <sup>†</sup>
Enrolada	22,33 ± 4,82	15,75 ± 2,87	0,239 <sup>†</sup>
Sem cauda	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-

Morfologia dos espermatozoides em camundongos jovens, com 3 meses de idade, grupo controle e geleia real (200 espermatozoides avaliados). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). † Valor obtido após aplicação do teste T de Student. †† Valor obtido após aplicação do teste U de Mann-Whitney. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Tabela elaborada pelo autor.

A Tabela 4, apresenta informações sobre os parâmetros espermáticos dos camundongos adultos-jovens, especificamente os parâmetros de peso testicular, concentração espermática e integridade da membrana. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e geleia real dos animais adultos-jovens.

Já a motilidade espermática foi significativamente afetada ( $p < 0,001$ ). O grupo controle exibiu uma proporção maior de espermatozoides com motilidade progressiva,

enquanto o grupo GR apresentou frequências significativamente maiores de espermatozoides com motilidade não progressiva e imóveis.

O efeito mais notável foi observado no padrão de aglutinação ( $p < 0,001$ ). No grupo GR 100% dos espermatozoides não apresentaram aglutinação. Conseqüentemente, os espermatozoides com aglutinação do tipo isolada e moderada foram observados exclusivamente no grupo controle.

Tabela 4 – Peso testicular, concentração, integridade de membrana, motilidade e aglutinação em porcentagem de espermatozoides em cada categoria, de camundongos adultos-jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).

		Média ± DP, Porcentagem (%)		Valor <i>p</i>
		Controle	Geleia Real	
		n = 10	n = 10	
<b>Peso testicular</b>		0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,850 <sup>†</sup>
<b>Concentração (×10<sup>6</sup> /mL)</b>		79,60 ± 38,37	65,55 ± 36,60	0,413 <sup>†</sup>
<b>Integridade de membrana (%)</b>	Não corados	44,7%	44,4%	0,870 <sup>§</sup>
	Corados	55,3%	55,6%	
<b>Motilidade (%)</b>	Progressiva	29,8%*	19,3%	< 0,001 <sup>§</sup>
	Não progressiva	26,2%	29,8%*	
	Imóvel	44,0%	50,9%*	
<b>Aglutinação (%)</b>	Nenhuma	55,7%	100%*	< 0,001 <sup>§</sup>
	Isolada	28,6%*	0%	
	Moderada	15,7%*	0%	
	Alta	0%	0%	

Peso testicular e concentração expressos em média ± desvio padrão (DP). Distribuição percentual de espermatozoides segundo a integridade de membrana, motilidade e aglutinação em animais de 6 meses de idade.

† Valor obtido após aplicação do teste T de Student. § Valor obtido após aplicação do teste Qui-quadrado de Pearson. (\*) indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos para aquela categoria específica. Tabela elaborada pelo autor.

Já a análise morfológica, revelou um efeito significativo da suplementação com GR (Tabela 5). O grupo suplementado com GR na idade adultos-jovens apresentou uma contagem de espermatozoides com morfologia normal significativamente menor em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ), resultando em um aumento correspondente no número de espermatozoides anormais ( $p < 0,05$ ). Este aumento nos defeitos foi impulsionado

principalmente por anomalias na cauda. O número total de defeitos de cauda na idade adultos-jovens foi significativamente maior no grupo GR ( $p < 0,05$ ). Especificamente, o grupo tratado exibiu uma frequência drasticamente maior de espermatozoides com 'cauda dobrada' e foi o único a apresentar o defeito 'sem cauda' de forma significativa ( $p < 0,05$ ). Ainda, foi observado um aumento sutil, mas significativo, no defeito de cabeça do tipo 'sem gancho' no grupo geleia real ( $p < 0,05$ ). Os totais de defeitos de cabeça e de peça intermediária não diferiram entre os grupos.

Tabela 5 – Morfologia dos espermatozoides em camundongos adultos-jovens suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).

	Média ± EPM		Valor <i>p</i>
	Controle n = 9	Geleia Real n = 10	
<b>Morfologia</b>			
Normal	97,38 ± 3,65	75,50 ± 3,20*	< 0,0005 <sup>†</sup>
Anormal	103,50 ± 3,37	124,50 ± 3,20*	< 0,0004 <sup>†</sup>
<b>Defeitos de cabeça (total)</b>	18,88 ± 4,02	25,11 ± 3,10	0,467 <sup>††</sup>
Sem gancho	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,44*	0,029 <sup>††</sup>
Banana-like	0,62 ± 0,37	0,00 ± 0,00	0,082 <sup>††</sup>
Mais fino	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Macrocéfalo	0,50 ± 0,37	1,33 ± 0,57	0,256 <sup>††</sup>
Sem cabeça	16,25 ± 3,59	19,67 ± 2,44	0,403 <sup>††</sup>
Amorfo	1,37 ± 0,41	3,11 ± 1,06	0,258 <sup>††</sup>
Duas cabeças	0,12 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,470 <sup>††</sup>
<b>Defeitos peça intermediária</b>	0,71 ± 0,28	1,68 ± 0,62	0,276 <sup>††</sup>
Somente a peça	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,44	0,212 <sup>††</sup>
Mais grossa	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Mais fina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Inserção irregular	0,71 ± 0,28	1,00 ± 0,23	0,454 <sup>††</sup>
<b>Defeitos de cauda</b>	85,00 ± 3,53	102,80 ± 3,22*	0,002 <sup>†</sup>
Duas caudas	00,00 ± 00,00	00,00 ± 00,00	-
Dobrada	35,29 ± 3,39	57,88 ± 1,55*	<0,0001 <sup>†</sup>
Enrolada	49,43 ± 1,79	41,88 ± 4,47	0,162 <sup>†</sup>
Sem cauda	00,00 ± 00,00	3,25 ± 0,97*	0,008 <sup>†</sup>

Morfologia dos espermatozoides em camundongos adultos-jovens, com 6 meses de idade grupo controle e geleia real (200 espermatozoides avaliados). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). † Valor obtido após aplicação do teste T de Student. †† Valor obtido após aplicação do teste U de Mann-Whitney. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Tabela elaborada pelo autor.

Os parâmetros de peso testicular e concentração espermática não apresentaram diferenças significativas entre os grupos nos animais adultos-velhos (Tabela 6). No entanto, foram observados efeitos na suplementação com GR nos principais indicadores de qualidade espermática ( $p < 0,001$  para todas as categorias). O grupo GR apresentou uma proporção significativamente maior de espermatozoides com membrana íntegra (62,4% vs. 38,9%). A motilidade também foi drasticamente melhorada no grupo adultos-velhos suplementado com GR, que exibiu mais que o dobro da proporção de espermatozoides com motilidade progressiva (39,2% vs. 16,9%) e uma redução acentuada na frequência de espermatozoides imóveis (37,0% vs. 60,2%).

O padrão de aglutinação também diferiu significativamente ( $p < 0,001$ ). O grupo adultos-velhos suplementado apresentou uma maior proporção de espermatozoides sem aglutinação, enquanto o grupo controle teve frequências mais altas de aglutinação do tipo isolada e moderada.

Tabela 6 – Peso testicular, concentração, integridade de membrana, motilidade e aglutinação em porcentagem de espermatozoides em cada categoria de camundongos adultos-velhos, suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).

		Média ± DP, Porcentagem (%)		Valor $p$
		Controle	Geleia Real	
		n = 10	n = 10	
<b>Peso Testicular</b>		0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,177 <sup>†</sup>
<b>Concentração (<math>\times 10^6</math> /mL)</b>		54,05 ± 20,19	82,85 ± 53,41	0,128 <sup>†</sup>
<b>Integridade de membrana (%)</b>	Não corados	38,9%	62,4%*	<0,0001 <sup>§</sup>
	Corados	61,1%	37,6%	
<b>Motilidade (%)</b>	Progressiva	16,9%	39,2%*	<0,0001 <sup>§</sup>
	Não progressiva	22,9%	23,8%	
	Imóvel	60,2%*	37,0%	
<b>Aglutinação (%)</b>	Nenhuma	57,0%	64,4%*	<0,0001 <sup>§</sup>
	Isolada	25,0%*	9,2%	
	Moderada	18,0%*	24,5%	
	Alta	0%	0,9%*	

Peso testicular e concentração expressos em média ± desvio padrão (DP). Distribuição percentual de espermatozoides segundo a integridade de membrana, motilidade e aglutinação em animais de 12 meses de idade. <sup>†</sup> Valor obtido após aplicação do teste T de Student. <sup>§</sup> Valor obtido após aplicação do teste Qui-quadrado de Pearson. (\*) indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos para aquela categoria específica. Tabela elaborada pelo autor.

Em contrapartida, não foi observada diferença estatisticamente significativa no número total de espermatozoides com morfologia normal ou anormal entre os grupos, nos animais adultos-velhos (Tabela 7). No entanto, foi identificado um efeito benéfico significativo na suplementação com GR na morfologia da cabeça dos espermatozoides. O grupo suplementado apresentou um número total de defeitos de cabeça significativamente menor em comparação com o grupo controle ( $17,10 \pm 3,39$  vs.  $29,10 \pm 2,63$ ). Essa melhora foi atribuída principalmente a uma redução significativa na incidência de espermatozoides 'sem cabeça' ( $p =$

<0,05). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos para os defeitos de peça intermediária e de cauda.

Tabela 7 – Morfologia dos espermatozoides em camundongos adultos-velhos suplementados ou não com geleia real (150 mg/kg).

	Média ± EPM		Valor <i>p</i>
	Controle n = 10	Geleia Real n = 10	
<b>Morfologia</b>			
Normal	87,80 ± 8,70	98,80 ± 5,26	< 0,302 <sup>†</sup>
Anormal	112,20 ± 8,70	101,20 ± 5,26	< 0,302 <sup>†</sup>
<b>Defeitos de cabeça (total)</b>	29,10 ± 2,63	17,10 ± 3,39*	0,010 <sup>††</sup>
Sem gancho	1,30 ± 0,53	0,60 ± 0,40	0,307 <sup>††</sup>
Banana-like	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Mais fino	0,30 ± 0,15	0,00 ± 0,00	0,210 <sup>††</sup>
Macrocéfalo	1,70 ± 0,97	1,80 ± 0,94	>0,999 <sup>††</sup>
Sem cabeça	21,80 ± 1,65	12,70 ± 2,81*	0,049 <sup>††</sup>
Amorfo	3,90 ± 1,07	1,90 ± 0,78	0,132 <sup>††</sup>
Duas cabeças	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,10	>0,999 <sup>††</sup>
<b>Defeitos peça intermediária</b>	3,10 ± 0,60	2,10 ± 0,62	0,278 <sup>††</sup>
Somente a peça	0,20 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,473 <sup>††</sup>
Mais grossa	0,10 ± 0,10	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Mais fina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	>0,999 <sup>††</sup>
Inserção irregular	2,80 ± 0,62	2,10 ± 0,62	0,406 <sup>††</sup>
<b>Defeitos de cauda</b>	80,00 ± 6,92	82,00 ± 6,11	0,831 <sup>†</sup>
Duas caudas	0,30 ± 0,15	0,90 ± 0,50	0,269 <sup>†</sup>
Dobrada	41,70 ± 5,99	48,90 ± 4,07	0,334 <sup>†</sup>
Enrolada	33,00 ± 3,50	30,00 ± 3,62	0,559 <sup>†</sup>
Sem cauda	5,00 ± 1,40	2,20 ± 0,69	0,091 <sup>†</sup>

Morfologia dos espermatozoides em camundongos adultos-velhos, com 12 meses de idade grupo controle e geleia real (200 espermatozoides avaliados). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). † Valor obtido após aplicação do teste T de Student. †† Valor obtido após aplicação do teste U de Mann-Whitney. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Tabela elaborada pelo autor.

#### 4.5 COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS ENTRE IDADES DOS ANIMAIS: JOVENS, ADULTOS-JOVENS E ADULTOS-VELHOS

A fim de comparar as análises de ensaio cometa, teste de micronúcleo, conteúdo de sulfidril, oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína, enzimas hepáticas CAT, SOD e GPx, e ainda, motilidade e morfologia do estudo, entre as diferentes idades dos animais, foi realizado uma comparação entre os jovens, adultos-jovens e adultos-velhos nas análises de genotoxicidade,

estresse oxidativo e análise espermática. Os dados estão apresentados na Tabela 8. Os resultados referentes ao ensaio cometa do sangue periférico e micronúcleo em medula óssea, expressos com média e desvio padrão, não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre idades.

Tabela 8 – Comparações entre os animais jovens, adultos-jovens e adultos-velhos referente as análises genotóxicas, mutagênicas, de estresse oxidativo e avaliação espermática.

	Jovens	Adultos-jovens	Adultos-velhos
<b>Ensaio Cometa (sangue)<sup>α</sup></b>			
Controle	63,19 ± 4,93	71,69 ± 7,78	63,36 ± 12,52
Geleia real	60,98 ± 9,46	47,27 ± 19,32	51,50 ± 13,76
<b>Micronúcleo (medula óssea)<sup>α</sup></b>			
Controle	0,00 ± 0,00	0,83 ± 0,98	0,57 ± 0,78
Geleia real	0,70 ± 1,06	0,42 ± 0,53	0,62 ± 0,74
<b>Conteúdo de sulfidrilas (fígado)<sup>β</sup></b>			
Controle	71,98 ± 9,45	111,0 ± 4,01*	128,3 ± 4,90 <sup>#</sup>
Geleia real	111,6 ± 9,19	131,2 ± 4,90	141,2 ± 5,34 <sup>*#</sup>
<b>2',7'-diclorofluoresceína (fígado)<sup>β</sup></b>			
Controle	46,11 ± 5,86	7,32 ± 0,59*	8,30 ± 0,56*
Geleia real	31,58 ± 4,90	7,92 ± 0,36*	8,31 ± 0,58*
<b>Catalase (fígado)<sup>β</sup></b>			
Controle	36,87 ± 6,40	10,73 ± 1,57*	12,35 ± 1,18*
Geleia real	39,13 ± 5,32	19,86 ± 3,07*	18,18 ± 2,25*
<b>Superóxido dismutase (fígado)<sup>β</sup></b>			
Controle	7,59 ± 0,63	31,92 ± 1,42*	14,37 ± 0,60 <sup>*#</sup>
Geleia real	9,63 ± 1,15	29,18 ± 1,00*	18,72 ± 1,43 <sup>*#</sup>
<b>Glutaciona peroxidase (fígado)<sup>β</sup></b>			
Controle	1,95 ± 0,50	3,52 ± 0,62	2,94 ± 0,50
Geleia real	0,74 ± 0,28	4,14 ± 0,66	6,10 ± 1,27 <sup>*#</sup>
<b>Motilidade (espermatozoide)<sup>β</sup></b>			
<b>Imóvel</b>			
Controle	39,40 ± 4,47	82,83 ± 11,78	115,0 ± 15,07*
Geleia real	35,00 ± 4,01	99,57 ± 16,31*	61,00 ± 12,33
<b>Morfologia (espermatozoide)<sup>β</sup></b>			
<b>Normal</b>			
Controle	127,0 ± 7,62	97,38 ± 3,65*	87,80 ± 8,70*
Geleia real	127,8 ± 4,07	75,50 ± 3,20*	98,80 ± 5,62 <sup>*#</sup>

Comparação dos mesmos grupos em diferentes idades nas análises de ensaio cometa em sangue periférico, teste de micronúcleos em medula óssea, conteúdo de sulfidrilas, oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) e atividade das enzimas hepáticas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GPx). Avaliação espermática: médias de espermatozoides imóveis e morfologia normal. Os dados estão expressos como:  $\alpha$  Ensaio Cometa e Micronúcleo expressos com média  $\pm$  desvio padrão (DP);  $\beta$  Estresse oxidativo e avaliação espermática expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). \* diferença em relação aos jovens dentro do mesmo grupo de tratamento. # diferença em relação aos adultos-jovens dentro do mesmo grupo de tratamento. Tabela elaborada pelo autor.

Em relação as análises de estresse oxidativo, no grupo controle, o conteúdo de sulfidrina no fígado apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação aos jovens e adultos-jovens (Tabela 8). Além disso, houve um aumento do conteúdo de sulfidrina nos adultos-jovens e adultos-velhos, ainda dentro do grupo controle. Enquanto no grupo suplementado com GR foi encontrado um aumento estatisticamente significativo dos adultos-velhos em relação aos jovens e adultos-jovens. Em relação ao conteúdo oxidado de DCFH no fígado, foi observado uma diminuição nos animais adultos-jovens em relação aos animais jovens, e entre adultos-velhos em relação aos animais jovens, tanto no grupo controle quanto no grupo suplementado com GR. Os mesmos resultados foram observados nos níveis de CAT no fígado.

Em relação a atividade da enzima SOD o mesmo padrão apresentado anteriormente foi observado, com diminuição da atividade da enzima nos animais adultos-jovens e adultos-velhos, diferindo dos jovens e ainda, apresentando diferença entre adultos-velhos e adultos-jovens. Este padrão de variação com a idade foi observado tanto no grupo controle quanto no grupo suplementado com GR. Contudo, a atividade da GPx não demonstrou diferença entre as idades no grupo controle, mas apresentou um aumento estatisticamente significativo nos animais adultos-velhos em comparação com os jovens, porém apenas no grupo suplementado com GR.

Quando comparado entre idades a motilidade dos espermatozoides, foi observado um aumento estatisticamente significativo entre os adultos-velhos em relação aos jovens no grupo controle (Tabela 8). Já no grupo suplementado com GR foi visto um aumento estatisticamente significativo nos animais adultos-jovens em relação aos jovens, onde os adultos-jovens apresentaram mais espermatozoides imóveis em comparação aos jovens. Em relação a morfologia dos espermatozoides considerados normais, foi observado uma diferença significativa dos animais adultos-jovens e adultos-velhos em relação aos animais jovens do grupo controle, apresentando uma diminuição dos espermatozoides normais com o aumento da idade. Enquanto isso, no grupo suplementado com GR observou-se uma diferença significativa entre adultos-jovens em relação aos animais jovens, onde os animais adultos-jovens apresentaram uma diminuição nos espermatozoides normais. Já os adultos-velhos em relação aos jovens e adultos-jovens, apresentando uma diminuição em relação ao grupo jovens e um aumento de espermatozoides normais em relação aos animais do grupo adultos-jovens.

## 5. DISCUSSÃO

A saúde do homem permanece um importante desafio para os sistemas de saúde, especialmente porque, apesar do aumento da expectativa de vida entre 2000 e 2018 os homens ainda vivem, em média, 7,1 anos a menos do que as mulheres. Eles apresentam maior mortalidade na maioria das causas de óbito e em praticamente todas as faixas etárias até os 80 anos, além de um risco 40% a 50% superior de morte por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares e respiratórias crônicas. Esse cenário é agravado por fatores comportamentais que persistem na população masculina, incluindo uso prejudicial de álcool, padrões alimentares inadequados, sedentarismo, hipertensão e excesso de peso, contribuindo para uma vulnerabilidade ampliada e para a manutenção de desigualdades em saúde ao longo da vida (Ministério da Saúde, 2023).

Nesse sentido, tornam-se essenciais estudos que investiguem agentes capazes de mitigar esses impactos e promover melhor saúde masculina ao longo da vida. Entre esses potenciais moduladores destaca-se a GR, cujos compostos bioativos têm sido associados a efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e protetores contra à instabilidade genômica, podendo contribuir para a preservação da função testicular e da qualidade espermática (Ali; Kunugi, 2020; Kocot et al., 2018; Miyata; Sakai, 2018). Seu potencial antioxidante é amplamente atribuído a diversos compostos, como polifenóis, flavonoides e o ácido 10-HDA. Estes componentes são essenciais para minimizar danos do estresse oxidativo e dos danos celulares ao longo da vida (Oršolić; Jazvinščak Jembrek, 2024). No presente trabalho, camundongos *Swiss* machos foram suplementados com uma dose de 150mg/kg de GR, por um período de 30 dias, em três diferentes idades. A partir disso, foram realizadas avaliações referentes às alterações genéticas, bioquímicas e parâmetros espermáticos destes animais.

Para avaliar a capacidade genotóxica da GR testada neste estudo, utilizamos o ensaio cometa em células do sangue periférico de camundongos. O ensaio cometa é uma técnica amplamente utilizada para a detecção de efeitos genotóxicos/antigenotóxicos de substâncias naturais, pois avalia vários tipos de danos ao DNA (Singh et al., 1988). O ensaio cometa alcalino (pH > 13), por sua vez, é o mais sensível, detecta não apenas quebras de fita simples e dupla, mas também sítios lábeis alcalinos e lesões de base que são convertidas em quebras durante o processo de lise e eletroforese (Collins et al., 2023).

A avaliação do dano basal ao DNA em células do sangue periférico dos camundongos controle revelou níveis elevados do parâmetro *tail intensity* (% *Tail Intensity*), atingindo aproximadamente 70%. Embora o dano ao DNA seja associado ao processo de

envelhecimento, o elevado dano basal em animais jovens pode ser atribuído ao estresse crônico induzido pelo protocolo experimental. A administração diária por gavagem durante 30 dias, é um procedimento invasivo, capaz de induzir estresse fisiológico significativo em roedores (Vandenberg et al., 2014; Walker et al., 2012). Além disso, deve-se considerar a alta sensibilidade do ensaio cometa em condição alcalina, que detecta lesões oxidativas e sítios lábeis alcalinos, e/ou a fatores ambientais e de manejo que induzem estresse oxidativo (Collins et al., 2023; López-Diazguerrero et al., 2005).

No entanto, um achado bem relevante está na comparação entre os grupos, suplementado com GR e água, onde foi observado um efeito antígenotóxico significativo, reduzindo o parâmetro de *Tail intensity* nos animais com 6 meses de idade, de aproximadamente 70% para 45%. Este resultado sugere que a GR é capaz de proteger o material genético contra o dano basal, provavelmente devido à sua capacidade de aumentar as defesas antioxidantes, através da CAT e sulfidrilas. Um estudo realizado por Acar (2021), que investigou os efeitos do benzoato de sódio e a ação terapêutica da GR em *Allium cepa* L., demonstrou que o uso de GR em doses crescentes (25 mg/L e 50 mg/L) foi eficaz na reversão de diversos parâmetros tóxicos induzidos pelo benzoato de sódio. A aplicação de GR reduziu o estresse oxidativo e o dano ao DNA de forma dose-dependente, o que se manifestou pela diminuição na frequência de aberrações cromossômicas e micronúcleos, bem como na redução dos danos ao DNA. Omar et al. (2024) reforçaram esses achados posteriormente em um estudo onde se demonstrou que o uso da GR administrada via oral na dose de 200 mg/kg/dia diminuiu os danos ao DNA causados pelo cádmio em ratos. O estudo mostrou que a suplementação com GR não apenas reduziu os níveis de dano genético, como também melhorou diversos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, função hepática e renal. Esses resultados sugerem que a GR possui propriedades antioxidantes que contribuem para a proteção celular contra o estresse oxidativo e o dano genético.

Ainda, outro teste utilizado neste trabalho para análise da instabilidade genômica foi o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos, que fornece uma estimativa da quantidade de mutações cromossômicas induzidas através de eventos de clastogênese e aneugênese (Krishna; Hayashi, 2000). Em relação às avaliações de mutagenicidade, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de EPCMN na medula óssea de camundongos entre os grupos que receberam água e GR na mesma faixa etária.

De fato, estudos na literatura demonstram que o uso da GR, administrada por gavagem em diferentes doses (150, 300 e 1000 mg/kg), diminuiu significativamente os danos ao DNA causados pelo agente alquilante metilmetanossulfonato em camundongos. Os autores

observaram que, especialmente nas doses mais altas e na administração em fase de pós-tratamento, a GR apresentou propriedades antimutagênicas e antioxidantes, contribuindo para a redução de lesões genéticas detectadas por meio de testes como o ensaio cometa e o teste de micronúcleos. Esses resultados sugerem que a GR possui potencial para atuar como agente protetor contra os efeitos deletérios de agentes mutagênicos, o que abre possibilidades para seu uso como complemento em estratégias de proteção genética e prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e danos ao DNA (Damiani et al., 2022). Contudo, é crucial notar que, no presente estudo, não foi observada uma redução significativa na frequência de micronúcleos, apesar do potencial protetor evidenciado pela literatura. Essa divergência pode ser atribuída à ausência de um agente mutagênico direto, o que sugere que o efeito protetor da GR é mais destacado em cenários de estresse genotóxico induzido, onde ela atua na mitigação de danos, do que em condições basais.

A fim de entender os mecanismos que levam à instabilidade genômica, foi avaliado o estresse oxidativo no presente estudo. A análise do conteúdo de sulfidrilas no tecido hepático, um importante marcador da defesa antioxidante não enzimática, revelou um efeito protetor significativo do tratamento com GR. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que demonstram as propriedades antioxidantes da GR (Caixeta et al., 2018; Nezami Majd et al., 2025). Kocot et al. (2018) relataram que compostos bioativos presentes na GR, são capazes de neutralizar radicais livres e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes. O aumento nos grupos sulfidrilas, observado em nosso estudo, está alinhado com a hipótese de que a GR exerce um efeito hepatoprotetor ao fortalecer as defesas celulares contra o estresse oxidativo, um mecanismo também sugerido por Omar et al. (2024) em um modelo de dano hepático induzido por cádmio.

O artigo de Chen et al. (2024) investigou os efeitos da administração de GR em um modelo de camundongo com envelhecimento natural onde machos de meia-idade (com 9 meses de idade) foram alimentados continuamente por 9 meses, atingindo 18 meses de idade ao final do experimento. Os achados referentes ao fígado indicaram que a intervenção com GR proporcionou proteção hepática contra os danos causados ao longo da vida, incluindo disfunção hepática, senescência celular, comprometimento da barreira intestinal e disbiose da microbiota (Chen et al. 2024). Ainda a GR foi capaz aumentar a capacidade antioxidante do fígado, promovendo a produção das enzimas SOD, GSH-Px e CAT (Chen et al., 2024).

Para aprofundar a investigação sobre o potencial antioxidante da GR no tecido hepático, foram avaliados não apenas os marcadores de defesa não enzimática, mas também a

produção de EROs através do ensaio de oxidação de DCFH, embora no presente estudo não tenha sido encontrado diferenças estatisticamente significativas.

A relação inversa observada entre o aumento de sulfidrilas e a constância dos níveis da oxidação de DCFH reforça a hipótese de que a GR exerce um efeito hepatoprotetor (Martinello; Mutinelli, 2021). O aumento significativo dos grupos sulfidrila nos animais jovens e adultos-jovens indica que o tratamento potencializou a capacidade do fígado de neutralizar agentes oxidantes. Como consequência direta dessa defesa aprimorada, a produção de EROs, que leva à oxidação da DCFH, foi atenuada, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas.

Este cenário é consistente com a literatura, onde compostos com alta capacidade antioxidante, como os encontrados na GR, atuam tanto nos radicais livres quanto no estímulo de sistemas de defesa endógenos (Ahmad et al., 2020; Botezan et al., 2023; Espinosa-Diez et al., 2015). A ausência de significância estatística na oxidação de DCFH pode indicar que o principal efeito da GR, neste modelo, auxiliando o sistema de defesa (indicado pelo aumento sulfidrilas), em vez de inibir diretamente as fontes de EROs.

Em relação ao nível de enzimas oxidantes, CAT, SOD e GPx foram analisadas para um melhor entendimento da capacidade antioxidante hepática. No presente estudo, foi possível ver o aumento dos níveis de CAT, SOD e GPx nos animais adultos-velhos suplementados com GR. Ainda, CAT apresentou um aumento nos animais adultos-jovens em relação ao grupo controle na mesma idade, indicando que a GR potencializa as defesas do organismo contra o estresse oxidativo nessas idades. Chen et al. (2024) observaram que os níveis das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx foram significativamente aumentados no grupo tratado com GR em comparação ao grupo de envelhecimento natural. Especificamente, a administração de GR resultou em elevações de aproximadamente 37,99% em CAT, 8,82% em SOD e 9,94% em GPx, indicando uma melhora na capacidade antioxidante do organismo.

A análise conjunta dos marcadores de defesa antioxidante e de dano oxidativo fornece uma evidência abrangente do potencial hepatoprotetor da GR. Esses achados consolidam a GR como um agente bioativo de interesse para a prevenção e manejo de condições hepáticas mediadas por estresse oxidativo (Ahmad et al., 2020; Bagameri et al., 2023; Martinello; Mutinelli, 2021).

A capacidade da GR de modular positivamente o sistema de defesa antioxidante, conforme observado no tecido hepático, sugere um efeito protetor que se estende a outros sistemas orgânicos vulneráveis ao estresse oxidativo (Delkhoshe-Kasmaie et al., 2014). Neste contexto, a qualidade espermática é um parâmetro importante, pois os espermatozoides são

particularmente suscetíveis aos danos causados pelas EROs devido à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas e à limitada capacidade de reparo (Aktas; Kum; Aksoy, 2020; Yin et al., 2023). A manutenção da integridade espermática parece ser, portanto, um indicador sensível da eficácia protetora da GR.

A análise dos parâmetros espermáticos revelou uma modulação distinta dos efeitos da GR. Nos camundongos jovens, o principal achado foi uma melhora notável na motilidade espermática, sugerindo um benefício direto na funcionalidade reprodutiva em indivíduos com o sistema ainda em pleno desenvolvimento. Este achado corrobora com estudos prévios que demonstraram o efeito positivo da GR na motilidade espermática (Azad et al., 2019; Poormoosavi et al., 2024). Por outro lado, nos animais adultos-jovens, observou-se uma melhora significativa na aglutinação, um parâmetro que pode indicar maior estabilidade da membrana espermática (Yin et al., 2023). A melhora na aglutinação, que reflete a estabilidade da membrana espermática, está em consonância com o papel da GR na proteção lipídica contra a peroxidação (Zahmatkesh et al., 2014). Contudo, neste mesmo grupo, foi registrado um aumento na incidência de espermatozoides anormais com defeito de cauda, o que impactou consequentemente na piora da motilidade, um resultado que indica a necessidade de investigações adicionais sobre a influência da suplementação nos mecanismos de morfogênese da cauda espermática nesta faixa etária.

Os animais adultos-velhos, que representam o grupo mais impactado pelo processo de envelhecimento, foram os que apresentaram a resposta mais notável à suplementação. Neste grupo, foi possível observar uma melhora na integridade e fluidez da membrana espermática, um aumento na motilidade e na aglutinação, além de uma diminuição no defeito de cabeça. Estes resultados sugerem que a GR exerce um efeito protetor em espermatozoides que já estão sob maior estresse oxidativo, reforçando a hipótese de que seu potencial antioxidante sistêmico se traduz em benefícios diretos para a qualidade espermática em condições de vulnerabilidade. O efeito protetor mais evidente nos animais adultos-velhos, com melhora na integridade da membrana e diminuição de defeitos morfológicos, reforça dados já presentes na literatura que aponta a GR como um agente eficaz na mitigação dos danos espermáticos associados ao estresse oxidativo (Akhigbe et al., 2025).

A relevância do potencial antioxidante da GR na proteção da qualidade espermática é ainda mais evidente quando contrastada com estudos que demonstram o impacto negativo do estresse oxidativo na função reprodutiva. Fasasi et al., (2025), por exemplo, investigaram os efeitos da exposição crônica ao glutamato monossódico em ratos e concluíram que o glutamato monossódico induz toxicidade reprodutiva dose-dependente, principalmente através da

promoção de estresse oxidativo, resultando em redução da concentração, motilidade e aumento de defeitos morfológicos dos espermatozoides. Ainda, Tohamy, Gad El-Karim e El-Sayed (2019) demonstraram que a suplementação com GR em ratos com infertilidade induzida por hidroxíureia (um agente causador de dano testicular via estresse oxidativo) resultou em uma melhora significativa na qualidade espermática, no *status* hormonal e antioxidante. Este cenário de dano oxidativo, provocado por um agente externo, ilustra a vulnerabilidade do sistema reprodutivo masculino.

Quando realizadas as comparações entre as idades, o processo natural de envelhecimento nas condições do estudo não aumentou a genotoxicidade sistêmica mensurável em sangue. Ainda, a GR não induziu danos genéticos à medula óssea e não pareceu exercer efeito protetor suficientemente forte para alterar estatisticamente esses parâmetros. De acordo com o estudo apresentado por Schumacher et al., (2021), o aumento da genotoxicidade durante o envelhecimento é altamente dependente de fatores contextuais, incluindo o tipo de tecido analisado, o estado de estresse ao qual o organismo está submetido, a linhagem celular ou de organismo, e das condições ambientais. Esses fatores influenciam a taxa e a natureza dos danos ao DNA, evidenciando que a produção, reparo e acumulação de danos genotóxicos não ocorrem de forma uniforme em diferentes tecidos ou sob diferentes condições ambientais. Assim, a complexidade do dano ao DNA na senescência sugere que estratégias para mitigar os efeitos do envelhecimento deverão considerar essa variabilidade, levando em conta as particularidades de cada tecido e o ambiente ao qual estão submetidos.

Os níveis de sulfidrilas hepáticas apresentaram um aumento progressivo com a idade no grupo controle, sugerindo uma resposta adaptativa ao aumento do estresse oxidativo observado nas etapas mais avançadas da vida. Esse aumento pode refletir tanto maior síntese de compostos antioxidantes, como a glutathiona, quanto acúmulo de proteínas modificadas por oxidação (Lee et al., 2021). Nos animais suplementados com GR, entretanto, a elevação foi menos acentuada, indicando possível modulação das vias de tióis e uma menor necessidade de resposta compensatória, possivelmente devido a um efeito antioxidante intrínseco da suplementação.

Bárcena et al., (2021) observaram que, ao comparar o fígado de ratos jovens com o de ratos idosos, o fígado dos animais velhos apresentaram uma resposta compensatória ativada para lidar com os danos celulares e o aumento do estresse oxidativo, especialmente por meio da expressão de proteínas relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático, ao manejo do estresse oxidativo e à resposta inflamatória. Essas vias representam mecanismos de adaptação

que tentam manter a homeostase celular em face às disfunções induzidas pelo envelhecimento, como a disfunção mitocondrial e a disfunção proteica (López-Otín et al., 2023a).

Por outro lado, os achados do presente estudo relacionado aos níveis hepáticos de DCFH, CAT e SOD com o avanço da idade, são contraditórios. Diversos autores descrevem que o fígado é um dos primeiros órgãos a apresentar disfunção mitocondrial progressiva, levando ao acúmulo de EROs e promovendo danos oxidativos cumulativos (Espinosa-Diez et al., 2015; Hajam et al., 2022; Luo et al., 2020). Segundo Sohal; Orr (2012), o aumento da produção de peróxidos durante o envelhecimento induz uma resposta adaptativa caracterizada pela elevação da atividade de enzimas antioxidantes, como a CAT, a fim de compensar o desequilíbrio redox. Enquanto no resultado encontrado em nosso estudo, apresentam uma redução dos níveis hepáticos de DCFH, CAT e SOD nos animais adultos-jovens e adultos-velhos em relação aos animais jovens. Enquanto a enzima GPx apresentou aumento significativo nos animais adultos-velhos em relação aos animais jovens e adultos-jovens.

Ademais, embora a GR possua reconhecidas propriedades antioxidantes, evidências recentes, como as reportadas por Kocot et al., (2018), indicam que seus efeitos são moduladores e não capazes de suprimir completamente o incremento natural de EROs associado ao avanço da idade. Assim, a manutenção de níveis de DCFH, CAT e SOD nos animais suplementados reforça que a ação antioxidante da GR pode ser limitada diante das alterações metabólicas próprias da senescência hepática.

Na avaliação espermática, os adultos-velhos possuem um impacto evidente na qualidade espermática. A motilidade apresentou redução significativa nos animais adultos-velhos em comparação aos jovens no grupo controle, refletindo o declínio progressivo da função das células germinativas e da integridade mitocondrial com o avançar da idade (Taylor et al., 2019). No grupo suplementado, entretanto, observou-se um padrão distinto: os animais adultos-jovens apresentaram maior proporção de espermatozoides imóveis em relação aos jovens, sugerindo que a suplementação pode exercer efeitos dependentes da idade ou do momento fisiológico reprodutivo.

Um estudo realizado por Hassan, (2009) demonstrou que em machos adultos saudáveis a suplementação oral de GR aumentou a contagem de espermatozoides normais, a motilidade e a viabilidade, bem como melhorou os marcadores antioxidantes e reduziu a peroxidação lipídica no testículo. Esses resultados corroboram a hipótese de que os lipídeos e outros componentes da GR podem modular o microambiente testicular e o eixo HHG, favorecendo a espermatogênese e qualidade espermática, variando conforme a idade dos animais (Yang et al., 2012).

A morfologia espermática reforça esse padrão. No grupo controle, houve redução progressiva da proporção de espermatozoides morfologicamente normais com o avançar da idade, condizente com o maior acúmulo de danos oxidativos e a redução da capacidade de reparo celular nas células germinativas em animais mais velhos. Esse efeito é amplamente descrito na literatura como uma consequência típica do envelhecimento testicular (Taylor et al., 2019). No grupo suplementado com GR, observou-se, novamente, um comportamento não linear: houve redução da proporção de espermatozoides normais nos animais adultos-jovens em relação aos jovens, enquanto os adultos-velhos apresentaram frequência de espermatozoides normais superior à dos adultos-jovens suplementados. Esse padrão pode indicar uma adaptação tardia induzida pela suplementação, sugerindo que a GR pode apresentar efeitos benéficos em idades mais avançadas, mas efeitos mais sensíveis ou moduladores em idades intermediárias (Yang et al., 2012, 2015).

Conjuntamente, os resultados indicam que, em camundongos de idade avançada, a suplementação exerce impacto significativo sobre os marcadores de estresse oxidativo hepático e sobre a qualidade espermática, mas não altera a genotoxicidade nos tecidos analisados. A GR apresentou efeitos diferenciados entre as faixas etárias, modulando parcialmente os níveis de enzimas antioxidantes e influenciando de forma variável os parâmetros reprodutivos. Esses achados reforçam a necessidade de considerar o estado fisiológico e a idade dos animais ao investigar os efeitos de suplementos bioativos, evidenciando que a resposta à GR depende tanto do tecido quanto da fase do ciclo de vida.

Em síntese, os resultados demonstraram que, em todas as faixas etárias, a GR foi segura sob os pontos de vista genotóxico e mutagênico, além de apresentar potencial atividade antioxidante. Esses achados são relevantes no contexto da longevidade e da manutenção da qualidade de vida, sugerindo que a GR pode constituir uma alternativa segura como agente antioxidante, sem riscos aparentes à integridade genética (Chen et al., 2024; Nazar-Zadeh et al., 2022).

## 6. CONCLUSÃO

A suplementação com GR por 30 dias, na dose de 150 mg/kg, mostrou-se segura do ponto de vista genotóxico e mutagênico em camundongos *Swiss* machos de diferentes idades. O ensaio cometa e teste de micronúcleos demonstraram ausência de danos detectáveis ao DNA, indicando que a suplementação da GR durante o período proposto pelo estudo, não compromete a integridade genômica, independentemente da fase do ciclo de vida. Nos parâmetros bioquímicos hepáticos, observou-se que o aumento da idade foi o principal fator associado ao aumento do estresse oxidativo, enquanto a GR exerceu apenas efeitos moduladores discretos, sugerindo ação antioxidante limitada, porém consistente com o perfil nutracêutico do composto. A avaliação espermática evidenciou declínio progressivo dos parâmetros reprodutivos com a idade, conforme esperado para o processo natural de senescência, sem impacto negativo da suplementação.

Em conjunto, os achados demonstram que a GR pode ser considerada um suplemento seguro, não genotóxico e potencialmente benéfico para a manutenção da saúde celular. Embora seu efeito protetor basal seja modesto, especialmente em organismos jovens e saudáveis, sua utilização apresenta relevância no contexto da longevidade masculina, visto que não agrava processos oxidativos, não compromete a espermatogênese e mantém a integridade do material genético. Estudos futuros devem investigar mecanismos moleculares envolvidos, diferentes doses, períodos mais prolongados de suplementação e modelos que incluam condições de estresse oxidativo exacerbado.

Além disso, é fundamental ampliar a produção de evidências em modelos sem qualquer intervenção lesiva ou patologia associada, uma vez que grande parte da literatura avalia a GR apenas como agente reparador após exposição a danos. Assim, são necessários estudos que examinem seus efeitos em condições fisiológicas basais, permitindo esclarecer de forma mais precisa os reais impactos da GR ao longo da vida.

## REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR, Sameh A.; ABD EL-HACK, Mohamed E.; ALAGAWANY, Mahmoud; TAHA, Ayman E.; ELNESR, Shaaban S.; ABD ELMONEM, Osama M.; SWELUM, Ayman A. Useful impacts of royal jelly on reproductive sides, fertility rate and sperm traits of animals. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, [S. l.], v. 104, n. 6, p. 1798–1808, 2020. DOI: 10.1111/jpn.13303. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpn.13303>. Acesso em: 3 nov. 2025.
- ABDULLAHZADEH, Mehrdad; VANAKI, Zohreh; MOHAMMADI, Eesa; MOHTASHAMI, Jamileh. Insights Into the Expectations of Infertile Men Regarding Multidisciplinary Reproductive Health Services. **Health expectations : An International Journal of Public Participation in Health Care and Health Policy**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. e70327, 2025. DOI: 10.1111/hex.70327. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12210042/>. Acesso em: 27 nov. 2025.
- ACAR, Ali. Therapeutic effects of royal jelly against sodium benzoate-induced toxicity: cytotoxic, genotoxic, and biochemical assessment. **Environmental Science and Pollution Research International**, [S. l.], v. 28, n. 26, p. 34410–34425, 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-13172-6.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 105, p. 121–126, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>. Acesso em: 19 fev. 2025.
- AGARWAL, Ashok; BASKARAN, Saradha; PAREKH, Neel; CHO, Chak-Lam; HENKEL, Ralf; VIJ, Sarah; ARAFA, Mohamed; PANNER SELVAM, Manesh Kumar; SHAH, Rupin. Male infertility. **The Lancet**, [S. l.], v. 397, n. 10271, p. 319–333, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673620326672>. Acesso em: 27 nov. 2025.
- AGUDO-RIOS, Clara; SANCHEZ-RODRIGUEZ, Ana; IDROVO, Ingrid I. D.; LABORDA-GOMARIZ, Juan Ángel; SOLER, Ana J.; TEVES, Maria E.; ROLDAN, Eduardo R. S. Sperm Chromatin Status and DNA Fragmentation in Mouse Species with Divergent Mating Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 21, p. 15954, 2023. DOI: 10.3390/ijms242115954. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/21/15954>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- AHMAD, Saboor; CAMPOS, Maria Graça; FRATINI, Filippo; ALTAYE, Solomon Zewdu; LI, Jianke. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 382, 2020. DOI: 10.3390/ijms21020382.
- AHMED, Walaa M. S.; KHALAF, A. A.; MOSELHY, Walaa A.; SAFWAT, Ghada M. Royal jelly attenuates azathioprine induced toxicity in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 431–437, 2014. DOI: 10.1016/j.etap.2013.12.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913002822>. Acesso em: 21 maio. 2024.

AITKEN, R. John; DE IULIIS, Geoffrey N.; MCLACHLAN, Robert I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 46–56, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x>. Acesso em: 15 nov. 2025.

AKHIGBE, R. E.; OYEDOKUN, P. A.; ADEOGUN, A. E.; OGUNLEYE, O. O.; ADEGBOLA, C. A.; AKHIGBE, T. M. The aging male: impact of aging on male reproduction. **Biogerontology**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 198, 2025. DOI: 10.1007/s10522-025-10343-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10522-025-10343-7>. Acesso em: 26 nov. 2025.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001. DOI: 10.1016/s0304-3940(01)01636-6.

AKTAS, Serdar; KUM, Cavit; AKSOY, Melih. Effects of boric acid feeding on the oxidative stress parameters in testes, sperm parameters and DNA damage in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 58, p. 126447, 2020. DOI: 10.1016/j.jtemb.2019.126447. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X19305826>. Acesso em: 16 ago. 2024.

ALI, Amira Mohammed; KUNUGI, Hiroshi. Apitherapy for Age-Related Skeletal Muscle Dysfunction (Sarcopenia): A Review on the Effects of Royal Jelly, Propolis, and Bee Pollen. **Foods**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 1362, 2020. DOI: 10.3390/foods9101362. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/10/1362>. Acesso em: 13 fev. 2025.

AMIRSHAHI, Tayebeh; NAJAFI, Gholamreza; NEJATI, Vahid. Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin-induced male rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 209–216, 2014.

ARAÚJO, Maria Elizete de Almeida; SILVA, Marcus Tolentino; ANDRADE, Keitty Regina Cordeiro De; GALVÃO, Tais Freire; PEREIRA, Maurício Gomes. Prevalence of health services utilization in Brazil: a systematic review and meta-analysis\*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S. l.], v. 26, p. 589–604, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742017000300016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ress/a/d6DyD7CHXbpTJbLq7NQQNdq/?lang=en>. Acesso em: 30 nov. 2025.

AZAD, Farnam; NEJATI, Vahid; SHALIZAR-JALALI, Ali; NAJAFI, Gholamreza; RAHMANI, Fatemeh. Antioxidant and anti-apoptotic effects of royal jelly against nicotine-induced testicular injury in mice. **Environmental Toxicology**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 708–718, 2019. DOI: 10.1002/tox.22737.

BAGAMERI, Lilla; BOTEZAN, Sara; BOBIS, Otilia; BONTA, Victorita; DEZMIREAN, Daniel Severus. Molecular Insights into Royal Jelly Anti-Inflammatory Properties and Related Diseases. **Life**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 1573, 2023. DOI: 10.3390/life13071573. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10381546/>. Acesso em: 4 jun. 2024.

- BANNISTER, Joe V.; CALABRESE, Lilia. Assays for Superoxide Dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, [S. l.], v. 32, p. 279–312, 1987. DOI: 10.1002/9780470110539.ch5. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470110539.ch5>. Acesso em: 19 fev. 2025.
- BÁRCENA, Brenda et al. Aging Induces Hepatic Oxidative Stress and Nuclear Proteomic Remodeling in Liver from Wistar Rats. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 1535, 2021. DOI: 10.3390/antiox10101535. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8533122/>. Acesso em: 2 dez. 2025.
- BENDSEN, E.; BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Yding; WESTERGAARD, L. G. Number of germ cells and somatic cells in human fetal ovaries during the first weeks after sex differentiation. **Human Reproduction (Oxford, England)**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 30–35, 2006. DOI: 10.1093/humrep/dei280. Disponível em: <https://academic-oup-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/humrep/article-abstract/21/1/30/570618?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 27 nov. 2025.
- BHATTACHARYA, Indrashis; DEY, Souvik; BANERJEE, Arnab. Revisiting the gonadotropic regulation of mammalian spermatogenesis: evolving lessons during the past decade. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 14, p. 1110572, 2023. DOI: 10.3389/fendo.2023.1110572. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10140312/>. Acesso em: 27 nov. 2025.
- BOTEZAN, Sara; BACI, Gabriela-Maria; BAGAMERI, Lilla; PAŞCA, Claudia; DEZMIREAN, Daniel Severus. Current Status of the Bioactive Properties of Royal Jelly: A Comprehensive Review with a Focus on Its Anticancer, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Effects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 1510, 2023. DOI: 10.3390/molecules28031510. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1510>. Acesso em: 10 jun. 2025.
- CAIXETA, Douglas Carvalho; TEIXEIRA, Renata Roland; PEIXOTO, Leonardo Gomes; MACHADO, Helen Lara; BAPTISTA, Nathalia Belele; DE SOUZA, Adriele Vieira; VILELA, Danielle Diniz; FRANCI, Celso Rodrigues; SALMEN ESPINDOLA, Foued. Adaptogenic potential of royal jelly in liver of rats exposed to chronic stress. **Public Library of Science One**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. e0191889, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0191889.
- CHEN, Lili; ZHAO, Li; ZHANG, Gaowei; LI, Zhuozhen; QU, Liangliang; LUO, Liping. Long-term administration of royal jelly regulates age-related disorders and improves gut function in naturally aging mice. **Food & Function**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 5272–5286, 2024. DOI: 10.1039/d4fo00781f. Disponível em: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ez318.periodicos.capes.gov.br/38629388/>.
- CHO, In Ki; EASLEY, Charles A. Recent Developments in In Vitro Spermatogenesis and Future Directions. **Reproductive Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 215–232, 2023. DOI: 10.3390/reprodmed4030020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-3897/4/3/20>. Acesso em: 27 nov. 2025.
- COLLAZO, Nicolas; CARPENA, Maria; NUÑEZ-ESTEVEZ, Bernabe; OTERO, Paz; SIMAL-GANDARA, Jesus; PRIETO, Miguel A. Health Promoting Properties of Bee Royal Jelly: Food of the Queens. **Nutrients**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 543, 2021. DOI:

10.3390/nu13020543. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7915653/>. Acesso em: 15 maio. 2024.

COLLINS, Andrew et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature protocols**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 929–989, 2023. DOI: 10.1038/s41596-022-00754-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>. Acesso em: 13 maio. 2024.

COOPER, Trevor G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 130–138, 2011. DOI: 10.1038/aja.2010.97. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3739406/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

CORNARA, Laura; BIAGI, Marco; XIAO, Jianbo; BURLANDO, Bruno. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 8, p. 412, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00412. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5487425/>. Acesso em: 13 maio. 2024.

CRISTOFALO, V. J.; GERHARD, G. S.; PIGNOLO, R. J. Molecular biology of aging. **The Surgical Clinics of North America**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 1–21, 1994. DOI: 10.1016/s0039-6109(16)46225-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez318.periodicos.capes.gov.br/science/article/abs/pii/S0039610916462250?via%3Dihub>. Acesso em: 3 dez. 2025.

DAMIANI, Adriani Paganini; GARCEZ, Michelle Lima; LETIELI DE ABREU, Larissa; TAVARES, Taís Helena; RODRIGUES BOECK, Carina; MORAES DE ANDRADE, Vanessa. A reduction in DNA damage in neural tissue and peripheral blood of old mice treated with caffeine. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, [S. l.], v. 80, n. 13–15, p. 621–629, 2017. DOI: 10.1080/15287394.2017.1286901. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1286901>. Acesso em: 10 maio. 2024.

DAMIANI, Adriani Paganini; MAGENIS, Marina Lummertz; DAGOSTIN, Ligia Salvan; BERETTA, Ângela Caroline da Luz; SARTER, Rovena Jacobsen; LONGARETTI, Luiza Martins; MONTEIRO, Isadora de Oliveira; ANDRADE, Vanessa Moraes De. Royal jelly reduce DNA damage induced by alkylating agent in mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 825, p. 111796, 2022. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2022.111796. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510722000239>. Acesso em: 14 maio. 2024.

DAMIANI, Adriani Paganini; STRAPAZZON, Giulia; DE OLIVEIRA SARDINHA, Thanielly Thais; ROHR, Paula; GAJSKI, Goran; DE PINHO, Ricardo Aurino; DE ANDRADE, Vanessa Moraes. Melatonin supplementation over different time periods until ageing modulates genotoxic parameters in mice. **Mutagenesis**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 465–478, 2020. DOI: 10.1093/mutage/geaa017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mutage/geaa017>. Acesso em: 17 mar. 2025.

DE MAGALHÃES, João Pedro. An overview of contemporary theories of ageing. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 1074–1082, 2025. DOI: 10.1038/s41556-025-01698-7.

DELKHOSHE-KASMAIE, Fatemeh; MALEKINEJAD, Hassan; KHORAMJOUY, Mona; REZAEI-GOLMISHEH, Ali; JANBAZE-ACYABAR, Hamed. Royal jelly protects from

taxol-induced testicular damages via improvement of antioxidant status and up-regulation of E2f1. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 80–88, 2014. DOI: 10.3109/19396368.2013.852271. Disponível em: <https://www.tandfonline.com.ez318.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.3109/19396368.2013.852271>. Acesso em: 29 nov. 2025.

DONG, Shijue; CHEN, Chen; ZHANG, Jiali; GAO, Yuan; ZENG, Xuhui; ZHANG, Xiaoning. Testicular aging, male fertility and beyond. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 13, p. 1012119, 2022. DOI: 10.3389/fendo.2022.1012119. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9606211/>. Acesso em: 19 nov. 2025.

DREVET, Joël R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Post-meiotic gene products as targets for male contraception. [S. l.], v. 250, n. 1, Post-meiotic gene products as targets for male contraception, p. 70–79, 2006. DOI: 10.1016/j.mce.2005.12.027. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720705004739>. Acesso em: 27 nov. 2025.

EL-GUENDOOUZ, Soukaïna; MACHADO, Alexandra M.; AAZZA, Smail; LYOUSSI, Badiaâ; MIGUEL, Maria G.; MATEUS, Maria C.; FIGUEIREDO, A. Cristina. Chemical Characterization and Biological Properties of Royal Jelly Samples From the Mediterranean Area. **Natural Product Communications**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 1934578X20908080, 2020. DOI: 10.1177/1934578X20908080. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1934578X20908080>. Acesso em: 17 fev. 2025.

ESPINOSA-DIEZ, Cristina; MIGUEL, Verónica; MENNERICH, Daniela; KIETZMANN, Thomas; SÁNCHEZ-PÉREZ, Patricia; CADENAS, Susana; LAMAS, Santiago. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biology**, [S. l.], v. 6, p. 183–197, 2015. DOI: 10.1016/j.redox.2015.07.008. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4534574/>. Acesso em: 28 nov. 2025.

FALSHAW, Natalie; SAGNER, Michael; SIOW, Richard C. The Longevity Med Summit: insights on healthspan from cell to society. **Frontiers in Aging**, [S. l.], v. 5, p. 1417455, 2024. DOI: 10.3389/fragi.2024.1417455. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11286550/>. Acesso em: 12 nov. 2025.

FARAHANI, Linda; THARAKAN, Tharu; YAP, Tet; RAMSAY, Jonathan W.; JAYASENA, Channa N.; MINHAS, Suks. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis. **Andrology**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 115–144, 2021. DOI: 10.1111/andr.12886. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/andr.12886>. Acesso em: 21 nov. 2024.

FASASI, Olaleke Abraham; IBITOYE, Babatunde Oluwaseun; OGUNMOKUNWA, Adesua Emmanuel; AKINGBADE, Adebajji Modupe; OMOLAYO, Adebukola Olubosede. Monosodium glutamate is associated with dose-dependent reproductive toxicity and sperm dysfunction in male wistar rats. **JBRA Assisted Reproduction**, [S. l.], v. 00, n. 0, p. 00–00, 2025. Disponível em: <https://www.jbra.com.br/media/html/JBRA3149.html>. Acesso em: 13 nov. 2025.

FERRUCCI, Luigi; GONZALEZ-FREIRE, Marta; FABBRI, Elisa; SIMONSICK, Eleanor; TANAKA, Toshiko; MOORE, Zenobia; SALIMI, Shabnam; SIERRA, Felipe; DE CABO,

Rafael. Measuring biological aging in humans: A quest. **Aging Cell**, [S. l.], v. 19, n. 2, p. e13080, 2020. DOI: 10.1111/accel.13080. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.13080>. Acesso em: 6 jul. 2025.

FRATINI, Filippo; CILIA, Giovanni; MANCINI, Simone; FELICOLI, Antonio. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 192, p. 130–141, 2016. DOI: 10.1016/j.micres.2016.06.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501316300830>. Acesso em: 12 fev. 2025.

GARCEZ, ML. Aumento da atividade de ecto-nucleotidases em hipocampo de camundongos adulto-velhos tratados ou não com cafeína [dissertação de mestrado]. 2013. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, 2013. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/5780/1/Adriani%20Paganini%20Damiani.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2025.

GARMANY, Armin; YAMADA, Satsuki; TERZIC, Andre. Longevity leap: mind the healthspan gap. *npj Regenerative Medicine*, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 57, 2021. DOI: 10.1038/s41536-021-00169-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41536-021-00169-5>. Acesso em: 12 nov. 2025.

GAWISH, Azza M.; ELFIKY, Samya; THERASE, Mary; ABDELRAAOF, Amira; KHALIL, Wagdi; MOHAMED, Karima A. Sperm abnormality toxicity due to cyclosporine A and the ameliorative effect of royal jelly in male rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology, Cell Biology and Genetics*. [S. l.], v. 76, **Cell Biology and Genetics**, p. 60–73, 2016. DOI: 10.1016/j.jobaz.2016.12.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090989616300613>. Acesso em: 17 jul. 2024.

GHANBARI, Elham; NEJATI, Vahid; NAJAFI, Gholamreza; KHAZAEI, Mozafar; BABAEI, Mohammad. Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Fertility & Sterility**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 113–120, 2015. DOI: 10.22074/ijfs.2015.4215.

GILLESPIE, Leah et al. Exposure of mice to environmentally relevant per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) alters the sperm epigenome. **Communications Biology**, [S. l.], v. 8, p. 1487, 2025. DOI: 10.1038/s42003-025-08865-4. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12568938/>. Acesso em: 11 nov. 2025.

GROSSMANN, Mathis; WIERMAN, Margaret E.; ANGUS, Peter; HANDELSMAN, David J. Reproductive Endocrinology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 417–446, 2019. DOI: 10.1210/er.2018-00158. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2018-00158>. Acesso em: 30 nov. 2025.

HAJAM, Younis Ahmad et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. **Cells**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 552, 2022. DOI: 10.3390/cells11030552. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8833991/>. Acesso em: 18 nov. 2025.

HAMILTON, Thais Rose Dos Santos; ASSUMPCÃO, Mayra Elena Ortiz D'Ávila. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. **Zygote (Cambridge, England)**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1017/S0967199419000595. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/abs/sperm-dna-fragmentation-causes-and-identification/DB3330B783B2B923B52D7F11D1BF5B14>. Acesso em: 14 nov. 2025.

HASSAN, A. A. Effect of royal jelly on sexual efficiency in adult male rats. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, [S. l.], v. 23, n. Supplement 2, 2009. DOI: 10.33899/ijvs.2009.189552. Disponível em: [https://www.vetmedmosul.com/article\\_189552\\_ba4720abf815fa3708d0bd2bf7f0d35e.pdf](https://www.vetmedmosul.com/article_189552_ba4720abf815fa3708d0bd2bf7f0d35e.pdf). Acesso em: 2 dez. 2025.

HEMAGIRRI, Manisekaran; SASIDHARAN, Sreenivasan. Biology of aging: Oxidative stress and RNA oxidation. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 5089–5105, 2022. DOI: 10.1007/s11033-022-07219-1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-022-07219-1>. Acesso em: 18 nov. 2025.

HOQUE, Mohammed; KIM, Eunice N.; CHEN, Danny; LI, Feng-Qian; TAKEMARU, Ken-Ichi. Essential Roles of Efferent Duct Multicilia in Male Fertility. **Cells**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 341, 2022. DOI: 10.3390/cells11030341. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8834061/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

IBGE (ORG.). Pesquisa Nacional de Saúde. Rio de Janeiro, RJ: Ibge, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html>. Acesso em: 30 nov. 2024.

IEGAKI, Noriyuki; NARITA, Yukio; HATTORI, Noriko; HIRATA, Yoko; ICHIHARA, Kenji. Royal jelly reduces depression-like behavior through possible effects on adrenal steroidogenesis in a murine model of unpredictable chronic mild stress. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 606–612, 2020. DOI: 10.1080/09168451.2019.1691496. Disponível em: <https://academic-oup-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/bbb/article-abstract/84/3/606/5937543?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 13 nov. 2025.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. PNS 2019: Frequent users of SUS see quality of its Primary Health Care Services mostly positive | News Agency. 2020. Disponível em: [https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/en/agencia-press-room/2185-news-agency/releases-en/29207-pns-2019-frequent-users-of-sus-see-quality-of-its-primary-health-care-services-mostly-positive?utm\\_source](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/en/agencia-press-room/2185-news-agency/releases-en/29207-pns-2019-frequent-users-of-sus-see-quality-of-its-primary-health-care-services-mostly-positive?utm_source). Acesso em: 30 nov. 2025.

ISOLA, José V. V.; HENSE, Jessica D.; OSÓRIO, César A. P.; BISWAS, Subhasri; ALBEROLA-ILA, José; OCAÑAS, Sarah R.; SCHNEIDER, Augusto; STOUT, Michael B. Reproductive Ageing: Inflammation, immune cells, and cellular senescence in the aging ovary. **Reproduction (Cambridge, England)**, [S. l.], v. 168, n. 2, p. e230499, 2024. DOI: 10.1530/REP-23-0499. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11301429/>. Acesso em: 19 nov. 2025.

JAMES, Emma R.; CARRELL, Douglas T.; ASTON, Kenneth I.; JENKINS, Timothy G.; YESTE, Marc; SALAS-HUETOS, Albert. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. **International Journal of Molecular**

**Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 15, p. 5377, 2020. DOI: 10.3390/ijms21155377. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7432785/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

KAEBERLEIN, Matt. How healthy is the healthspan concept? **GeroScience**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 361–364, 2018. DOI: 10.1007/s11357-018-0036-9. Disponível em: <https://link.springer.com.ez318.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s11357-018-0036-9>. Acesso em: 18 nov. 2024.

KANELIS, Dimitrios; TANANAKI, Chrysoula; LIOLIOS, Vasilis; DIMOU, Maria; GORAS, Georgios; RODOPOULOU, Maria Anna; KARAZAFIRIS, Emmanuel; THRASYVOULOU, Andreas. A suggestion for royal jelly specifications / Prijedlog globalnih standarda za matičnu mliječ. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 275–284, 2015. DOI: 10.1515/aiht-2015-66-2651. Disponível em: <https://sciendo.com/article/10.1515/aiht-2015-66-2651>. Acesso em: 13 fev. 2025.

KASMAN, Alex M.; DEL GIUDICE, Francesco; EISENBERG, Michael L. New insights to guide patient care: the bidirectional relationship between male infertility and male health. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 113, n. 3, p. 469–477, 2020. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2020.01.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028220300029>. Acesso em: 20 nov. 2025.

KOBAYASHI, Genki; ICHIKAWA, Takahiro; OKAMURA, Takuro; MATSUYAMA, Tomoyuki; HAMAGUCHI, Masahide; OKAMOTO, Hideto; OKUMURA, Nobuaki; FUKUI, Michiaki. A Study of Small Intestinal Epigenomic Changes Induced by Royal Jelly. **Cells**, [S. l.], v. 13, n. 17, p. 1419, 2024. DOI: 10.3390/cells13171419. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11393943/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

KOCH, Stefan; ACEBRON, Sergio P.; HERBST, Jessica; HATIBOGLU, Gencay; NIEHRS, Christof. Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. **Cell**, [S. l.], v. 163, n. 5, p. 1225–1236, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.029. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867415013434>. Acesso em: 27 nov. 2025.

KOCOT, Joanna; KIEŁCZYKOWSKA, Małgorzata; LUCHOWSKA-KOCOT, Dorota; KURZEPA, Jacek; MUSIK, Irena. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2018, p. 7074209, 2018. DOI: 10.1155/2018/7074209. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5954854/>. Acesso em: 21 maio. 2024.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, [S. l.], v. 455, n. 1–2, p. 155–166, 2000. DOI: 10.1016/s0027-5107(00)00117-2. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com.ez318.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0027510700001172?via%3Dihub>. Acesso em: 25 nov. 2025.

KUNUGI, Hiroshi; MOHAMMED ALI, Amira. Royal Jelly and Its Components Promote Healthy Aging and Longevity: From Animal Models to Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 19, p. 4662, 2019. DOI: 10.3390/ijms20194662. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6802361/>. Acesso em: 13 maio. 2024.

- ŁAKOMA, Klaudia; KUKHARUK, Olha; ŚLIŹ, Daniel. The Influence of Metabolic Factors and Diet on Fertility. **Nutrients**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 1180, 2023. DOI: 10.3390/nu15051180. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/5/1180>. Acesso em: 9 jul. 2025.
- LEBEL, Carl P.; ISCHIROPOULOS, Harry; BONDY, Stephen C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992. DOI: 10.1021/tx00026a012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx00026a012>. Acesso em: 7 jun. 2024.
- LEE, Joong Won; KIM, Jin Sik; LEE, Hee Jae; JANG, Ji-Hye; KIM, Ja-Hyun; SIM, Woo Jong; LIM, Yong-beom; JUNG, Ji-Won; LIM, Hyun Joung. Age and Gender Effects on Genotoxicity in Diesel Exhaust Particles Exposed C57BL/6 Mice. **Biomolecules**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 374, 2021. DOI: 10.3390/biom11030374. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/3/374>. Acesso em: 2 dez. 2025.
- LEMOINE, Maël. Defining aging. **Biology & Philosophy**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 46, 2020. DOI: 10.1007/s10539-020-09765-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10539-020-09765-z>. Acesso em: 2 out. 2024.
- LIAO, Chen-Yu; RIKKE, Brad A.; JOHNSON, Thomas E.; DIAZ, Vivian; NELSON, James F. Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening. **Aging Cell**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 92–95, 2010. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2009.00533.x. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1111/j.1474-9726.2009.00533.x>. Acesso em: 13 nov. 2025.
- LIN, Ming-Huei; MORSHEDI, Mahmood; SRISOMBUT, Chartchai; NASSAR, Ahmed; OEHNINGER, Sergio. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-y staining. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 1148–1155, 1998. DOI: 10.1016/S0015-0282(98)00351-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028298003513>. Acesso em: 13 nov. 2025.
- LINGAPPA, Hemalatha Anthanahalli; GOVINDASHETTY, Abhishek Mandya; KRISHNAMURTHY, Anoosha; PUTTAVEERACHARY, Ashok Kagathur; MANCHAIHAH, Sanjay; SHIMOGA, Indira Channagangappa; MALLARADHYA, Sushma Hulikere; GOWDA, Sarvesh Ballekoppa Mukunda. Quest for An Ideal, Simple and Cost-Effective Stain for Morphological Assessment of Sperms. **Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. EC01–EC04, 2015. DOI: 10.7860/JCDR/2015/13270.6655. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4625243/>. Acesso em: 14 nov. 2025.
- LÓPEZ-DIAZGUERRERO, Norma E.; LUNA-LÓPEZ, Armando; GUTIÉRREZ-RUIZ, María C.; ZENTELLA, Alejandro; KÖNIGSBERG, Mina. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice. **Life Sciences**, [S. l.], v. 77, n. 22, p. 2840–2854, 2005. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.05.034. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320505005266>. Acesso em: 25 nov. 2025.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos; BLASCO, Maria A.; PARTRIDGE, Linda; SERRANO, Manuel; KROEMER, Guido. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, [S. l.], v. 186, n. 2, p. 243–278, 2023a. DOI: 10.1016/j.cell.2022.11.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867422013770>. Acesso em: 15 maio. 2024.

LÓPEZ-OTÍN, Carlos; BLASCO, Maria A.; PARTRIDGE, Linda; SERRANO, Manuel; KROEMER, Guido. The hallmarks of aging. *Cell*, [S. l.], v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013b. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(13\)00645-4](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(13)00645-4). Acesso em: 7 jun. 2025.

LUO, Jiao; MILLS, Kevin; LE CESSIE, Saskia; NOORDAM, Raymond; VAN HEEMST, Diana. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Research Reviews*, [S. l.], v. 57, p. 100982, 2020. DOI: 10.1016/j.arr.2019.100982. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163719301746>. Acesso em: 5 jun. 2024.

MAROTO, María; TORVISCO, Sara N.; GARCÍA-MERINO, Cristina; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, Raúl; PERICUESTA, Eva. Mechanisms of Hormonal, Genetic, and Temperature Regulation of Germ Cell Proliferation, Differentiation, and Death During Spermatogenesis. *Biomolecules*, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 500, 2025. DOI: 10.3390/biom15040500. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12025078/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

MARTINELLO, Marianna; MUTINELLI, Franco. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 71, 2021. DOI: 10.3390/antiox10010071. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/1/71>. Acesso em: 28 nov. 2025.

MASFIAH, Siti; KURNIALANDI, Alfarid; MEIJ, Johannes Jacobus; MAIER, Andrea Britta. Definitions of healthspan: A systematic review. *Ageing Research Reviews*, [S. l.], v. 111, p. 102806, 2025. DOI: 10.1016/j.arr.2025.102806. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1568163725001527?via%3Dihub>. Acesso em: 18 nov. 2025.

MAVOURNIN, Kathleen H.; BLAKEY, David H.; CIMINO, Michael C.; SALAMONE, Michael F.; HEDDLE, John A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, [S. l.], v. 239, n. 1, p. 29–80, 1990. DOI: 10.1016/0165-1110(90)90030-F. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016511109090030F>. Acesso em: 25 fev. 2025.

MENDONÇA. Efeito do exercício físico voluntário associado com o consumo de cafeína no comportamento e estresse oxidativo em camundongos adultos-velhos [dissertação de mestrado]. 2011. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/bitstream/1/5780/1/Adriani%20Paganini%20Damiani.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2025.

MIDDELKAMP, Sjors; VAN TOL, Helena T. A.; SPIERINGS, Diana C. J.; BOYMANS, Sander; GURYEV, Victor; ROELEN, Bernard A. J.; LANSDORP, Peter M.; CUPPEN, Edwin; KUIJK, Ewart W. Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic

development. **Science Advances**, [S. l.], v. 6, n. 16, p. eaaz7602, 2020. DOI: 10.1126/sciadv.aaz7602. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7159919/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Vigitel Brasil 2023: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília, DF, Brasil: Ministério da Saúde — Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente (SVSA), 2023. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2023-vigilancia-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas-por-inquerito-telefonico/%40%40download/file?utm\\_source](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2023-vigilancia-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas-por-inquerito-telefonico/%40%40download/file?utm_source). Acesso em: 30 nov. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Relatório Anual de Ações do Departamento de Promoção da Saúde 2020*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio\\_anual\\_acoes\\_promocao\\_saude.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_anual_acoes_promocao_saude.pdf). Acesso em: 2 dez. 2025.

MIYATA, Yasuyoshi; SAKAI, Hideki. Anti-Cancer and Protective Effects of Royal Jelly for Therapy-Induced Toxicities in Malignancies. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 3270, 2018. DOI: 10.3390/ijms19103270. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/10/3270>. Acesso em: 17 fev. 2025.

MOHAMED, Amany Abdel-Rahman; GALAL, Azza A. A.; ELEWA, Yaser H. A. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. **Acta Histochemica**, [S. l.], v. 117, n. 7, p. 649–658, 2015. DOI: 10.1016/j.acthis.2015.07.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065128115001105>. Acesso em: 20 maio. 2024.

NAINU, Firzan; MASYITA, Ayu; BAHAR, Muh. Akbar; RAIHAN, Muhammad; PROVA, Shajuthi Rahman; MITRA, Saikat; EMRAN, Talha Bin; SIMAL-GANDARA, Jesus. Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. **Antibiotics**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 822, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10070822. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8300842/>. Acesso em: 4 jun. 2024.

NAZAR-ZADEH, Mahsa; JALILI, Cyrus; NIKGOFTAR FATHI, Amene; GHANBARI, Ali; BAKHTIARI, Mitra. Royal-jelly-based apitherapy can attenuate damages to male reproductive parameter following nicotine administration. **Animal Models and Experimental Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 133–140, 2022. DOI: 10.1002/ame2.12217.

NEZAMI MAJD, Mahdieh; SADEGHI-HASHJIN, Goudarz; MALEKINEJAD, Hassan; RASSOULI, Ali. Hepatoprotective effect of royal jelly on dibutyl phthalate-induced liver injury in rats. **Veterinary Research Forum**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 97–105, 2025. DOI: 10.30466/vrf.2024.2033878.4338. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11910981/>. Acesso em: 28 nov. 2025.

OMAR, Eman M.; EL-SAYED, Norhan S.; ELNOZAHY, Fatma Y.; HASSAN, Eman; AMR, Alaa; AUGUSTYNIK, Maria; EL-SAMAD, Lamia M.; EL WAKIL, Abeer. Reversal Effects of Royal Jelly and Propolis Against Cadmium-Induced Hepatorenal Toxicity in Rats. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 202, n. 4, p. 1612–1627, 2024. DOI: 10.1007/s12011-023-03775-0.

ORŠOLIĆ, Nada; JAZVINŠČAK JEMBREK, Maja. Royal Jelly: Biological Action and Health Benefits. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 6023, 2024. DOI: 10.3390/ijms25116023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/11/6023>. Acesso em: 13 nov. 2025.

PASUPULETI, Visweswara Rao; SAMMUGAM, Lakshmi; RAMESH, Nagesvari; GAN, Siew Hua. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2017, p. 1259510, 2017. DOI: 10.1155/2017/1259510. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1155/2017/1259510>. Acesso em: 19 nov. 2024.

PINTUS, Eliana; ROS-SANTAELLA, José Luis. Impact of Oxidative Stress on Male Reproduction in Domestic and Wild Animals. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1154, 2021. DOI: 10.3390/antiox10071154. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8301082/>. Acesso em: 18 nov. 2025.

PLUNK, Elizabeth C.; RICHARDS, Sean M. Endocrine-Disrupting Air Pollutants and Their Effects on the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 23, p. 9191, 2020. DOI: 10.3390/ijms21239191. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7731392/>. Acesso em: 19 nov. 2025.

POLSINELLI, Gregory A.; YU, Hongwei D. Regulation of histone deacetylase 3 by metal cations and 10-hydroxy-2E-decenoic acid: Possible epigenetic mechanisms of queen-worker bee differentiation. **Public Library of Science One**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. e0204538, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0204538. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6287826/>. Acesso em: 17 fev. 2025.

POORMOOSAVI, Seyedeh Mahsa; JANATI, Sima; NAJARIAN, Mahyar; BEHMANESH, Mohammad Amin. The Effect of Royal Jelly Supplement on Frozen-Thawed Semen Quality and the Oxidant/Antioxidant Status. **Journal of Advanced Immunopharmacology**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2024. DOI: 10.5812/jai-138485. Disponível em: <https://brieflands.com/journals/jai/articles/138485>. Acesso em: 13 nov. 2025.

POTUKUCHI, Aruna; ADDEPALLY, Uma; SINDHU, Kirankumar; MANCHALA, Raghunath. Increased total DNA damage and oxidative stress in brain are associated with decreased longevity in high sucrose diet fed WNIN/Gr-Ob obese rats. **Nutritional Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 648–656, 2018. DOI: 10.1080/1028415X.2017.1332509. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1028415X.2017.1332509>. Acesso em: 7 jun. 2025.

ROUDSARI, Robab Latifnejad; SHARIFI, Farangis; GOUDARZI, Fatemeh. Barriers to the participation of men in reproductive health care: a systematic review and meta-synthesis. **BMC Public Health**, [S. l.], v. 23, p. 818, 2023. DOI: 10.1186/s12889-023-15692-x. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10158256/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

RUTHRAKUMAR, Ravichandran; SABARINATHAN, Murugan; DHANUSH, Manokaran; KALAIYARASAN, Venkatachalam; GOPIKRISHNAN, Duraisamy; PALANISAMY, Mahakrishnan; SELVARAJU, Mani. Effectiveness of Giemsa and Modified Trypan Blue-Giemsa Staining for the Assessment of Acrosome Integrity in Bull and Buck semen. **The Indian Journal of Animal Reproduction**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 53–57, 2024. DOI:

10.48165/ijar.2024.45.01.12. Disponível em:  
<https://journals.acspublisher.com/index.php/ijar/article/view/12623>. Acesso em: 13 nov. 2025.

SÁNCHEZ-GARRIDO, Miguel Angel; GARCÍA-GALIANO, David; TENA-SEMPERE, Manuel. Early programming of reproductive health and fertility: novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. **Human Reproduction Update**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 346–375, 2022. DOI: 10.1093/humupd/dmac005. Disponível em:  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9071071/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

SANTOS, Patrícia Andrade Dos; RIBEIRO, Vânia Maria França; ALVES, Augusto Luiz Faino; SILVA, Vanessa Lima Da; NASCIMENTO, Breno Kalyl Freitas; SATRAPA, Rafael Augusto; SOUZA, Fernando Andrade. Morfologia, morfometria e integridade da membrana de espermatozoides epididimários de paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus 1766). **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 181–190, 2020. DOI: 10.5433/1679-0359.2020v41n1p181. Disponível em:  
<https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/36093>. Acesso em: 13 nov. 2025.

SCHUMACHER, Björn; POTHOF, Joris; VIJG, Jan; HOEIJMAKERS, Jan H. J. The central role of DNA damage in the ageing process. **Nature**, [S. l.], v. 592, n. 7856, p. 695–703, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03307-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03307-7>. Acesso em: 18 abr. 2025.

SHARMA, Priyanka; SAMPATH, Harini. Mitochondrial DNA Integrity: Role in Health and Disease. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 100, 2019. DOI: 10.3390/cells8020100. Disponível em:  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6406942/>. Acesso em: 20 nov. 2025.

SIAMETIS, Athanasios; NIOTIS, George; GARINIS, George A. DNA Damage and the Aging Epigenome. **Journal of Investigative Dermatology, Aging and the Skin: A Special Issue**. [S. l.], v. 141, n. 4, Supplement, Aging and the Skin: A Special Issue, p. 961–967, 2021. DOI: 10.1016/j.jid.2020.10.006. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X20321928>. Acesso em: 20 fev. 2025.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0. Disponível em:  
<https://www-sciencedirect-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0014482788902650?via%3Dihub>. Acesso em: 23 fev. 2025.

SOHAL, Rajindar S.; ORR, William C. The Redox Stress Hypothesis of Aging. **Free radical biology & medicine**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 539–555, 2012. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.445. Disponível em:  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3267846/>. Acesso em: 2 dez. 2025.

STAVROS, Sofoklis et al. Sperm DNA Fragmentation: Unraveling Its Imperative Impact on Male Infertility Based on Recent Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 18, p. 10167, 2024. DOI: 10.3390/ijms251810167. Disponível em:  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11432134/>. Acesso em: 27 nov. 2025.

TAKALANI, Ndivhuho B.; MONAGENG, Elizabeth M.; MOHLALA, Kutullo; MONSEES, Thomas K.; HENKEL, Ralf; OPUWARI, Chinyerum S. Role of oxidative stress in male infertility. **Reproduction & Fertility**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. e230024, 2023. DOI: 10.1530/RAF-23-0024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10388648/>. Acesso em: 18 nov. 2025.

TAYLOR, J. D.; BAUMGARTNER, A.; SCHMID, T. E.; BRINKWORTH, M. H. Responses to genotoxicity in mouse testicular germ cells and epididymal spermatozoa are affected by increased age. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 310, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.04.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427419300980>. Acesso em: 11 jun. 2025.

TOHAMY, Hossam G.; GAD EL-KARIM, Dina R.; EL-SAYED, Yasser S. Attenuation potentials of royal jelly against hydroxyurea-induced infertility through inhibiting oxidation and release of pro-inflammatory cytokines in male rats. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 26, n. 21, p. 21524–21534, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-05521-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05521-3>. Acesso em: 21 mar. 2025.

VANDENBERG, Laura N.; WELSHONS, Wade V.; VOM SAAL, Frederick S.; TOUTAIN, Pierre-Louis; MYERS, John Peterson. Should oral gavage be abandoned in toxicity testing of endocrine disruptors? **Environmental Health**, [S. l.], v. 13, p. 46, 2014. DOI: 10.1186/1476-069X-13-46. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4069342/>. Acesso em: 25 nov. 2025.

VAUGHAN, D. A.; TIRADO, E.; GARCIA, D.; DATTA, V.; SAKKAS, D. DNA fragmentation of sperm: a radical examination of the contribution of oxidative stress and age in 16 945 semen samples. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 2188–2196, 2020. DOI: 10.1093/humrep/deaa159. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa159>. Acesso em: 20 nov. 2025.

VIEIRA, Carolina Pinhol; MARTINS LARA, Nathalia de Lima E; PROCÓPIO, Marcela Santos; AVELAR, Gleide Fernandes. Optimization of spermatozoa analysis in mice: A comprehensive protocol. **Tissue and Cell**, [S. l.], v. 89, p. 102463, 2024. DOI: 10.1016/j.tice.2024.102463. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040816624001642>. Acesso em: 26 nov. 2024.

WALKER, Mary K.; BOBERG, Jason R.; WALSH, Mary T.; WOLF, Valerie; TRUJILLO, Alishia; DUKE, Melissa Skelton; PALME, Rupert; FELTON, Linda A. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 260, n. 1, p. 65–69, 2012. DOI: 10.1016/j.taap.2012.01.025. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3306547/>. Acesso em: 25 nov. 2025.

WANG, Jing; LUO, Yuchuan; HE, Yifeilong; LI, Wanzhen; QIN, Yinghe; WU, Yingjie. Astaxanthin Alleviates the Decline of Sperm Quality Caused by Heat Stress in Mice via Reducing Oxidative Stress. **Life**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 851, 2025. DOI: 10.3390/life15060851. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/15/6/851>. Acesso em: 11 nov. 2025.

WANG, Si; REN, Jie; JING, Ying; QU, Jing; LIU, Guang-Hui. Perspectives on biomarkers of reproductive aging for fertility and beyond. **Nature Aging**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 1697–1710, 2024. DOI: 10.1038/s43587-024-00770-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s43587-024-00770-5>. Acesso em: 19 nov. 2025.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 77, p. 325–333, 1981. DOI: 10.1016/s0076-6879(81)77046-0. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez318.periodicos.capes.gov.br/science/chapter/bookseries/abs/pii/S0076687981770460?via%3Dihub>. Acesso em: 23 fev. 2025.

WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed ed. Geneva: World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>. Acesso em: 2 jun. 2025.

WHO. 1 in 6 people globally affected by infertility: WHO. 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>. Acesso em: 18 nov. 2025.

YANG, Anshu; ZHOU, Ming; ZHANG, Li; XIE, Guoxiu; CHEN, Hongbing; LIU, Zhiyong; MA, Wei. Influence of royal jelly on the reproductive function of puberty male rats. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1834–1840, 2012. DOI: 10.1016/j.fct.2012.02.098. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512001822>. Acesso em: 2 dez. 2025.

YANG, Wei et al. Age-dependent changes of the antioxidant system in rat livers are accompanied by altered MAPK activation and a decline in motor signaling. **EXCLI Journal**, [S. l.], v. 14, p. 1273–1290, 2015. DOI: 10.17179/excli2015-734. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4800781/>. Acesso em: 2 dez. 2025.

YIN, Qiangzong et al. Revisiting chromatin packaging in mouse sperm. **Genome Research**, [S. l.], v. 33, n. 12, p. 2079–2093, 2023. DOI: 10.1101/gr.277845.123.

ZAHMATKESH, Ensieh; NAJAFI, Gholamreza; NEJATI, Vahid; HEIDARI, Reza. Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 43–52, 2014. DOI: 10.22038/ajp.2014.896. Disponível em: [https://ajp.mums.ac.ir/article\\_896.html](https://ajp.mums.ac.ir/article_896.html). Acesso em: 12 jun. 2025.

## ANEXO A – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**Universidade do Extremo Sul Catarinense**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade da suplementação de geleia real em camundongos jovens e velhos.
<b>Project title</b>	Evaluation of genotoxicity and mutagenicity of royal jelly supplementation in young and old mice.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	40/2023
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	VANESSA MORAES DE ANDRADE
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Júlia Vicenzi de Carvalho, Vitória Fernandes Américo, Lívia Dal Pont Silva, Bianca Fernandes Scarpari, Izabely Souza dos Santos, Helen Barbosa Vicente, João Vitor Antunes de Lima, Letícia Zanatta Alberton, Nicole Lovison Bastian, Otávio Lúcio Possamai, Rafaela Cristina Silva de Almeida, Isadora de Oliveira Monteiro, Nicollas dos Santos da Silva, Adriani Paganini Damiani, Marcelo Morganti Sant'Anna, Marina Lummertz Magenis, Roberta Albino Machado, Vanessa Moraes de Andrade, Wanessa de Fáveri, Guilherme Bonfante Martinello, Guilherme Spindola Pacheco, Davi da Silveira Martins, Leticia da Silveira Ugioni, Ana Júlia Bressan, Gabriela Mezzari Juvêncio, Amanda Gasperin Velho, Maria Laura Geremias
<b>Finalidade</b>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	01/06/2024 a 30/09/2025
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Camundongo heterogênico / Swiss
<b>Idade/Peso</b>	3 meses / 30-35g
<b>Número de animais</b>	Masculino 20 / Feminino 20
<b>Masculino 60 / Feminino 60</b>	12 meses / 30-35g
<b>Número de animais</b>	Masculino 60 / Feminino 60
<b>Idade/Peso</b>	6 meses / 30-35g
<b>Número de animais</b>	Masculino 20 / Feminino 20
<b>Procedência</b>	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 28 de maio de 2025

*Josiane Budni*

**Josiane Budni**  
**Coordenadora da CEUA**