

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

SETOR MORFOLOGIA

Efeitos da Restrição Proteica Materna na matriz extracelular da Próstata Dorsolateral de ratos velhos.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Aluno:

Renato Mattos

Graduação em Ciências biológicas - Bacharel, IBB/UNESP – Botucatu

Orientador:

Prof. Dr. Luís Antônio Justulin Junior

Departamento Biologia Funcional e Estrutural, Setor Morfologia, IBB/UNESP– Botucatu.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da Restrição Proteica Materna na matriz extracelular da Próstata Dorsolateral de ratos velhos.

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Justulin
Junior

Botucatu
2025

M444e Mattos, Renato
 Efeitos da Restrição Proteica Materna na matriz
 extracelular da Próstata Dorsolateral de ratos velhos. /
 Renato Mattos. -- Botucatu, 2025
 28 p. : tabs., fotos

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
 Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
 Instituto de Biociências, Botucatu
 Orientador: Luis Antonio Justulin Junior

 1. Morfologia (Animais). 2. Próstata. 3. Programação
 fetal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados
fornecidos pelo autor(a).


Renato Mattos

**Efeitos da Restrição Proteica Materna na matriz extracelular da
Próstata Dorsolateral de ratos velhos.**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biológicas.

Local, 17 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR**
Data: 18/07/2025 11:00:05-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Luis Antonio Justulin Junior
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP
-Orientador-

Wellerson Rodrigo
Scarano:18932210
837

Assinado de forma digital
por Wellerson Rodrigo
Scarano:18932210837
Dados: 2025.07.18
11:55:57 -03'00'

Prof. Wellerson Rodrigo Scarano
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP

Agradecimentos

Aos colegas do DBMOL, por todas as experiências compartilhadas e pelos momentos enriquecedores vividos juntos.

Aos laboratórios parceiros: **LabMEC**, em nome do professor Dr. Sérgio Felisbino; **LabDECA**, em nome do professor Dr. Wellerson Scarano; **LabME**, em nome da professora Dra. Maeli Dal Pai; e **ICBLab**, em nome da professora Dra. Flavia Karina Delella.

Ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (morfologia), por todo suporte estrutural e técnico.

Ao meu orientador, Dr. Luis Antonio Justulin Junior, pela oportunidade e todos os ensinamentos compartilhados.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/Proc.: 2019/01374-8)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** meu profundo reconhecimento pelo suporte essencial à pesquisa. O apoio concedido por meio de bolsas de estudos foi fundamental para a realização deste trabalho.

Por fim, meu sincero respeito e gratidão aos **animais experimentais**, cuja contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho.

RESUMO

MATTOS, R. **Efeitos da Restrição Proteica Materna na matriz extracelular da Próstata Dorsolateral de ratos velhos.** Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências biológicas (bacharelado) - Instituto de Biociências de Botucatu/Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2025.

A exposição a insultos durante períodos críticos do desenvolvimento, como gestação, lactação e a primeira infância pode induzir alterações morfofuncionais irreversíveis no feto, fenômeno conhecido como Programação Fetal (PF). A restrição proteica materna (RPM), um modelo consolidado de PF, está associada a baixo peso ao nascer, desregulação dos níveis de hormônios esteroides ao longo da vida e alterações em diversos sistemas, incluindo o genital masculino e a glândula prostática. A próstata é uma glândula exócrina do sistema genital masculino que cumpre um papel importante no sucesso reprodutivo, sendo frequentemente acometida por patologias como hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata ao envelhecimento. Evidências sugerem que alterações estruturais e inflamatórias no tecido prostático podem promover lesões, aumentando sua reatividade e predisposição à carcinogênese. Diante disso, este estudo investigou os efeitos da RPM na matriz extracelular (MEC) da próstata dorsolateral (PDL) de ratos senescentes. Ratos Sprague Dawley gestantes foram distribuídas em dois grupos: Controle (CTR), dieta normoproteica (17% de proteína) durante a gestação e lactação; e Gestational and Lactational Low-Protein diet (GLLP) - dieta hipoproteica (6%) no mesmo período. Aos 540 dias pós-natais, os filhotes machos foram eutanasiados e a PDL coletada para análises morfométricas, quantificação de mastócitos, colágeno total, expressão proteica de componentes da MEC e atividade gelatinolítica. Os resultados revelaram aumento da fração epitelial e redução do estroma, maior densidade de mastócitos e atividade gelatinolítica aumentada da MMP-2 na PDL do grupo GLLP. Conclui-se que a RPM promove um microambiente prostático alterado na senescência, caracterizado por remodelação da MEC e inflamação, e destaca o DOHaD como peça-chave na gênese de doenças prostáticas do idoso.

Palavras-chave: próstata, DOHaD, restrição proteica materna e matriz extracelular.

ABSTRACT

MATTOS, R. **Effects of Maternal Protein Restriction on the Extracellular Matrix of the Dorsolateral Prostate of Old Rats**. Undergraduate Thesis in Biological Sciences (Bachelor's Degree) - Botucatu Institute of Biosciences/São Paulo State University (UNESP), Botucatu, 2025.

Exposure to insults during critical periods of development, such as pregnancy, lactation, and early childhood, can induce irreversible morphofunctional changes in the fetus, a phenomenon known as Fetal Programming (FP). Maternal protein restriction (MPR), a well-established model of FP, is associated with low birth weight, dysregulation of steroid hormone levels throughout life, and alterations in several systems, including the male genitals and prostate gland. The prostate is an exocrine gland of the male genital system that plays an important role in reproductive success and is frequently affected by pathologies such as benign prostatic hyperplasia and prostate cancer during aging. Evidence suggests that structural and inflammatory changes in prostate tissue can promote lesions, increasing its reactivity and predisposing it to carcinogenesis. Therefore, this study investigated the effects of MPR on the extracellular matrix (ECM) of the dorsolateral prostate (DLP) of senescent rats. Pregnant Sprague Dawley rats were divided into two groups: Control (CTR), a normal-protein diet (17% protein) during gestation and lactation; and Gestational and Lactational Low-Protein Diet (GLLP) - a low-protein diet (6%) during the same period. At 540 postnatal days, male pups were euthanized, and the PDL (DHL) was collected for morphometric analysis, quantification of mast cells, total collagen, protein expression of ECM components, and gelatinolytic activity. The results revealed an increased epithelial fraction and reduced stroma, higher mast cell density, and increased MMP-2 gelatinolytic activity in the PDL of the GLLP group. It is concluded that PDL promotes an altered prostate microenvironment in senescence, characterized by ECM remodeling and inflammation, and highlights DOHaD as a key player in the genesis of prostate diseases in the elderly.

Keywords: prostate, DOHaD, maternal protein restriction, and extracellular matrix.

Sumário

1. ENUNCIADO DA PROBLEMÁTICA	9
1.1 Conceito DOHaD e Restrição Proteica Materna	10
1.2 Próstata e Matriz Extracelular	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivos gerais	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Animais.....	14
4.5 Western blot.....	17
4.6 Zimografia	17
4.7 Análise estatística	18
5. RESULTADOS.....	18
5.1 Morfologia glandular	18
5.2 Colágenos totais.....	19
5.3 Contagem de mastócito	19
5.4 Expressão proteica	19
5.5 Atividade gelatinolítica.....	20
6. Discussão.....	20
7. CONCLUSÃO	22
8. REFERÊNCIAS	23

1. ENUNCIADO DA PROBLEMÁTICA

Estudos recentes têm consolidado evidências consistentes sobre o impacto de exposições adversas precoces, como a desnutrição, estresse gestacional, ingestão de substâncias nocivas e alterações metabólicas na elevação do risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) na idade adulta. Conforme demonstrado por Mericq et al., (2017) e Justulin et al., (2023), essa associação enfatiza o papel crucial de períodos críticos do desenvolvimento, especialmente a fase intrauterina e a primeira infância, na reprogramação de funções fisiológicas, um princípio fundamental para compreender iniquidades em saúde.

Um exemplo muito bem documentado é o episódio do Inverno da Fome Holandesa (1944-1945). Durante o bloqueio nazifascista alemão à Holanda, a população holandesa enfrentou grave insegurança alimentar, com gestantes consumindo apenas 400-800 calorias diárias, abaixo de um terço das necessidades energéticas recomendadas. Essa situação possibilitou que Ravelli, Stein e Susser (1976) analisassem, anos mais tarde, como a carência nutricional intrauterina influenciou a saúde da geração seguinte, fornecendo dados pioneiros sobre a plasticidade do feto e suas repercussões transgeracionais. Os achados revelaram consequências preocupantes: adultos cujas mães vivenciaram fome no primeiro trimestre gestacional apresentaram maior prevalência de obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, mesmo em contextos nutricionalmente adequados.

Na década de 1980, o epidemiologista David Barker transformou o campo ao evidenciar, em coortes históricas britânicas, que neonatos com peso reduzido (< 2,5 kg) possuíam risco substancialmente maior de desenvolver doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta. Sua pesquisa fundamental em Hertfordshire (Barker *et al.*, 1989) constatou que indivíduos nascidos entre 1911 e 1930 com restrição de crescimento intrauterino tinham 2,7 vezes mais probabilidade de óbito por cardiopatia isquêmica. Tais descobertas fundamentaram a Hipótese de Barker, posteriormente expandida para a teoria das origens fetais das doenças do adulto (FOAD), que propõe que adaptações fetais a ambientes adversos, como a priorização de nutrientes para órgãos essenciais, podem tornar-se desadaptativas após o nascimento, favorecendo disfunções (Calkins e Devaskar, 2011; Hanson e Gluckman, 2011).

O conceito de Programação Fetal (PF) (Lucas, 1991) ampliou essa perspectiva, indicando que não apenas fatores nutricionais, mas também estresse materno, agentes infecciosos e poluentes podem alterar a expressão gênica e a fisiologia orgânica. A PF atua mediante mecanismos adaptativos que possibilitam ao feto responder a condições desfavoráveis. Por exemplo, sob desnutrição materna, nutrientes são redirecionados para órgãos

vitais (cérebro, coração), comprometendo o desenvolvimento de outros sistemas, como rins e pâncreas (Hales e Barker, 2001). Essa estratégia inicialmente protetora pode revelar-se prejudicial em ambientes pós-natais com recursos abundantes.

O conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) ou "Origens do Desenvolvimento da Saúde e das Doenças" emergiu como um avanço científico ao evidenciar que a saúde adulta é profundamente moldada por exposições ambientais, nutricionais e psicossociais em períodos críticos do desenvolvimento, desde a pré-concepção aos primeiros anos. Esse modelo ampliou a Hipótese de Barker, inicialmente centrada na correlação entre baixo peso ao nascer e patologias cardiovasculares, ao integrar mecanismos epigenéticos, contaminação por poluentes, estresse materno e dinâmicas sociais. Essa visão integral explica como condições precoces alteram percursos fisiológicos. Um pilar central do DOHaD é a existência de janelas de suscetibilidade, fases de intensos processos e com maior vulnerabilidade a agressões externas.

Entretanto, desafios significativos permanecem. A desigualdade social potencializa os riscos associados ao DOHaD, comunidades marginalizadas enfrentam maior exposição à poluição atmosférica, insegurança alimentar e violência, fatores que se combinam para perpetuar ciclos intergeracionais de adoecimento (O'Reilly, 2022). Adicionalmente, novos agentes como desreguladores endócrinos presentes em plásticos e agrotóxicos representam uma preocupação crescente no contexto global, demandando políticas regulatórias mais efetivas (Maradonna, Vandenberg e Meccariello, 2022; Matisova *et al.*, 2012; Stroustrup e Swan, 2024).

1.1 Conceito DOHaD e Restrição Proteica Materna

A restrição proteica materna (RPM) aplicada a ratas durante a gestação e/ou lactação constitui um modelo experimental amplamente utilizado em pesquisas sobre DOHaD (Jahan-Mihan *et al.*, 2015; Langley-Evans, 2020). Um desafio significativo associado à subnutrição materna é o *catch-up growth* (crescimento compensatório), processo no qual indivíduos com restrição de crescimento intrauterino ou desnutrição fetal exibem crescimento acelerado após o nascimento, frequentemente atingindo padrões considerados normais. Embora aparentemente vantajoso, essa recuperação rápida está associada a maior propensão para doenças metabólicas e cardiovasculares na idade adulta, evidenciando a intrincada interação entre adaptações fetais e ambiente pós-natal (Hales e Barker, 2001; Jahan-Mihan *et al.*, 2015; Langley-Evans, 2020; Law *et al.*, 1992, 2002; Valdez *et al.*, 1994).

Durante a gestação, o organismo fetal adapta-se a condições adversas para garantir sobrevivência. Por exemplo, fetos expostos à desnutrição desenvolvem mecanismos de "economia energética", como redução da massa muscular e modificações na função hepática, para priorizar o desenvolvimento cerebral (conforme a hipótese do fenótipo econômico (Hales e Barker, 2001). Após o nascimento, com acesso à nutrição adequada, ocorre o crescimento compensatório para recuperar o déficit inicial. Contudo, esse processo pode sobrecarregar sistemas metabolicamente programados para escassez, gerando (Lucas, Fewtrell e Cole, 1999).

Nesse cenário, a literatura demonstra que a RPM induz alterações específicas em diversos órgãos. No fígado, observa-se redução da proliferação celular, modificações na expressão gênica de hepatócitos e mudanças no perfil antioxidante (Campisano *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2018; Ramadan, Alshiraihi e Al-karim, 2013). O pâncreas mostra diminuição no número de células β e na secreção de insulina (Morimoto *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2016). No sistema nervoso central, a RPM afeta a estrutura, bioquímica e número de neurônios (Gould *et al.*, 2018). O sistema renal apresenta redução vitalícia no número de néfrons (Rizzi *et al.*, 2017), enquanto o sistema respiratório exibe diminuição de alvéolos pulmonares, redução da vascularização, alterações na produção de surfactante, impactos na ação de metaloproteinases e modificações no proteoma pulmonar, tanto precocemente quanto durante o envelhecimento, afetando estrutura pulmonar, defesa antioxidante e imunidade (Khazaei *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2014; Naia Fioretto, Maciel, *et al.*, 2024).

A RPM também compromete a função reprodutiva em modelos animais, desencadeando disfunções hormonais e morfológicas. A fertilidade é severamente prejudicada, com redução na contagem espermática no dia pós-natal (DPN) 270, associada à diminuição de células de Sertoli e desorganização dos túbulos seminíferos (Zambrano *et al.*, 2005). Esses danos são agravados por alterações na proliferação de células germinativas, aumento do estresse oxidativo testicular e redução da capacidade antioxidante no esperma e tecidos reprodutivos (Bautista *et al.*, 2017; Rodríguez-González *et al.*, 2012, 2014). No epidídimo, verificam-se redução de peso, hipovascularização e imaturidade ductal, refletindo comprometimento da maturação espermática dependente de andrógenos (Cavariani *et al.*, 2019; Santos, T. de M. *et al.*, 2019).

Há três décadas, William Gardner propôs uma hipótese visionária: "The origins of prostatic diseases, including carcinoma, are to be found in the in utero influences upon the developing prostate" (Gardner, 1995). Essa proposição pioneira sugeria que fatores ambientais e hormonais durante o desenvolvimento embrionário e fetal, como disruptores endócrinos, fitoestrógenos na

dieta materna e desequilíbrios esteroidais, poderiam modular permanentemente a biologia prostática, predispondo a lesões na maturidade.

Estudos recentes de nosso grupo demonstraram que a RPM afeta o desenvolvimento e o envelhecimento prostático. Colombelli *et al.*, (2017) relataram que ratos expostos à RPM durante a gestação e/ou lactação apresentaram, na próstata ventral (PV), redução do tamanho dos ácinos glandulares e comprometimento da angiogênese, indicando atraso no desenvolvimento glandular. Na senescência (DPN 540), (Santos, S. A. A. *et al.*, 2019) detectaram maior incidência de lesões como displasia epitelial, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e carcinoma *in situ*. Alterações proteômicas na próstata senescente revelaram enriquecimento de vias relacionadas à sinalização estrogênica, funções do retículo endoplasmático e metabolismo energético (Alcantara Santos *et al.*, 2020), enquanto (Portela *et al.*, 2021) identificaram estresse oxidativo intraprostático e desregulação de biomarcadores de câncer de próstata (CaP). Recentemente, (Naia Fioretto, Colombelli, *et al.*, 2024) observaram aumento na infiltração de células imunes associada à RPM, exacerbada pelo consumo pós-natal de açúcar, e (Mattos *et al.*, 2025) descreveram alterações estereológicas, inflamatórias e redox no lobo dorsolateral. Para elucidar mecanismos epigenéticos, (Santos *et al.*, 2022) realizaram análises transcriptômicas e de small RNA-seq, identificando desregulação do miR-18a-5p na PV de animais idosos sob RPM – a qual modula o gene *P4hb*, uma isomerase crucial para o dobramento proteico no retículo endoplasmático, possivelmente vinculada à carcinogênese. (Portela *et al.*, 2023) relataram superexpressão do miR-206 na PV de ratos jovens sob RPM, correlacionada à redução de receptores estrogênicos e aumento da deposição de colágeno. Além disso, (Baptista *et al.*, 2024) identificaram clusters de piRNAs associados ao envelhecimento e ao CaP em resposta à RPM.

Assim, a RPM estabelece-se como um modelo translacional robusto para elucidar como condições adversas nutricionais precoces reconfiguram sistemas fisiológicos, predispondo a doenças crônicas na maturidade.

1.2 Próstata e Matriz Extracelular

A próstata é uma glândula acessória do sistema genital masculino, cujo desenvolvimento e homeostasia encontram-se sob controle androgênico (Cunha *et al.*, 1987). Ela secreta um complexo proteolítico composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolizina, enzimas específicas, agentes imunossupressores e outros fatores componentes do fluido seminal (Marker *et al.*, 2003), fundamentais para o sucesso reprodutivo, pois liquefaz o ejaculado,

garante a motilidade e protege os espermatozoides dos danos imunológicos causados pelo sistema genital feminino (Aumüller e Seitz, 1990; Maccioni, Cabezas e Rivero, 2003).

Em ratos, a próstata é dividida em lobos distintos, sendo o ventral, dorsal, lateral e anterior, cada um com características únicas de MEC. Os lobos dorsal e lateral (PDL = próstata dorsolateral) são comumente estudados em conjunto, sendo o objeto de estudo deste trabalho. A próstata de roedores é uma glândula ductal composta, sem ácinos, revestida por epitélio pseudoestratificado colunar com células secretoras e células basais. Diferenças regionais são marcantes: as regiões distais (pontas dos ductos) têm alta atividade proliferativa e secretora, enquanto as proximais (próximas à uretra) apresentam epitélio cuboidal e expressam antígenos uroteliais. O estroma circunda os ductos com camadas concêntricas de músculo liso, fibroblastos e MEC, com proporção epitélio-estroma de ~5:1 em ratos (Cunha *et al.*, 1987)

A MEC é um componente fundamental dos tecidos, composta por uma rede dinâmica de macromoléculas como colágenos, elastina, glicoproteínas (e.g., fibronectina, laminina) e proteoglicanos. Essa estrutura tridimensional fornece suporte mecânico e regula processos celulares críticos, incluindo adesão, migração e diferenciação (LeBleu, MacDonald e Kalluri, 2007; Rowe e Weiss, 2009). As fibras de colágeno e elásticas conferem resistência e flexibilidade, enquanto glicoproteínas facilitam a adesão celular via integrinas. Os proteoglicanos modulam a arquitetura da MEC, controlam sua permeabilidade e regulam a biodisponibilidade de fatores de crescimento e proteases (Tuxhorn, Ayala e Rowley, 2001).

Na próstata, o estroma composto por fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas que secretam fatores de crescimento, sintetiza MEC, expressa receptores hormonais e 5- α redutase. A MEC prostática é rica em colágeno tipo I/III (conferem rigidez) e laminina (essencial para polaridade epitelial) (Berry, Maitland e Collins, 2008; Cunha *et al.*, 2018). Alterações em sua composição estão ligadas a hiperplasia benigna e câncer, onde desequilíbrios na síntese/degradação levam a fibrose ou perda de integridade tecidual. O remodelamento do colágeno tipo I facilita a migração tumoral e progressão do CaP (Bonnans, Chou e Werb, 2014; Fang *et al.*, 2014).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) compreendem uma família de proteases dependentes de zinco que catalisam a clivagem de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina e laminina (Nabeshima *et al.*, 2002). Entre as MMPs, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) demonstram capacidade para degradar colágenos de estrutura anômala e os tipos IV, V, VII e IX. Dentre elas, a MMP-9 é a enzima responsável pela degradação do colágeno tipo IV, sendo o principal constituinte da membrana basal. Estudos

recentes revelaram seu envolvimento em processos biológicos como apoptose, angiogênese, diferenciação celular, respostas imunes e progressão tumoral (Mook, Frederiks e Noorden, Van, 2004). A avaliação da atividade proteolítica desta metaloproteinase é fundamental para elucidar os mecanismos de dano e regeneração da membrana basal, bem como a decomposição patológica do colágeno em condições como aterosclerose, neoplasias e artrite reumatoide (Björklund e Koivunen, 2005; Busti *et al.*, 2010; Egeblad e Werb, 2002; Murphy e Nagase, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos da restrição proteica materna (RPM) sobre a matriz extracelular (MEC) da próstata dorsolateral (PDL) de ratos velhos.

3.2 Objetivos Específicos

1. Análise estereológica dos compartimentos prostáticos;
2. Quantificação da área total de deposição de colágeno;
3. Contagem de mastócitos;
4. Avaliar a expressão proteica de colágeno, fibronectina, TGF- β ;
5. Atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Sprague Dawley*, com peso entre 250 e 300 g, machos e fêmeas adultas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. O uso experimental e científico desses animais passou pelo crivo e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu, sob o protocolo CEUA nº 7376171224. Os animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Roedores do Setor de Morfologia, em caixas de polietileno, com dois animais por caixa, utilizando substrato de maravalha autoclavada. As condições de manejo incluirão controle de luminosidade e temperatura média de 25°C, além de água filtrada e ração à vontade (*ad libitum*). Após um período de adaptação, ratas com 3 meses de idade foram colocadas em caixas junto com machos, utilizando o sistema de harém (3 fêmeas para 1 macho) para o acasalamento. A prenhez foi confirmada por esfregaço vaginal, e 24 ratas foram alocadas aleatoriamente em

caixas individuais, divididas em dois grupos experimentais: o grupo Controle (CTR, n=12), que receberá uma dieta padrão com 17% de proteína durante a gestação e lactação, e o grupo de Restrição Proteica Gestacional e Lactacional (GLLP, n=12), que foi alimentado com uma dieta com 6% de proteína durante os mesmos períodos. Ambas as dietas foram isocalóricas e normossódicas (0,20%), utilizando a ração AIN-93 modificada (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993), conforme detalhado na Tabela 1. Imediatamente após o nascimento, foi padronizado o número de filhotes para oito por rata, mantendo uma proporção de 1:1 entre machos e fêmeas, a fim de evitar alterações no cuidado materno com a prole. Para a fase experimental, foram selecionados quatro filhotes (um macho de cada mãe) que foram eutanasiados no DPN 21 e 540. No momento da eutanásia, a PDL foi dissecada, coletada, pesada e processadas para diferentes análises: 1. Congelada a -80°C, até o momento de extração de proteínas; 2. Fixadas, para histotécnicas, em Methacarn (60% metanol + 30% clorofórmio + 10% ácido acético) por 4 horas (Puchtler *et al.*, 1970). Após a fixação, o material passará pelo processo de desidratação em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast (Sigma). Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo com 5 µm de espessura, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento do uso em colorações por azul de toluidina e Picrossirius red.

Tabela 2. Composição das rações nas diferentes dietas oferecidas durante o experimento.

Ingredientes	Normoproteica	Hipoproteica
	(17 % de proteína g/kg)	(6 % de proteína g/kg)
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Fibra pH 101 ou pH 102 (microcelulose)	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais AIN93G**	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G**	10	10
Cloridrato de Colina ou Bitartarato de Colina	2,5	2,5

** para reconhecer composição detalhada do mix de sais e vitaminas, consultar (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta é elaborada pela empresa PragSoluções (PragSoluções, Jaú, SP, Brasil)

4.2 Análise estereológica

Amostras da PDL de animais no PND540 (n=6/grupo) foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e adicionadas ao Paraplast após repouso de 4 horas no fixador. Em um micrótomo rotativo, secções de 5 µm de Paraplast foram fatiadas e colocadas em lâminas silanizadas. As secções de parafina foram coradas com Hematoxilina-Eosina para análise morfológica e morfométrica. As imagens foram produzidas utilizando uma câmera digital acoplada ao microscópio (Leica DM2500) e um software de análise de imagens (Leica LAS V4.5). Nessas análises, as proporções relativas dos componentes do DLP (epitélio, lúmen e estroma) foram determinadas por análise estereológica (Weibel, Kistler e Scherle, 1966). Os resultados foram expressos como uma porcentagem de cada componente e uma proporção da área total analisada.

4.3 Quantificação de colágenos totais

Os cortes histológicos (n = 6/grupo) foram inicialmente submetidos à desparafinização em xilol (2 × 5 minutos) e reidratação em série alcoólica decrescente (álcool absoluto 100%, 90%, 80% e 70%, 5 minutos cada). Em seguida, as lâminas foram imersas em água destilada por 5 minutos para equilíbrio. Para a coloração, as amostras foram incubadas em solução saturada de ácido pícrico por 20 minutos, seguidas de imersão em solução de Picrosirius Red (0,1% em ácido pícrico saturado) por 1 minuto. Após lavagem em água destilada para remoção do corante residual, as lâminas retornarão à solução de ácido pícrico por 4 minutos para diferenciação. Em seguida, os cortes foram rapidamente desidratados em álcool absoluto 100% (2 × 15 segundos) e clarificados em xilol (2 × 3 minutos). Finalmente, as lâminas foram montadas com meio resinoso adequado (ex.: Entellan®) e secas à temperatura ambiente. A análise foi realizada em um microscópio Leica DM2500 e fotodocumentados pelo analisador de imagens no *software* Leica LAS V4.5 para análises quantitativas no *software* Fiji.app.

4.4 Contagem de mastócitos

Os cortes prostáticos (n = 6/grupo) foram corados com azul de toluidina, o que permitiu a visualização e análise dos mastócitos no estroma dessa glândula. As imagens foram produzidas utilizando uma câmera digital acoplada ao microscópio (Leica DM2500) e um software de análise de imagens (Leica LAS V4.5). As contagens foram realizadas em 10 fotomicrografias (barra de escala em 40x) por animal cada animal. Técnica adotada por (Mendes *et al.*, 2014).

4.5 Western blot

As PDLs (n = 6) foram homogeneizadas em tampão de extração RIPA (Pierce, Rockford, IL, EUA) suplementado com inibidores de proteases. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm e 4°C por 20 minutos para remoção de debris celulares e material insolúvel. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford50 (MM, 1976). Aliquotas contendo 70 µg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, sob condições redutoras com β-mercaptoetanol. Posteriormente à eletroforese, as proteínas foram transferidas por eletroblotagem para membranas de nitrocelulose Hybond™ ECL (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). As membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado a 5% em TBS-T (Tris-Buffered Saline com 0,1% Tween-20) por 1 hora, para redução de ligações inespecíficas. Em seguida, foram incubadas durante 16 horas a 4°C com anticorpo primário descrito na Tabela 2. Após três lavagens em TBS-T (10 minutos cada), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário específico (diluído em TBS-T) por 2 horas em temperatura ambiente. Para determinação do peso molecular, foi utilizado o padrão Kaleidoscope™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), incluído na corrida eletroforética. A detecção das bandas foi realizada com o kit de quimioluminescência ECL™, e as imagens foram capturadas no sistema ImageQuant™ 350 (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). As análises semi-quantitativas foram feitas por densitometria das bandas utilizando o software ImageJ (NIH, EUA), e os valores de densidade óptica integrada (IOD) foram submetidos a análise estatística.

Tabela 2. Lista de anticorpos que foram utilizados no Western blot.

Anticorpo	Fabricante/Lote	Dilution
AR	Abcam/ab133273	1:1000
Colageno 1	Abcam/ab270993	1:1000
TGF-β	Abcam/ab215715	1:2000

4.6 Zimografia

O ensaio de zimografia de gelatina foi realizado conforme descrito por Justulin et al., (2010). Brevemente, lobos de VP congelados (n = 6/grupo) foram homogeneizados em tampão RIPA (50 mM de Tris pH 7,5 com 0,25% de Triton-X 100), centrifugados, e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford50 (MM, 1976). Aliquotas contendo 28 µg de proteína foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida com 0,1% de gelatina (8% de acrilamida), utilizando o sistema MiniProtean II da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc.,

Richmond, CA, EUA). Em seguida, os géis foram lavados sob agitação em solução de Triton-X 100 a 2,5% e incubados overnight em tampão de 50 mM Tris-HCl (pH 8,4), contendo 5 mM de CaCl₂ e 1 μM de ZnCl₂, a 37 °C. Posteriormente, os géis foram corados com Azul de Coomassie, e as áreas de proteólise foram quantificadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA). Os resultados foram expressos em variação relativa (fold change) como média ± desvio padrão.

4.7 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPadPrism® (versão 5.00, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). Os resultados foram submetidos à análise de normalização (teste de Shapiro-Wilk). Em seguida cada teste foi realizado por testes t (paramétrico ou não-paramétrico). As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Morfologia glandular

A análise estereológica da PDL no DPN 540 revelou alterações estruturais significativas no grupo GLLP. Houve uma expansão epitelial com aumento no número e tamanho dos dobramentos, e redução estromal, contrastando com a arquitetura glandular homogênea do grupo CTR, como mostra a Figura 1.

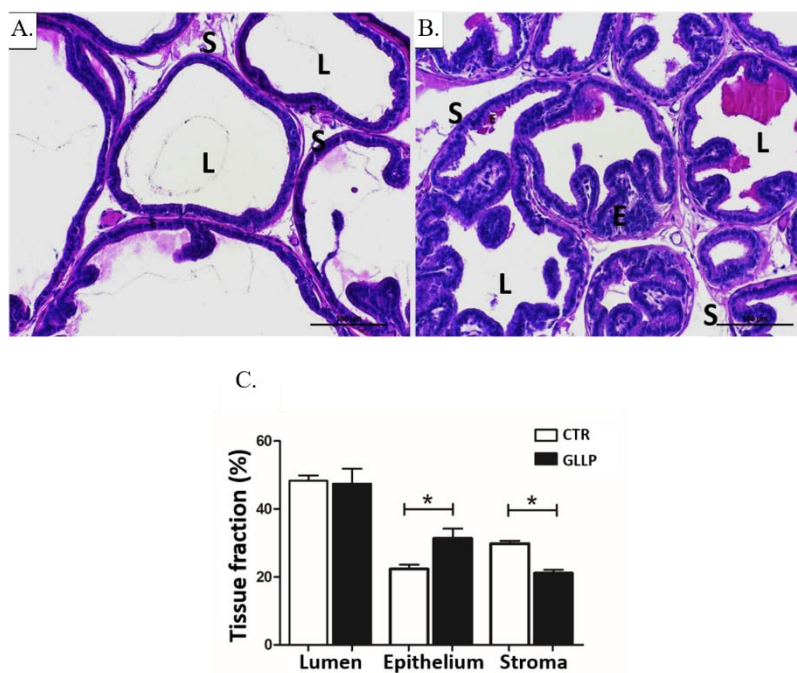


Figura 1. Morfologia da PDL dos grupos CTR (A) e GLLP (B) no DPN 540. Análise estereológica dos compartimentos prostáticos da PDL (C). * Diferença estatística com $p > 0,05$.

5.2 Colágenos totais

Embora alterações estruturais tenham sido observadas, a deposição de colágeno total permaneceu inalterada entre os grupos CTR e GLLP na análise da histocoloração por Picrosirius Red (Figura 2).

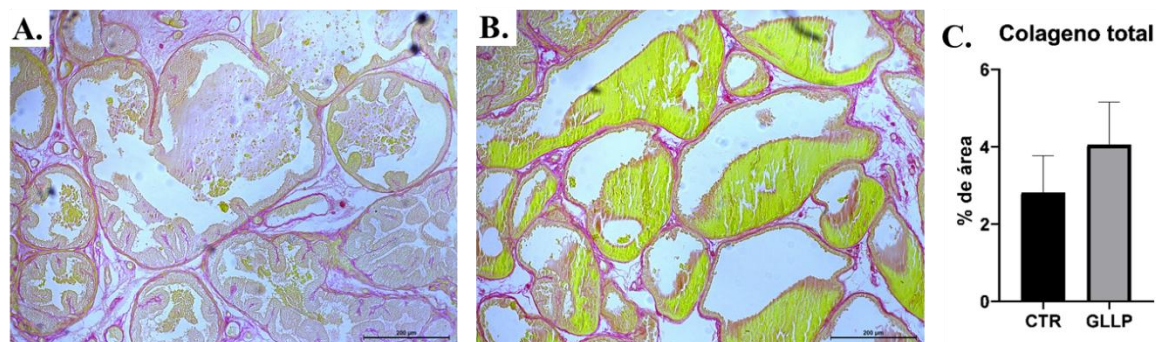


Figura 2. Quantificação de colágenos totais (C) da PDL de ratos velhos nos grupos CTR (A) e GLLP (B). * Diferença estatística com $p > 0,05$.

5.3 Contagem de mastócito

Na coloração de Azul de Toluidina para a contagem de mastócitos, podemos perceber, visualmente, uma maior aglomeração dessas células nos animais do grupo GLLP. Foi realizada a contagem e constatamos uma maior presença de mastócitos no estroma glandular dos animais do grupo GLLP, quando comparado ao CTR (Figura 3).

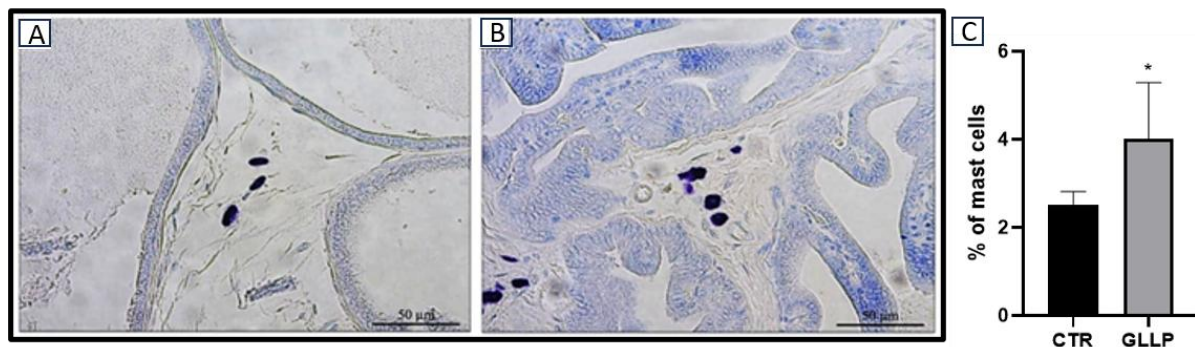


Figura 3. A contagem de mastócitos na PDL de animais no DPN 540 revelou uma maior abundância no grupo GLLP. * Diferença estatística com $p > 0,05$.

5.4 Expressão proteica

As análises de expressão proteica por Western blot para Colágeno I, TGF- β e receptor de andrógeno (AR) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos CTR e GLLP (Figura 4).

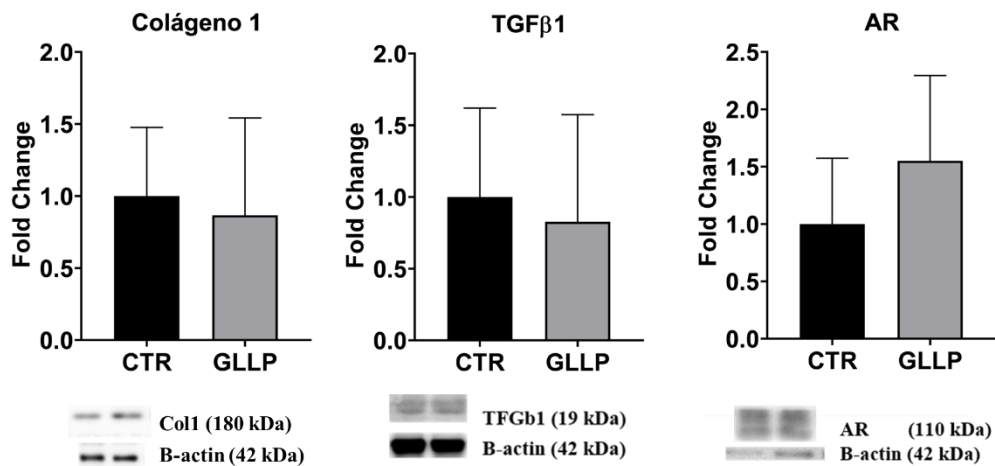


Figura 4. Análise de expressão proteica por Western Blot de Colágeno I, TGF- β e AR. * Diferença estatística com $p > 0,05$.

5.5 Atividade gelatinolítica

A quantificação da atividade gelatinolítica das MMPs por zimografia demonstrou um aumento na MMP-2, enquanto na MMP-9 não houve diferença significativa.

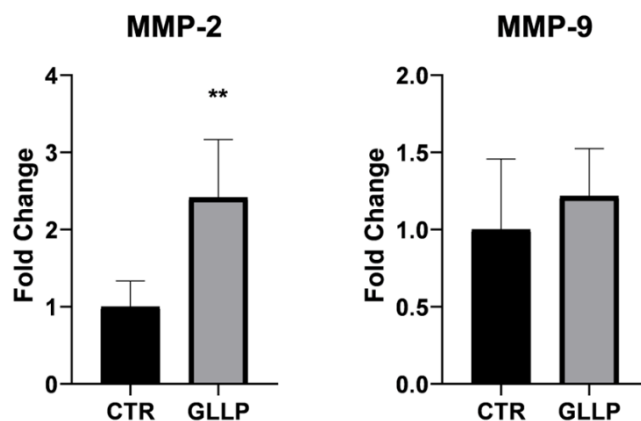


Figura 5. Atividade gelatinolítica das MMPs-2 e 9 quantificadas por zimografia. * Diferença estatística com $p > 0,05$.

6. DISCUSSÃO

A RPM impacta na arquitetura glandular, em células inflamatórias e na remodelação tecidual. Os dados morfométricos revelam os impactos estruturais, enquanto nos animais do grupo CTR a glândula possui ácinos dilatados, com grandes regiões lisas e íntegras de epitélio, características normais do epitélio prostático de um animal adulto (Cunha *et al.*, 2018; Marker *et al.*, 2003), os animais do grupo GLLP apresentaram ácinos menos dilatados e aumento no número e tamanho de dobras epiteliais. A formação acentuada dessas “pregas” epiteliais pode representar uma tentativa adaptativa de ampliar a superfície secretora frente a um

microambiente estromal comprometido, sendo um mecanismo observado em estágios iniciais de desordens prostáticas (Marzo, De *et al.*, 2007; Sfanos *et al.*, 2018).

Os mastócitos são células que participam de processos inflamatórios, uma vez que elas possuem em seu citoplasma grânulos contendo moléculas pró-inflamatórias, tais como histamina, heparan sulfato, prostaglandinas, entre outros fatores (Bischoff, 2007). O aumento desse tipo celular na glândula prostática pode estar relacionado ao aumento da inflamação tecidual, e esta quando persistente, tem sido ligada ao processo de carcinogênese (M e SK, 2013). Este estudo revelou um aumento significativo no recrutamento dessas células inflamatórias na PDL do grupo GLLP. Esse achado é particularmente evidente na presença elevada de mastócitos, que desempenham papéis cruciais na resposta imune e na homeostase tecidual. Os mastócitos são bem conhecidos por seu envolvimento em reações alérgicas e modulação inflamatória por meio da secreção de histaminas, citocinas e proteases (Galli, Tsai e Piliponsky, 2008; Mukai *et al.*, 2018). Esses mediadores podem alterar o microambiente tecidual, promovendo o recrutamento de células imunes adicionais e contribuindo para a inflamação crônica observada em desordens prostáticas (Messex e Liou, 2023; Naia Fioretto, Colombelli, *et al.*, 2024; Zhao *et al.*, 2021).

A elevação significativa da atividade realizada pela MMP-2 e da normalidade referente à MMP-9 revela um padrão seletivo de regulação no microambiente prostático. A dissociação observada no perfil de atividade gelatinolítica entre as MMPs pode ser contextualizada pela especificidade bioquímica das gelatinases. Enquanto a MMP-2 demonstra maior eficiência catalítica sobre colágenos basais (tipos IV e V) e componentes da lâmina basal, a MMP-9 está mais fortemente implicada em processos inflamatórios agudos e remodelação de colágeno intersticial. A elevação isolada da MMP-2 sugere, portanto, a ativação preferencial de vias de remodelação tecidual crônica, possivelmente vinculada aos processos fibróticos previamente documentados neste modelo experimental, enquanto a estabilidade da MMP-9 sugere ausência de inflamação aguda, compatível com um processo crônico de baixo grau. Notavelmente, a superexpressão de MMP-2 correlaciona-se com redução na sobrevida de pacientes com CaP (Trudel *et al.*, 2003, Trudel *et al.*, 2008), bem como pode ser impulsionada pelo estresse oxidativo intraprostático (Portela *et al.*, 2021) e sinalização estrogênica alterada (Rodríguez-González *et al.*, 2014; Santos, S. A. A. *et al.*, 2019; Zambrano *et al.*, 2005) observados neste modelo.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que a RPM estabelece um microambiente alterado na MEC da próstata senil, caracterizado pela arquitetura prostática impactada, maior abundância de células inflamatórias e desregulação no remodelamento da MEC. Esses dados reforçam o DOHaD como peça-chave na gênese de doenças prostáticas do idoso, sugerindo que intervenções nutricionais precoces podem mitigar riscos futuros.

8. REFERÊNCIAS

- ALCANTARA SANTOS, S. A. *et al.* Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Aging**, v. 12, n. 20, p. 19954–19978, 1 jan. 2020.
- AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein Secretion and Secretory Processes in Male Accessory Sex Glands. **International Review of Cytology**, v. 121, n. C, p. 127–231, 1 jan. 1990.
- BAPTISTA, H. S. *et al.* Influence of aging and maternal protein restriction on PIWI-interacting RNA expression in the offspring rat ventral prostate. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.
- BARKER, D. J. P. *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 298, n. 6673, p. 564–567, 1989.
- BAUTISTA, C. J. *et al.* Maternal obesity in the rat impairs male offspring aging of the testicular antioxidant defence system. **Reproduction, fertility, and development**, v. 29, n. 10, p. 1950–1957, 2017.
- BERRY, P. A.; MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 288, n. 1–2, p. 30–37, 25 jun. 2008.
- BISCHOFF, S. C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. **Nature Reviews Immunology** 2007 7:2, v. 7, n. 2, p. 93–104, fev. 2007.
- BJÖRKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1755, n. 1, p. 37–69, 25 maio 2005.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2014 15:12, v. 15, n. 12, p. 786–801, 21 nov. 2014.
- BUSTI, C. *et al.* Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. **Internal and Emergency Medicine**, v. 5, n. 1, p. 13–25, 2010.
- CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal Origins of Adult Disease. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 41, n. 6, p. 158–176, 1 jul. 2011.
- CAMPISANO, S. E. *et al.* Protein malnutrition during fetal programming induces fatty liver in adult male offspring rats. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 275–285, 1 maio 2017.

- CAVARIANI, M. M. *et al.* Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019.
- COLOMBELLI, K. T. *et al.* Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and comparative endocrinology**, v. 246, p. 258–269, 15 maio 2017.
- CUNHA, G. R. *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987.
- _____. Development of the human prostate. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 103, p. 24–45, 1 set. 2018.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, 2002.
- FANG, M. *et al.* Collagen as a double-edged sword in tumor progression. **Tumor Biology**, v. 35, n. 4, p. 2871–2882, 1 abr. 2014.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445–454, 24 jul. 2008.
- GARDNER, W. A. Hypothesis: the prenatal origins of prostate cancer. **Human pathology**, v. 26, n. 12, p. 1291–1292, 1995.
- GOULD, J. M. *et al.* Mouse maternal protein restriction during preimplantation alone permanently alters brain neuron proportion and adult short-term memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 31, p. E7398–E7407, 31 jul. 2018.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. **British Medical Bulletin**, v. 60, n. 1, p. 5–20, 1 nov. 2001.
- HANSON, M.; GLUCKMAN, P. Developmental origins of noncommunicable disease: Population and public health implications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 6, 1 dez. 2011.
- JAHAN-MIHAN, A. *et al.* The Role of Maternal Dietary Proteins in Development of Metabolic Syndrome in Offspring. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9185–9217, 6 nov. 2015.
- JUSTULIN, L. A. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 696–708, out. 2010.
- JUSTULIN, L. A. *et al.* Editorial: Early Life Epigenetic Programming of Health and Disease through DOHaD Perspective. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 11, 10 fev. 2023.

KHAZAEI, R. *et al.* Maternal protein restriction during perinatal life affects lung mechanics and the surfactant system during early postnatal life in female rats. **PloS one**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019.

LANGLEY-EVANS, S. Nutrigenetics and the Early Life Origins of Health and Disease: Effects of Protein Restriction. **Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics: Fundamentals of Individualized Nutrition**, p. 113–119, 1 jan. 2020.

LAW, C. M. *et al.* Early growth and abdominal fatness in adult life. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 46, n. 3, p. 184–186, 1 jun. 1992.

LAW, C. M. *et al.* Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: A longitudinal study from birth to 22 years of age. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1088–1092, 5 mar. 2002.

LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 9, p. 1121–1129, out. 2007.

LIU, X. *et al.* Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 6, p. 3101, 2014.

LUCAS, A.; FEWTRELL, M. S.; COLE, T. J. Fetal origins of adult disease—the hypothesis revisited. **BMJ**, v. 319, n. 7204, p. 245–249, 24 jul. 1999.

MACCIONI, M.; CABEZAS, L. E.; RIVERO, V. E. Effect of prostatein, the major protein produced by the rat ventral prostate, on phagocytic cell functions. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 6, p. 473–480, dez. 2003.

MARADONNA, F.; VANDENBERG, L. N.; MECCARIELLO, R. Editorial: Endocrine-Disrupting Compounds in Plastics and Their Effects on Reproduction, Fertility, and Development. **Frontiers in Toxicology**, v. 4, p. 886628, 25 mar. 2022.

MARKER, P. C. *et al.* Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, 15 jan. 2003.

MARTIN, L. J. *et al.* Maternal High-Protein and Low-Protein Diets Perturb Hypothalamus and Liver Transcriptome and Metabolic Homeostasis in Adult Mouse Offspring. **Frontiers in genetics**, v. 9, 11 dez. 2018.

MARTINS, I. P. *et al.* Protein-restriction diet during the suckling phase programs rat metabolism against obesity and insulin resistance exacerbation induced by a high-fat diet in adulthood. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 57, p. 153–161, 1 jul. 2018.

MARZO, A. M. DE *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, abr. 2007.

MATISOVA, E. *et al.* Endocrine disrupting pesticides. **Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides**, 25 jul. 2012.

- MATTOS, R. *et al.* Maternal malnutrition induces inflammatory pathways and oxidative stress in the dorsolateral prostate of male offspring rats. **Biogerontology**, v. 26, n. 3, p. 1–15, 1 jun. 2025.
- MENDES, L. O. IVEIRA *et al.* Testosterone therapy differently regulates the anti- and pro-inflammatory cytokines in the plasma and prostate of rats submitted to chronic ethanol consumption (UChB). **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 72, n. 3, p. 317–325, 1 set. 2014.
- MERICQ, V. *et al.* Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 50–62, 1 jan. 2017.
- MESSEX, J. K.; LIOU, G. Y. Impact of Immune Cells in the Tumor Microenvironment of Prostate Cancer Metastasis. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2023.
- MM, B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- MOOK, O. R. F.; FREDERIKS, W. M.; NOORDEN, C. J. F. VAN. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1705, n. 2, p. 69–89, 17 dez. 2004.
- MORIMOTO, S. *et al.* Developmental programming of aging of isolated pancreatic islet glucose-stimulated insulin secretion in female offspring of mothers fed low-protein diets in pregnancy and/or lactation. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 3, n. 6, p. 483–488, 1 dez. 2012.
- MUKAI, K. *et al.* Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. **Immunological reviews**, v. 282, n. 1, p. 121–150, 1 mar. 2018.
- MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 290–308, out. 2009.
- NABESHIMA, K. *et al.* Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. **Pathology International**, v. 52, n. 4, p. 255–264, 2002.
- NAIA FIORETTO, M.; COLOMBELLI, K. T.; *et al.* Maternal malnutrition associated with postnatal sugar consumption increases inflammatory response and prostate disorders in rat offspring. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 588, 1 jul. 2024.
- NAIA FIORETTO, M.; MACIEL, F. A.; *et al.* Impact of maternal protein restriction on the proteomic landscape of male rat lungs across the lifespan. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 592, 1 out. 2024.
- O'REILLY, K. Unsustainable inequalities: social justice and the environment. **International Affairs**, v. 98, n. 3, p. 1093–1095, 9 maio 2022.

- PORTELA, L. M. *et al.* Increased oxidative stress and cancer biomarkers in the ventral prostate of older rats submitted to maternal malnutrition. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 523, 1 mar. 2021.
- PORTELA, L. M. F. *et al.* Early-life origin of prostate cancer through deregulation of miR-206 networks in maternally malnourished offspring rats. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.
- PUCHTLER, H. *et al.* Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. **Histochemie. Histochemistry. Histochimie**, v. 21, n. 2, p. 97–116, jun. 1970.
- RAMADAN, W. S.; ALSHIRAIHI, I.; AL-KARIM, S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 195, n. 1, p. 68–76, jan. 2013.
- RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **The New England journal of medicine**, v. 295, n. 7, p. 349–353, 12 ago. 1976.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.
- RIZZI, V. H. G. *et al.* Impact of long-term high-fat diet intake gestational protein-restricted offspring on kidney morphology and function. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 8, n. 1, p. 89–100, 1 fev. 2017.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L. *et al.* Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 3, n. 5, p. 321–326, out. 2012.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L. *et al.* Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. **Age**, v. 36, n. 6, p. 9721, 21 nov. 2014.
- ROWE, R. G.; WEISS, S. J. Navigating ECM barriers at the invasive front: The cancer cell-stroma interface. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 25, n. Volume 25, 2009, p. 567–595, 10 nov. 2009.
- SANTOS, S. A. A. *et al.* Maternal Low-Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis With Aging. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 74, n. 6, p. 751–759, 16 maio 2019.
- SANTOS, S. A. A. *et al.* miR-18a-5p Is Involved in the Developmental Origin of Prostate Cancer in Maternally Malnourished Offspring Rats: A DOHaD Approach. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 23, 1 dez. 2022.

- SANTOS, T. DE M. *et al.* Maternal Protein Restriction Modulates Angiogenesis and AQP9 Expression Leading to a Delay in Postnatal Epididymal Development in Rat. **Cells**, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.
- SFANOS, K. S. *et al.* The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature reviews. Urology**, v. 15, n. 1, p. 11–24, 1 jan. 2018.
- STROUSTRUP, A.; SWAN, S. H. Endocrine Disruptors. **Textbook of Children's Environmental Health: Second Edition**, p. 530–540, 18 jul. 2024.
- SU, Y. *et al.* Maternal Low Protein Isocaloric Diet Suppresses Pancreatic β -Cell Proliferation in Mouse Offspring via miR-15b. **Endocrinology**, v. 157, n. 12, p. 4782–4793, 1 dez. 2016.
- Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Têtu B. Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res.* 2003 Dec 1;63(23):8511-5. PMID: 14679018.
- Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Têtu B. Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: Identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. *Human pathology.* 2008;39:731-9.
- TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. REACTIVE STROMA IN PROSTATE CANCER PROGRESSION. **The Journal of Urology**, v. 166, n. 6, p. 2472–2483, 1 dez. 2001.
- VALDEZ, R. *et al.* Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. **Diabetologia**, v. 37, n. 6, p. 624–631, jun. 1994.
- WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of cell biology**, v. 30, n. 1, p. 23–38, 1966.
- ZAMBRANO, E. *et al.* A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **The Journal of physiology**, v. 563, n. Pt 1, p. 275–284, 15 fev. 2005.
- ZHAO, H. *et al.* Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.