

DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROLE DE RATAS
SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTEICA EM DIFERENTES
PERÍODOS DA PRENHEZ E LACTAÇÃO

ANA LUISA CAMOLEZI GASPAR

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

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROLE DE RATAS
SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTEICA EM DIFERENTES
PERÍODOS DA PRENHEZ E LACTAÇÃO

ANA LUISA CAMOLEZI GASPAR

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

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

**BOTUCATU – SP
2011**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Gaspar, Ana Luisa Camolezi.

Desenvolvimento sexual da prole de ratas submetidas à restrição proteica em diferentes períodos da prenhez e lactação / Ana Luisa Camolezi Gaspar. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Wilma De Grava Kempinas

Capes: 20600003

1. Reprodução – Estudos experimentais.

Palavras-chave: Desempenho gestacional; Programação fetal; Rato; Reprodução; Restrição protéica

Resumo



RESUMO

O desenvolvimento é um processo complexo que envolve muitos eventos críticos e, para a maioria dos mamíferos, se completa até anos após o nascimento. Assim, os hábitos alimentares maternos durante os períodos da gestação e lactação são de suma importância para o desenvolvimento inicial da prole. Muitos trabalhos já relataram que a restrição proteica durante a gestação resulta em efeitos sobre o sistema cardiovascular e aumenta a propensão para o desenvolvimento de doenças como hipertensão, diabetes e obesidade no período pós-natal. Efeitos sobre a função reprodutiva também foram constatados, porém poucos trabalhos avaliaram os efeitos em diferentes períodos do desenvolvimento inicial. O presente estudo teve por objetivo investigar a repercussão da restrição proteica materna em diferentes intervalos da prenhez ou na lactação, sobre o desempenho gestacional das matrizes e aspectos reprodutivos da progênie. Para tanto, foram utilizadas ratas adultas da linhagem *Wistar* prenhes, subdivididas em seis grupos: 1) Controle (n=13), 2) Gestação, restrito durante toda a prenhez, do dia gestacional 0 (DG0) ao DG21 (n=12), 3) Pré-implantação, restrito no período pré-implantação, do DG0 ao DG5 (n=12), 4) Embrionário, restrito no período embrionário, do DG6 ao DG15 (n=12), 5) Fetal, restrito no período fetal, do DG16 ao DG21 (n=13) e 6) Lactação, restrito durante toda a lactação, do dia pós-natal 1 (DPN1) ao DPN21 (n=7). As matrizes dos grupos controle e restritos foram alimentadas com ração normoproteica (proteína 17%) e hipoproteica (proteína 6%), respectivamente, de acordo com o delineamento experimental. Parte das matrizes foi morta ao final da prenhez (DG20), para avaliação do desempenho gestacional. As demais foram preservadas para permitir o nascimento dos filhotes e a averiguação dos seguintes aspectos: instalação da puberdade, peso dos órgãos reprodutivos, aspecto histológico dos testículos e níveis hormonais no DPN55 e na idade adulta (80 dias para fêmeas e 90 para machos). Na idade adulta, procedeu-se também a avaliação da ciclicidade estral e de alguns parâmetros espermáticos. Quanto ao desempenho gestacional materno, apenas o peso fetal foi reduzido no grupo Gestação. A restrição proteica materna resultou em diferentes efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal da progênie de acordo com o período de restrição. Os filhotes dos grupos Gestação e Fetal foram mais leves ao nascimento que os do grupo Pré-implantação, embora não tenham diferido do Controle, e no grupo Lactação houve retardo permanente no desenvolvimento pós-natal, representado por um menor peso corpóreo desde o DPN7 até a idade adulta. Quanto aos aspectos reprodutivos da progênie, a restrição proteica materna influenciou a idade de instalação da puberdade de

diferentes maneiras de acordo com o período de restrição, houve uma tendência de adiantamento no grupo Pré-implantação e atraso nos grupos Gestação e Lactação, sendo significativa a diferença apenas na prole feminina do grupo Lactação. O peso dos órgãos reprodutivos, tanto masculinos como femininos, foi reduzido no grupo Lactação aos 55 dias, persistindo até a idade adulta somente nas fêmeas. Os níveis hormonais foram alterados nos filhotes do sexo masculino, sendo os níveis de FSH aumentados aos 90 dias no grupo Lactação. As avaliações espermáticas mostraram redução no número e na produção diária de espermatozoides no testículo nos grupos Gestação e Lactação, mas a eficiência da espermatogênese não foi alterada. Os demais parâmetros espermáticos, o aspecto histológico do testículo e a ciclicidade estral, avaliada entre os DPNs 60 e 80, não diferiram entre os grupos. Concluiu-se que a restrição proteica materna interferiu no desenvolvimento geral e também em alguns aspectos reprodutivos da prole, especialmente quando a restrição se deu no período de lactação.

Palavras-chave: Programação fetal; Restrição proteica; Desempenho gestacional; Reprodução; Rato.

Abstract



ABSTRACT

Development is a complex process that involves many critical events and, for most mammals, is completed until years after birth. Thus, maternal dietary habits during pregnancy and lactation are very important to the offspring early development. Many studies have reported that protein restriction during pregnancy results in effects on cardiovascular system and increases the probability of developing diseases such as hypertension, diabetes and obesity in the postnatal period. Effects on reproductive function were also observed, however, few studies have evaluated the effects in different periods of early development. This study aimed to investigate the impact of maternal protein restriction in different intervals of pregnancy or during lactation on the gestational performance of pregnant rats and on some reproductive aspects of progeny. To this end, pregnant *Wistar* rats were randomly assigned into six groups: 1) Control (n=13), 2) Gestation, restricted during all pregnancy, from gestational day 0 (GD0) to GD21 (n=12), 3) Pre-implantation, restricted in the pre-implantation period, from GD0 to GD5 (n=12), 4) Embryonic, restricted in the embryonic period, from GD6 to GD15 (n=12), 5) Fetal, restricted in the fetal period, from GD16 to GD21 (n=13) and 6) Lactation, restricted during all the lactation, from postnatal day 1 (PND1) to PND21 (n=7). Dams of control and restricted groups were fed standard (protein 17%) and low protein (6%) chow, respectively, according to experimental design. Part of the mothers was killed at the end of gestation (GD20) for evaluation of the gestational performance. The others were preserved to allow pups birth and investigation of the following aspects: onset of puberty, reproductive organs weight, testicular histological features and hormone levels at PND55 and adulthood (80 days for females and 90 for males). At adulthood, it was also evaluated the estrous cyclicity and some sperm parameters. About gestational performance, only fetal weight was reduced in the Gestation group. The maternal protein restriction resulted in different effects on pre and postnatal offspring development according to the restriction period. Pups of Gestation and Fetal groups were lighter at birth than those of Pre-implantation, but did not show any difference compared to Control, and in the Lactation group there was a permanent delayed postnatal development, represented by a lower body weight since PND7 up to adulthood. With regard to offspring reproductive features, maternal protein restriction affected the age of puberty onset in different ways according to the restriction period, there was a tendency to advance in the Pre-implantation group and delay in Gestation and Lactation groups, with a significant difference only in female offspring of the Lactation group. Reproductive organs

weight of both, male and female pups, was reduced in the Lactation group at PND55, persisting until adulthood only in females. Hormone levels were altered in the male offspring, being FSH levels increased at PND90 in Lactation group. Sperm evaluations revealed a reduction in sperm number and daily sperm production in testis in the Gestation and Lactation groups, but the efficiency of spermatogenesis was not altered. Other sperm parameters, testis histological aspect and estrous cyclicity, assessed between PNDs 60 and 80 did not differ between groups. In conclusion, maternal protein restriction interfered with the general development and also with some reproductive aspects of offspring, especially when restriction occurred during lactation.

Keywords: Fetal programming; Protein Restriction; Gestational performance; Reproduction; Rat.

Banca Examinadora



Botucatu, 22 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)

Dra. Débora Cristina Damasceno (Titular)

Profª. Dra. Patrícia Aline Bôer (Titular)

Profª. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga (Suplente)

Profª. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli (Suplente)

Dedicatória



Dedico este trabalho...

a minha mãe, Aparecida e ...

... a meu pai, José.

Agradecimientos



Agradeço a Deus, pelo dom da vida;

Aos meus pais, por todos os ensinamentos e lições, e principalmente por estarem sempre ao meu lado, nas minhas conquistas, me encorajando e apoiando nas dificuldades, me dando asas para que eu possa voar e alcançar meus sonhos;

Ao meu irmão, Izidoro, pelo companheirismo;

Aos meus familiares, em especial meu primo Edson Marcos, que sempre me incentivou;

À minha orientadora, Prof^a. Wilma, que mesmo sem me conhecer, aceitou me orientar me recebendo em seu laboratório, para integrar à família REPROTOX. Professora, obrigada por todos os ensinamentos e lições. Aprendi muito nesses dois anos e quero que saiba que tenho uma profunda admiração pela senhora;

Aos meus amigos de laboratório, que me ajudaram muito e sem o apoio dos quais, seja técnico ou moral, não teria concluído essa etapa. Desde já me desculpo por não citar nomes, só não queria cometer a injustiça de deixar ninguém de fora. Mas saibam que vocês são muito importantes para mim, e os considero minha segunda família. Obrigada por fazerem parte da minha vida!!!

Ao Programa de Pós-Graduação Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP;

Aos funcionários da sessão de pós-graduação;

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP;

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, em especial Luciana e José Eduardo, sempre prontos a me ajudar quando precisei;

Aos colegas de departamento;

Aos meus amigos de toda a vida, que compartilharam comigo esse sonho;

A todos os meus professores, desde o jardim de infância até a pós-graduação;

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”-UNESP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo apoio financeiro,

À Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci e sua equipe do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo-USP, pela colaboração nas análises hormonais;

Aos técnicos do Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pelo auxílio no processamento das rações;

Aos animais de experimentação que deram a vida por este trabalho, e também em prol do avanço da ciência, resultado de descobertas importantíssimas para a humanidade;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

(Chico Xavier)

Epígrafe



SONHOS

*Há quem diga que todas as noites são de sonhos.
Mas há também quem diga nem todas, só as de verão.
Mas no fundo isso não tem muita importância.
O que interessa mesmo não são as noites em si, são os sonhos.
Sonhos que o homem sonha sempre.
Em todos os lugares, em todas as épocas do ano,
dormindo ou acordado.*

(William Shakespeare)

Sumário



SUMÁRIO

	Página
I Introdução	1
Conceitos e Teorias em Programação Fetal	3
Mecanismos de Programação Fetal	7
Estado Nutricional Materno e Programação Fetal	9
Programação Fetal e Reprodução	12
II Objetivos	15
III Capítulo 1	17
Efeitos da restrição proteica materna em diferentes intervalos da prenhez ou na lactação sobre o desempenho gestacional e função reprodutiva da prole feminina	18
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	21
Materiais e Métodos	22
Resultados	25
Discussão	27
Referências Bibliográficas	32
Tabelas	37
Legendas das Figuras	39
Figuras	40
IV Capítulo 2	42
Differential reproductive effects in male offspring after maternal protein restriction in different intervals of rat early development	44
Abstract	45
Introduction	46

	Materials and Methods	47
	Results	50
	Discussion	51
	References	54
	Tables	59
	Figure Captions	63
	Figures	64
V	Conclusões	65
VI	Referências Bibliográficas da Introdução	67
VII	Apêndices	75
	Anexo I – Figuras e Tabelas: Dados das Matrizes	
	Anexo II – Figuras e Tabelas: Dados da Prole do Nascimento ao Desmame	
	Anexo III – Figuras e Tabelas: Dados da Prole Feminina Após o Desmame	
	Anexo IV - Figuras e Tabelas: Dados da Prole Masculina Após o Desmame	

I Introdução



I INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, mudanças relevantes têm sido observadas nos perfis epidemiológico e nutricional da população brasileira. Houve redução na incidência de óbitos por doenças infecciosas e das formas graves de desnutrição, concomitante a um aumento nos casos de doenças crônicas não transmissíveis, as chamadas “doenças da modernidade” (obesidade, problemas cardiovasculares, diabetes, dislipidemias, neoplasias) (Stolte *et al.*, 2006). Essa inversão está, possivelmente, associada a mudanças no estilo de vida, no que diz respeito a aspectos tais como: hábitos alimentares e prática de atividades físicas.

Dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) revelaram que ao longo de três décadas (1974-2003), a porcentagem da população com IMC (Índice de Massa Corpórea) baixo, indicativo de desnutrição, tendeu a reduzir, enquanto a proporção da população com excesso de peso e obesa aumentou continuamente, principalmente entre os homens (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008). Uma possível explicação para isso pode estar relacionada ao fato de que as mulheres são, em geral, mais preocupadas com as questões relacionadas à aparência e à saúde que os homens.

Desnutrição é um termo popularmente utilizado para fazer referência à baixa ingestão de alimentos, no entanto, ele tem um significado mais amplo. Alguns autores definem a desnutrição, também chamada má-nutrição, como o resultado do déficit ou do excesso de nutrientes na dieta (Escoda, 2002; Valente, 2003). Dessa forma, a desnutrição não se refere apenas à escassez de alimentos, mas também está associada a uma alimentação desbalanceada e excessiva em relação a um ou vários elementos, podendo resultar na carência de nutrientes específicos e de alto valor biológico, como por exemplo, uma alimentação pobre em proteínas, que leva a um quadro de desnutrição proteica, ou então uma dieta rica em lipídeos e carboidratos, que vai gerar um maior acúmulo de gordura no organismo.

Devido ao grande apelo da mídia pela forma física ideal e tendo-se em vista que o padrão de beleza feminino no mundo da moda é a magreza, outro problema que vem chamando a atenção das autoridades em saúde pública, são os distúrbios alimentares como anorexia e a bulimia, ambos mais comuns entre as mulheres, que levam a um quadro de carência nutricional grave. Andrade e Bosi (2003) simplificaram de forma clara esse contexto ao dizer que “a indústria de alimento vende gordura, enquanto a sociedade cobra magreza”. Ainda de acordo com esses autores, quadros de anorexia e bulimia estão relacionados a uma

psicopatologia comum: preocupação excessiva com peso e forma do corpo e o medo de engordar.

Tendo em vista todos esses aspectos, a má-alimentação materna, seja no período pré-concepção, gestacional ou durante a lactação, pode gerar carências nutricionais para o feto. Considerando-se que a capacidade da mãe em prover nutrientes e oxigênio é um fator crítico para a saúde e sobrevivência de sua prole, a falha no suprimento adequado para satisfazer a demanda fetal pode levar a subnutrição precoce da progênie. O feto responde e se adapta à subnutrição, mas ao fazer isso altera, permanentemente, a estrutura e o funcionamento do organismo (Martin-Gronert e Ozanne, 2006).

Conceitos e Teorias em Programação Fetal

Estudos associando a desnutrição materna durante os períodos de gestação e lactação, e suas possíveis consequências para a prole têm sido realizados há décadas (Burke *et al.*, 1949; Brasel e Winick, 1972; Martin-Gronert e Ozanne, 2006).

Dados epidemiológicos indicaram uma forte associação inversa entre o peso natal e o risco em se desenvolver doenças crônicas (doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes), quando na idade adulta (Lau e Rogers, 2004). A partir da observação desses dados foram propostos alguns conceitos e teorias associando a influência das condições do meio intrauterino e perinatal sobre o desenvolvimento inicial da prole e a predisposição ao desenvolvimento dessas doenças posteriormente.

Um dos primeiros termos a surgir na literatura para expressar essa associação entre as condições do meio intrauterino e alterações no desenvolvimento da progênie foi o conceito de “Programação Fetal”, proposto por Lucas (1991), que consiste em um processo mais geral por meio do qual um estímulo ou insulto aplicado em um período crítico ou sensível do desenvolvimento intrauterino pode levar a alterações duradouras ou permanentes na estrutura ou no funcionamento de um organismo.

Eventos ocorridos no início da vida podem gerar consequências, das seguintes maneiras: (1) por meio de dano direto, como a perda de um membro devido a acidente vascular; (2) por indução, deleção ou desenvolvimento prejudicado de uma estrutura somática, como resultado de um estímulo ou insulto durante um período crítico; ou (3) através de “ajuste” fisiológico devido a um estímulo ou insulto inicial em um período crítico com consequências em longo prazo para a função. Lucas considerou o termo programação sendo

aplicado às duas últimas situações, em que o estímulo programador tem efeito duradouro quando aplicado em um período crítico ou sensível do desenvolvimento (Lucas, 1998).

Também no início dos anos 90, Barker e colaboradores propuseram uma hipótese associando insultos nutricionais durante o desenvolvimento embrionário e fetal à maturação prejudicada das funções fisiológicas e também à manifestação de doenças ocultas quando adulto (Lau e Rogers, 2004). A “Hipótese de Barker”, também chamada “Hipótese da Origem Fetal” (“*Fetal Origins of Adult Diseases*” – FOAD), pressupõe que uma série de estruturas de órgãos e funções associadas sofram programação durante a vida intrauterina determinando o desencadeamento de respostas fisiológicas e metabólicas persistentes até a idade adulta. Assim, alterações na nutrição embrionária e fetal, bem como no estado endócrino durante a gestação, podem resultar em adaptações do desenvolvimento que geram alterações estruturais, fisiológicas e metabólicas permanentes, predispondo o indivíduo a um maior risco de desenvolver doenças crônicas na vida adulta (Barker, 1992).

De um modo simplificado a “Hipótese da Origem Fetal” assume que a subnutrição fetal de meados para o fim da gestação pode levar a um crescimento fetal desproporcional, aumentando o risco de se desenvolver doença coronariana na vida adulta, entre outras disfunções endócrinas e metabólicas (Barker, 1995).

Outro conceito encontrado na literatura é o da “Hipótese do Fenótipo Pougador” (“*Thrifty Phenotype Hypothesis*”). Essa hipótese foi proposta por Hales e Barker, e sugere que um feto mal nutrido altera adaptativamente seu metabolismo glicose-insulina (capacidade de secreção de insulina reduzida e resistência à insulina). Segundo os autores, essas adaptações têm como propósito melhorar a sobrevivência sob condições de privação nutricional (Hales e Barker, 1992), ou seja, o feto otimiza o uso dos nutrientes que são escassos para garantir sua sobrevivência e, em consequência disso, alguns órgãos seriam favorecidos em detrimento de outros, resultando em alterações persistentes no crescimento e função dos tecidos (Silveira *et al.*, 2007). Ainda de acordo com a Hipótese do Fenótipo Pougador, a deficiência de insulina não seria prejudicial à saúde se o indivíduo continuasse a ser mal nutrido e permanecesse magro. Porém, quando a nutrição se torna adequada ou excessiva durante a vida pós-natal, conflitos fisiológicos surgem, e a intolerância à glicose pode ser desencadeada por um balanço calórico positivo (Lau e Rogers, 2004). Essa hipótese está associada à “Hipótese do Genótipo Pougador”, segundo a qual, determinadas populações apresentam maior propensão à resistência à insulina por seleção ou aspectos genéticos, isto é, uma mutação que leva à resistência insulínica poderia ser benéfica e adaptativa para uma população em um ambiente com escassez alimentar resultando em seleção natural desses

indivíduos com consequente transmissão do caráter para as próximas gerações (Silveira, *et al.*, 2007).

É exatamente essa incompatibilidade entre os meios pré e pós-natal que fornece base para a “Hipótese da Resposta Preditiva Adaptativa”. Esse conceito surgiu a partir da teoria do fenótipo poupador, e propõe que o feto faz adaptações *in utero* (ou mesmo no início do período de desenvolvimento pós-natal), baseando-se nas condições do meio em que se dá o desenvolvimento inicial, para prever como seria o meio pós-natal (Gluckman e Hanson, 2004). Assim, as respostas preditivas visam uma adaptação em longo prazo com o objetivo de garantir a sobrevivência, no mínimo até o período reprodutivo, enquanto as adaptações previstas pela teoria do fenótipo poupador teriam um valor adaptativo imediato (Silveira *et al.*, 2007). De acordo com essa hipótese, quando a resposta adaptativa preditiva é apropriada, ou seja, quando as condições dos meios pré e pós-natal são compatíveis, o fenótipo é normal. No entanto, se houver incompatibilidade entre os ambientes previsto e real na vida pós-natal, isso resultaria na manifestação de doenças. Assim, sugere-se que as doenças se manifestem apenas quando a dieta na vida adulta diverge do plano previsto durante o desenvolvimento fetal (Armitage *et al.*, 2005).

Uma das peculiaridades mais interessantes da programação do desenvolvimento são as evidências mostradas em vários estudos, de que as consequências adversas do meio intrauterino alterado podem ser passadas ao longo de várias gerações (Zambrano *et al.*, 2005a; Burdge *et al.*, 2007). “Efeito Intergeracional (ou Transgeracional)” é o termo utilizado para se referir a essa possibilidade (Zambrano *et al.*, 2005a; Painter *et al.*, 2008). Esse conceito não é novo, ele foi proposto em 1986 por Emanuel e está relacionado com a epigenética (Drake e Walker, 2004).

A Epigenética (do grego, *epi* = “acima ou sobre algo”) é o estudo das mudanças herdadas nas funções dos genes, observadas na genética, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA. Os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais que podem causar mudanças fenotípicas transmitidas aos descendentes. (Muller e Prado, 2008). Em outras palavras, as células de um organismo multicelular são geneticamente iguais, diferindo apenas estrutural e funcionalmente devido à expressão diferenciada dos genes. Muitas dessas diferenças na expressão gênica surgem durante o desenvolvimento e são preservadas através das mitoses. Alterações estáveis desse tipo são chamadas epigenéticas, e caracterizam-se por não envolverem mutação propriamente dita na molécula de DNA e por serem herdáveis em curto prazo. Os mecanismos que parecem mediar os fenômenos epigenéticos são a metilação do DNA, modificações nas histonas

(Jaenisch e Bird, 2003) e os miRNAs, que parecem ter um papel importante no controle dos dois primeiros (Chuang e Jones, 2007).

Ao contrário do genoma, que é idêntico nos diferentes tipos celulares, o epigenoma é dinâmico e varia de uma célula para outra, permitindo a organização e manutenção dos programas de expressão gênica. Os eventos epigenéticos desempenham papel importante no desenvolvimento normal e são cruciais para o estabelecimento da programação correta da expressão dos genes, pois estão relacionados com a plasticidade do organismo perante estímulos adversos em períodos críticos, que alteram permanentemente a estrutura e a função específica de sistemas de órgãos (Muller e Prado, 2008).

Assim, a influência intergeracional foi definida como aqueles fatores, condições, exposições e ambientes experimentados por uma geração que influenciam a saúde, crescimento e desenvolvimento da geração seguinte. Estudos epidemiológicos sugerem um possível efeito transgeracional no peso natal. Se baixo peso natal está associado a um aumento no risco cardiovascular, então isso levaria à herança de uma predisposição a baixo peso natal e risco cardiovascular ao longo de várias gerações (Drake e Walker, 2004).

Possíveis explicações para esses efeitos incluem (1) atributos genéticos que podem se manifestar de modo semelhante na mãe e na prole, (2) condições ambientais extrínsecas adversas que podem persistir por várias gerações, e (3) experiências adversas *in utero* capazes de afetar o crescimento e o desenvolvimento maternos de modo a proporcionar um meio adverso para seus fetos. Essa última possibilidade sugere um mecanismo pelo qual os efeitos da programação poderiam se tornar auto-perpetuantes por várias gerações (Drake e Walker, 2004).

Recentemente surgiu a “Hipótese das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença” (“*Developmental Origins of Health and Diseases*” – DOHaD), proposta a partir da Teoria da Origem Fetal de Barker. O conceito de DOHaD surgiu de evidências experimentais, e diferente da hipótese de Barker, admite que os eventos determinantes para o risco de doenças na vida adulta não ocorrem exclusivamente durante a vida fetal, mas sim durante todo o período de plasticidade do desenvolvimento, incluindo também as fases pós-natais (amamentação, infância, adolescência), além disso essa teoria assume que eventos adversos durante o desenvolvimento inicial têm papel não só no desenvolvimento e prevenção de doenças, mas também para a promoção da saúde em geral (Gluckman e Hanson, 2006).

A hipótese da DOHaD uniu conceitos propostos previamente por outros autores, como as respostas preditivas adaptativas (compatibilidade/incompatibilidade entre os meios pré e pós-natal), e eventos epigenéticos e seus efeitos intergeracionais, além de conceitos até então

não usualmente associados à programação fetal, como a exposição a contaminantes ambientais (conhecidos por causar efeitos epigenéticos), incluindo os desreguladores endócrinos, que poderiam também interagir com fatores maternos para aumentar o risco de doenças crônicas na prole (Hanson e Gluckman, 2008), agregando assim várias áreas do conhecimento científico e propondo novas metodologias de investigação no sentido de esclarecer a influência de eventos adversos ocorridos durante o desenvolvimento inicial humano, sobre o padrão saúde e doença ao longo da vida (Silveira *et al.*, 2007).

Apesar dos diferentes termos utilizados, as diversas hipóteses ou conceitos citados pouco divergem entre si. Em resumo, pode-se assumir que todos eles ressaltam a importância de um meio adequado para o desenvolvimento inicial, considerando este um processo complexo que envolve muitos eventos críticos e, para grande parte dos mamíferos, se completa até anos após o nascimento.

Mecanismos de Programação Fetal

Um dos indicadores da ocorrência da programação fetal é o baixo peso ao nascimento. Estudos experimentais indicam que o retardo do crescimento intrauterino pode levar a um crescimento pós-natal compensatório, e este estaria envolvido na manifestação dos efeitos programadores.

São vários os modelos experimentais para o estudo do fenômeno de programação fetal: restrição nutricional (proteica ou alimentar), indução do diabetes materno, restrição do fluxo sanguíneo uterino, superexposição fetal a glicocorticoides maternos (Zambrano *et al.*, 2005a), pré-eclampsia (Myatt, 2006) e estresse materno (Kapoor *et al.*, 2006). Para todos esses modelos, a placenta tem um papel de destaque, pois constitui a interface entre as circulações materna e fetal de forma que perturbações no meio materno são transmitidas através da placenta para o feto. Existem evidências de que a nutrição materna influencia os transportadores placentários e o crescimento fetal, alterando os níveis de hormônios metabólicos como a insulina, o IGF-I e a leptina, que regulam a função de transporte de nutrientes pela placenta. Tornando-se assim, crescente o interesse a cerca de sua função em responder e modular tais perturbações (Jansson e Powell, 2007). Para McCrabb *et al.* (1991) a regulação do desenvolvimento fetal resulta da ação combinada de fatores de origem materna, placentária e fetal.

Além da placenta, constatou-se que os hormônios glicocorticoides também estão envolvidos na programação fetal. Eles constituem a maior subclasse de hormônios esteroides atuantes na regulação de processos metabólicos, cardiovasculares, imunitários e comportamentais. Em mamíferos, têm papel importantíssimo durante a gestação, não só no que diz respeito às adaptações metabólicas maternas, mas também nos mecanismos do parto (Silveira *et al.*, 2007). Por serem moléculas lipofílicas, são capazes de atravessar a membrana placentária. Entretanto, sabe-se que a superexposição fetal aos glicocorticoides maternos interfere no processo de desenvolvimento, causando retardo no crescimento intrauterino além de afetar a taxa de maturação de alguns órgãos (Holemans *et al.*, 2003; Verkauskiene *et al.*, 2007). A administração desses hormônios a fêmeas prenhes alterou também a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Jansson e Powell, 2007). Assim, justifica-se o porquê de serem apontados como um dos principais fatores envolvidos na programação do risco aumentado para doenças crônicas em indivíduos com baixo peso ao nascimento. Segundo Langley-Evans (2001), o aumento dos níveis desses hormônios na circulação fetal vai interferir no eixo HPA fetal, que por sua vez pode estimular a atividade do sistema renina-angiotensina, resultando em resistência vascular aumentada e hipertensão, constituindo-se uma ligação direta entre a função placentária alterada e a programação fetal. A placenta também está envolvida na manutenção dos níveis de glicocorticoides fetais bem abaixo daqueles na circulação materna, através da atividade de uma enzima, a 11 β -hidróxi-esteróide-desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD-2), que converte os glicocorticoides de sua forma ativa para uma forma biologicamente inativa (Silveira *et al.*, 2007).

Dessa forma, pode-se assumir que os efeitos programadores no feto são, em geral, mediados por respostas placentárias a perturbações no compartimento materno (nutrição, fluxo sanguíneo útero-placentário reduzido, níveis de citocinas e cortisol). Essas respostas incluem alteração na espessura da membrana placentária, ramificação dos vilos e capilarização anormal, alteração na expressão e na atividade da enzima 11 β -HSD-2 e das moléculas transportadoras placentárias, dentre outras como efeitos epigenéticos sobre genes placentários e estresse oxidativo/nitrativo aumentados (Jansson e Powell, 2007).

Dentre as moléculas transportadoras, a proteína mTOR ('mammalian target of rapamycin') tem sido apontada em estudos experimentais por desempenhar função no processo de programação fetal, provavelmente atuando como um sistema de sinalização intrínseco dos sensores de nutrientes placentários (Jansson e Powell, 2007). Essa proteína constitui uma importante via sensorial nas células de mamíferos por controlar o crescimento celular em resposta a disponibilidade de nutrientes (principalmente aminoácidos de cadeia ramificada),

hipóxia e ao estado energético celular. Dados de estudos experimentais evidenciaram que a proteína mTOR tem atividade reduzida em casos de retardo de crescimento intrauterino. Dessa forma, concluiu-se que a mTOR placentária está envolvida na percepção dos nutrientes, regulando o transporte placentário de acordo com os recursos maternos disponíveis, e também o crescimento fetal (Jansson e Powell, 2007).

Bebês com peso natal abaixo ou acima da média têm uma maior chance de desenvolverem diabetes e doenças cardiovasculares quando adultos. O primeiro determinante do crescimento fetal é a suplementação nutricional materna, diretamente dependente da placenta. Sendo assim, acredita-se que a placenta atue como um sensor nutricional coordenando as funções de transporte conforme a disponibilidade materna de nutrientes, de modo que alterações nas funções placentárias de transporte representariam um mecanismo para equiparar a taxa de crescimento fetal a um nível compatível com a quantidade de nutrientes disponíveis que podem ser fornecidos pela mãe (Jansson e Powell, 2007).

Em suma, para os vários mecanismos de programação fetal existentes na literatura, a placenta tem papel importante, seja por alterações estruturais ou funcionais. Jansson e Powell (2007) defendem que alterações no fenótipo da placenta seriam um indicativo de meio intrauterino comprometido mesmo quando o peso natal estiver dentro de uma faixa considerada normal, e poderiam prover muito mais informações quanto ao risco de desenvolvimento tardio de doenças que dados brutos da exposição intrauterina, os quais são comumente utilizados. Para Bauer *et al.* (1998) a placenta não é apenas um meio passivo de condução de nutrientes, ao contrário, ela está ativamente envolvida na integração de sinais endócrinos e nutricionais entre a mãe e o feto. Alterações no desenvolvimento feto-placentário beneficiam a sobrevivência imediata, mas podem gerar problemas na vida pós-natal (Vonnahme *et al.*, 2003).

Estado Nutricional Materno e Programação Fetal

É evidente a importância de um estado nutricional materno adequado para o desenvolvimento normal da prole, seja *in utero* ou mesmo no período pós-natal inicial, correspondente à amamentação. Essa pode ser uma justificativa para o fato de a maioria dos trabalhos envolvendo programação fetal utilizarem como modelo experimental a subnutrição materna, seja na forma de restrição proteica ou alimentar.

De modo geral, o desenvolvimento consiste em um processo dinâmico e contínuo desde a concepção, e pode ser influenciado por fatores intrínsecos (genéticos) e extrínsecos (ambientais: alimentação, higiene, saúde, habitação). Todo ser humano nasce com um potencial genético de crescimento, que poderá ou não ser alcançado, de acordo com as condições a que for exposto desde a concepção até a idade adulta (Wolansky *et al.*, 1970; Karlberg *et al.*, 1994; Organização Mundial da Saúde, 1995).

De acordo com o conceito de programação fetal, o desenvolvimento pode ser influenciado pelo meio intrauterino através de estímulos (ou insultos), como a nutrição, que podem predispor o indivíduo à manifestação de doenças quando adulto (Langley-Evans *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2001). Barker (1997), baseando-se em dados epidemiológicos, sugere que fetos humanos ao se adaptarem a um suplemento limitado de nutrientes alteram permanentemente sua fisiologia e metabolismo e que essas mudanças podem ser a origem de várias doenças, a chamada síndrome metabólica, que engloba disfunções tais como hiperinsulinemia, resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão e obesidade abdominal (Stern *et al.*, 2000).

Estudos experimentais mostraram que a subnutrição durante o período de gestação além de levar a um o ganho de peso corpóreo reduzido nas mães (Zeman *et al.*, 1967a; Woodal *et al.*, 1996), também causa alterações em seu metabolismo, como por exemplo, alterações nos níveis de cortisol e na função hepática relacionada ao metabolismo lipídico (Ballen *et al.*, 2009). Alterações nos níveis maternos de corticosteroides, associadas à redução da expressão da enzima 11 β -HSD-2 placentária, demonstradas experimentalmente (Holemans *et al.*, 2003) concordam com a redução do peso natal na prole de mães mal-nutridas, observada na grande maioria dos estudos de programação fetal.

Além de retardo no crescimento intrauterino (Zeman *et al.*, 1967a; Woodal *et al.*, 1996; Holemans *et al.*, 2003; Ballen *et al.*, 2009), outras consequências como alterações na taxa de crescimento pós-natal (Kwong *et al.*, 2000; Zambrano *et al.*, 2006), comportamentais e metabólicas, como por exemplo, níveis de leptina alterados, resistência à insulina, metabolismo de glicose e lipídeos (Zambrano *et al.*, 2006), e até mesmo redução na taxa de sobrevivência pós-natal (Zeman *et al.*, 1967a; Woodal *et al.*, 1996) também foram relatados na prole de mães submetidas à restrição nutricional.

Embora a deficiência nutricional materna tenha sido amplamente associada a um prejuízo para o desenvolvimento geral de sua prole, o desenvolvimento de alguns órgãos parece ser afetado de maneiras distintas. Zeman *et al.* (1967a) verificaram que o tamanho relativo dos rins e do fígado estavam diminuídos, enquanto o coração, o cérebro e o timo

estavam aumentados. Acredita-se que as consequências da má-nutrição materna sobre o desenvolvimento de órgãos específicos apresentem diferenças interespecíficas (Wells, 2003) e também de gênero (Hales e Barker, 2001). A preservação do desenvolvimento do cérebro, por exemplo, é um aspecto bem estabelecido em casos de retardo de crescimento intrauterino em humanos, e é possível que haja também uma hierarquia envolvida na preservação de alguns órgãos, inclusive a placenta (Wells, 2003).

É importante ressaltar que alterações na estrutura de órgãos quase sempre estão associadas a alterações funcionais (Hales e Barker, 2001). Segundo Zeman *et al.* (1967b), alterações morfológicas e histoquímicas renais observadas em ratos devido a subnutrição materna, provavelmente comprometeriam as funções glomerulares e tubulares. Em outro estudo, a redução do peso do fígado foi acompanhada por alterações na atividade das enzimas hepáticas associadas ao metabolismo da glicose (Petry *et al.*, 1997).

Ao longo da gestação, são vários os períodos críticos, sensíveis a estímulos adversos, e eles variam conforme o sistema ou estrutura em formação. Se a subnutrição for aplicada em um momento anterior ao qual certos órgãos, tipos celulares, ou receptores tenham se desenvolvido, esperar-se-ia que eles não fossem afetados, pelo menos não diretamente. No entanto, eles podem ser influenciados por alterações prévias induzidas em suas células ou tecidos precursores (Rhind *et al.*, 2001).

Os primeiros indícios de que o período gestacional pode resultar em diferentes manifestações posteriormente surgiram de dados epidemiológicos dos períodos de fome durante a Segunda Guerra Mundial. A “Dutch Famine” (“Fome holandesa”) foi um período breve (de novembro de 1944 a maio de 1945), de profunda privação nutricional durante o cerco alemão à Holanda, e por sua curta duração, representa uma oportunidade única para se observar o fenômeno da programação fetal na população humana, fornecendo evidências sobre os efeitos da desnutrição em diferentes períodos da gestação (Hales e Barker, 2001).

Na literatura alguns estudos consideraram apenas períodos específicos da gestação para se verificar os efeitos programadores da subnutrição materna. Kwong *et al.* (2000) relataram que restrição proteica em ratas no período pré-implantação reduziu o número de células no estágio de blastocisto sem alterar sua capacidade de implantação, embora é possível que haja influência na programação do peso natal, taxa de crescimento pós-natal, pressão sanguínea e tamanho relativo de alguns órgãos.

Durante o período embrionário, quando ocorre a organogênese, Rosso (1977) verificou em ratas que a restrição proteica reduziu os pesos materno e fetal. Em ovelhas, McCrabb *et al.* (1991) observaram redução no peso materno apenas durante o período de restrição, mas no

final da gestação não houve diferença. O peso fetal não foi alterado, enquanto o da placenta foi maior, o que também foi relatado por Osgerby *et al.* (2002), além de retardo no desenvolvimento de alguns órgãos, e alterações no desenvolvimento ósseo. A restrição nutricional materna em ratas no final da gestação (período fetal) levou à redução no peso natal da prole (Lesage *et al.*, 2001; DelaHaye *et al.*, 2008).

A lactação, assim como a gestação, tem se mostrado um período crítico para o desenvolvimento, pois para a maioria dos mamíferos o desenvolvimento do organismo não se encerra ao nascimento. Assim, restrição nutricional materna durante esse período pode comprometer o desenvolvimento dos filhotes e isso já foi relatado em vários estudos experimentais (Zeman *et al.*, 1967a; Desai *et al.*, 1996; Zambrano *et al.*, 2006), sendo inclusive apontada como o período mais crítico para o desenvolvimento geral da prole (Pettry *et al.*, 1997). Além de prejudicar o desempenho lactacional das matrizes, a subnutrição materna durante a lactação também levou a uma taxa de crescimento pós-natal menor (Desai *et al.*, 1996), e interferiu no desenvolvimento de alguns órgãos, causando disfunções metabólicas e fisiológicas, e redução na taxa de sobrevivência (Zeman *et al.*, 1967a; Desai *et al.*, 1996; Zambrano *et al.*, 2006).

Efeitos intergeracionais foram identificados em aspectos tais como peso natal, risco de doenças cardiovasculares (Drake e Walker, 2004; Bertran *et al.*, 2008) e diabetes (Painter *et al.*, 2008). Burdge *et al.* (2007) relataram que os padrões de metilação induzidos em regiões promotoras de genes na prole (F1) de matrizes (F0) com dieta restrita em proteínas durante a prenhez são passados para a F2, sugerindo que a transmissão de um fenótipo metabólico alterado seria resultado de regulação epigenética da expressão gênica imprópria.

Estudos prévios apontam ainda para o fato de que os efeitos programadores da subnutrição materna parecem variar não só com o período do desenvolvimento inicial no qual é aplicado, mas também com o sexo da progênie (Kwong *et al.*, 2000; Zambrano *et al.*, 2006).

Programação Fetal e Reprodução

Estudos epidemiológicos e experimentais com relação aos efeitos da subnutrição materna sobre aspectos reprodutivos são relativamente escassos em comparação àqueles que abordam aspectos da síndrome metabólica, por exemplo. Mas nos últimos anos o interesse sobre as consequências da programação fetal para a função reprodutiva parece ter aumentado tendo em vista os vários trabalhos publicados ao longo da última década (Bielli *et al.*, 2002;

Rae *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 2005b; Guzmán *et al.*, 2006; Chernoff *et al.*, 2009; Genovese *et al.*, 2010).

A restrição proteica severa durante a prenhez afetou o desempenho gestacional de ratas (Nelson e Evans, 1953; Rees *et al.*, 1999), e também resultou em prejuízos no âmbito reprodutivo para os filhotes. Desde a década de 70, efeitos sobre a duração da vida reprodutiva da progênie têm sido associados ao ambiente de criação, o que inclui, portanto, as condições nutricionais (Rhind *et al.*, 2001).

A subnutrição materna pode comprometer também o desempenho lactacional (Friggens *et al.*, 1992; Pine *et al.*, 1994). Sampson *et al.* (1986) observaram que a qualidade e a quantidade de proteína na dieta materna, bem como o nível de alimentação (controlado ou *ad libitum*) afetam a síntese de proteínas mamárias, comprometendo a qualidade do leite e o desenvolvimento pós-natal inicial dos filhotes.

Na prole feminina verificou-se que a restrição nutricional materna, seja na gestação e/ou na lactação, causou efeitos tais como: aumento na distância anogenital (DAG) (Guzmán *et al.*, 2006), alteração na idade da puberdade (Engelbregt *et al.*, 2000), redução do período reprodutivo (Guzmán *et al.*, 2006; Chernoff *et al.*, 2009), alterações hormonais (Guzmán *et al.*, 2006), atraso no desenvolvimento gonadal (Rhind *et al.*, 2001), redução no peso ovariano e também na taxa de ovulação (Rae *et al.*, 2002), redução da fertilidade (Guzmán *et al.*, 2006) e dificuldade em se gerar prole (Bertran *et al.*, 2008).

Com relação aos efeitos sobre aspectos reprodutivos dos descendentes do sexo masculino, foram observados: alterações hormonais (Rhind *et al.*, 2001; Zambrano *et al.*, 2005b; Teixeira *et al.*, 2007), aumento na DAG, atraso na descida dos testículos ao saco escrotal (Zambrano *et al.*, 2005b), alteração na idade da puberdade (Engelbregt *et al.*, 2000; Chernoff *et al.*, 2009), redução do peso e alterações morfofuncionais nos testículos (Mota *et al.*, 2001; Bielli *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 2005b; Teixeira *et al.*, 2007; Genovese *et al.*, 2010), além de redução na contagem de espermatozoides e na taxa de fertilidade (Zambrano *et al.*, 2005b).

Evidências tanto epidemiológicas como experimentais, apontam para a ocorrência de efeitos intergeracionais devido a efeitos programadores da restrição nutricional materna também no âmbito da reprodução. Aumento no risco de natimortos e morte perinatal na F2 (Lumey, 1998) e prejuízos para o desempenho lactacional na F1 e na capacidade reprodutiva na F2 (Blair *et al.*, 2001) foram relatados.

Mesmo tendo-se na literatura evidências de que diferentes efeitos podem ser observados na prole conforme o período do desenvolvimento inicial no qual o estímulo programador é aplicado, não existem trabalhos que comparem os períodos do desenvolvimento intrauterino (pré-implantação, embrionário e fetal) entre si, e com os períodos de gestação e lactação. Estudos considerando mais de um período de restrição, seja visando aspetos da síndrome metabólica ou da função reprodutiva, no geral, comparam apenas os períodos da gestação e da lactação de maneira isolada ou combinada.

Tendo em vista o crescente interesse em relação aos efeitos da programação fetal sobre a função reprodutiva da prole, este estudo visou investigar os efeitos da restrição proteica materna em diferentes intervalos do desenvolvimento inicial sobre o desempenho gestacional materno, o desenvolvimento e alguns aspectos reprodutivos da prole de ratas.

II Objetivos



II OBJETIVOS

O presente projeto teve por objetivo geral investigar a repercussão da restrição proteica materna durante diferentes momentos da prenhez e na lactação sobre o desempenho gestacional das matrizes e aspectos reprodutivos da progênie masculina e feminina, na puberdade e idade adulta. Especificamente, objetivou-se:

- Avaliar o desempenho gestacional de ratas (F0) que receberam dieta restrita em proteínas durante toda a gestação ou em um dos três períodos gestacionais: pré-implantação, embrionário e fetal.
- Na F1 de ratas alimentadas com a ração hipoproteica nos mesmos períodos gestacionais ou na lactação, determinar a idade de instalação da puberdade e os seguintes parâmetros: aos 55 dias (peri-puberdade) – a determinação dos níveis hormonais (FSH e LH em ambos os sexos, e testosterona nos machos), o peso dos órgãos reprodutivos femininos e masculinos e o aspecto histológico dos testículos. Na idade adulta os mesmos parâmetros foram avaliados, além do acompanhamento do ciclo estral, e a determinação da produção diária de espermatozoides e das reservas espermáticas no epidídimo e a avaliação da morfologia e motilidade espermáticas.

III Capítulo 1

III CAPÍTULO 1

Efeitos da restrição proteica materna em diferentes intervalos da prenhez ou na lactação sobre o desempenho gestacional e função reprodutiva da prole feminina

Effects of maternal protein restriction in different intervals of pregnancy or during lactation on maternal gestational performance and female offspring reproductive function

Gaspar, Ana Luisa Camolezi^{1,2}, Guerra, Marina Trevizan^{2,3}, Toledo, Fabíola de Choqueta^{2,3}, Anselmo-Franci, Janete Aparecida⁴ e Kempinas, Wilma De Grava³

¹Programa de Pós-graduação Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociência de Botucatu, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu/SP-Brasil

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociência de Botucatu, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu/SP-Brasil

³Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, UNICAMP – Universidade de Campinas, Campinas/SP-Brasil

⁴Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brasil.

Autor correspondente:

Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Distrito de Rubião Júnior sem número.

CEP: 18.618-970

e-mail: kempinas@ibb.unesp.br

Resumo

Estímulos adversos em períodos críticos do desenvolvimento inicial, como por exemplo, a desnutrição materna, podem resultar em alterações, predispondo a progênie a disfunções metabólicas e fisiológicas e ao desenvolvimento de doenças crônicas. Com o objetivo de se comparar os efeitos da restrição proteica materna em diferentes intervalos da prenhez ou na lactação sobre o desempenho gestacional e sobre aspectos reprodutivos da prole feminina, ratas *Wistar* prenhes foram distribuídas em seis grupos experimentais: 1) Controle, 2) Gestação, restrito durante toda a prenhez, do dia gestacional 0 (DG0) ao DG21, 3) Pré-implantação, restrito no período pré-implantação, do DG0 ao DG5, 4) Embrionário, restrito no período embrionário, do DG6 ao DG15, 5) Fetal, restrito no período fetal, do DG16 ao DG21, e 6) Lactação, restrito durante toda a lactação, do dia pós-natal 1 (DPN1) ao DPN21. As matrizes dos grupos controle e restritos foram alimentadas com ração normoproteica (proteína 17%) e hipoproteica (proteína 6%), respectivamente, conforme o delineamento experimental. O comportamento alimentar materno diferiu na gestação e na lactação, sendo que nos períodos correspondentes à restrição durante a gestação as matrizes comeram mais, enquanto na lactação, menos. Quanto ao desempenho gestacional apenas o peso fetal foi reduzido no grupo Gestação. O desenvolvimento geral dos filhotes do nascimento ao desmame (DPN21) diferiu entre os grupos e a restrição proteica durante a lactação levou a um retardo permanente no desenvolvimento da prole feminina até a idade adulta. Nas fêmeas do grupo Lactação, a instalação da puberdade (abertura vaginal) foi atrasada e o peso ovariano foi menor aos 55 dias, persistente até a idade adulta (DPN80). A ciclicidade estral, avaliada entre os DPNs 60 e 80, não foi alterada. De modo geral, a restrição proteica materna interferiu no desenvolvimento pré e pós-natal dos filhotes e também no desenvolvimento sexual das fêmeas, especialmente quando se deu durante a lactação.

Palavras-chave: Restrição proteica, programação fetal, desenvolvimento inicial, desempenho gestacional, ratas.

Abstract

Adverse stimuli during critical periods of early development, such as maternal undernutrition, may result in changes that predispose the offspring to physiological and metabolic dysfunctions and developing chronic diseases. Aiming to compare the effects of maternal protein restriction at different intervals of pregnancy or lactation on gestational performance and on reproductive aspects of female offspring, pregnant Wistar rats were divided into six groups: 1) Control, 2) Gestation, restricted during all pregnancy, from gestational day 0 (GD0) to GD21, 3) Pre-implantation, restricted during the pre-implantation period, from GD0 to GD5, 4) Embryonic, restricted during the embryonic period, from GD6 to GD15, 5) Fetal, restricted during the fetal period, from GD16 to GD21, and 6) Lactation, restricted during all lactation, from postnatal day 1 (PND1) to PND21. Dams of restricted and control groups were fed standard (protein 17%) and low protein (protein 6%) chow, respectively, according to experimental design. Maternal eating behavior differed between pregnancy and lactation, so that, in the restriction corresponding periods during pregnancy mothers ate more, and during lactation, less. About the gestational performance only fetal weight was reduced in the Gestation group. The general offspring postnatal development until weaning (PND21) differed among groups and protein restriction during lactation led to permanent growth retardation in the female pups until adulthood. In the Lactation group the onset of puberty was delayed in the female offspring (vaginal opening), and ovarian weight at PND55 was reduced, persisting until adulthood (PND80). Estrous cyclicity, assessed between PNDs 60 and 80 was not altered. In conclusion, maternal protein restriction interfered with pre and postnatal pups development and also with the sexual development of female offspring, specially when during lactation.

Keywords: *Protein restriction, Fetal programming, Gestational performance, Female reproduction, Rats.*

Introdução

O desenvolvimento intrauterino é caracterizado pelo crescimento celular proliferativo em todos os tecidos e, particularmente, pela vulnerabilidade a estímulos adversos, que podem prejudicar os padrões normais do desenvolvimento levando a déficits no número de células na placenta e em órgãos fetais, como por exemplo, a má-nutrição. Essas evidências são apoiadas por dados epidemiológicos e experimentais (Brasel e Winick, 1972).

A capacidade materna em prover nutrientes e oxigênio para o bebê é um fator crítico para sua saúde e sobrevivência. O feto é capaz de se adaptar à escassez de nutrientes, mas ao fazê-lo altera permanentemente a estrutura e o funcionamento de seu organismo (Martin-Gronnert e Ozzane, 2006). Segundo Holemans *et al.* (2003), o feto e o neonato conseguem se adaptar ao meio a que estão expostos, inclusive à disponibilidade de nutrientes. Adaptações do metabolismo fetal ao meio intrauterino alterado têm consequências para a prole e podem persistir até a idade adulta e serem transmitidas às gerações seguintes. Tal fenômeno foi chamado “Programação fetal” (Lucas, 1991) e já havia sido proposto para fetos humanos (Barker, 1997).

Os efeitos decorrentes da restrição nutricional materna sobre a prole variam muito com o grau de restrição, e podem resultar em adaptações no desenvolvimento visando aumentar o suplemento ou reduzir a demanda de energia, porém com consequências pós-natais. A natureza, tempo e intensidade de um desafio nutricional *in utero*, entre outros fatores, é que vão determinar o grau de restrição imposto ao feto e provavelmente ditar as estratégias adotadas para garantir ou melhorar a sua sobrevivência imediata (Cleal *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos já relataram que a subnutrição materna durante a gestação causou retardo no crescimento intrauterino (Zeman *et al.*, 1967; Lesage *et al.*, 2001; DelaHaye *et al.*, 2008). Prejuízos para o desenvolvimento da prole devido à subnutrição durante a lactação também foram relatados (Petry *et al.*, 1997; Zambrano *et al.*, 2005), bem como a associação entre esse desenvolvimento alterado e a predisposição ao surgimento de doenças crônicas mais tarde (Barker, 1997; Lau e Rogers, 2004).

A restrição proteica severa pode comprometer o desempenho gestacional materno, levando inclusive à redução no tamanho da ninhada em ratas (Nelson e Evans, 1953; Rees *et al.*, 1999). Alterações na função reprodutiva da prole feminina também foram relatadas, tais como: alterações hormonais (Guzmán *et al.*, 2006), atraso no desenvolvimento gonadal (Rhind *et al.*, 2001) e na idade de instalação da puberdade (Engelbregt *et al.*, 2000), redução do período reprodutivo (Guzmán *et al.*, 2006; Chernoff *et al.*, 2009), do peso ovariano, da

taxa de ovulação (Rae *et al.*, 2002) e da fertilidade (Guzmán *et al.*, 2006), além de dificuldade em se gerar prole (Bertran *et al.*, 2008).

Embora dentre os estudos prévios alguns evidenciem os efeitos da restrição proteica ou alimentar materna em alguns intervalos específicos do desenvolvimento inicial, são escassos os que comparam esses efeitos em intervalos diferentes, e quando o fazem levam em consideração apenas os períodos de gestação e lactação de forma isolada ou combinada. Assim, o presente estudo teve por objetivo averiguar se a restrição proteica materna em diferentes momentos da gestação (períodos pré-implantação, embrionário e fetal, e período completo) ou na lactação, interfere de maneiras distintas no desempenho gestacional materno e em alguns aspectos do desenvolvimento sexual da prole feminina.

Materiais e Métodos

Ratos machos e fêmeas da linhagem *Wistar* com idade em torno de 45 dias foram obtidos, não simultaneamente, do Biotério Central de Botucatu – Univ. Estadual Paulista-UNESP e mantidos no Biotério para Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP sob condições controladas de luminosidade (fotoperíodo de 12:12 horas, luzes acesas às 7:00 horas) e temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$). Os animais foram alojados em caixas de polietileno (43 x 30 x 15cm) forradas com maravalha autoclavada. Dieta sólida e água foram fornecidas *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP (Processo 119-CEEA).

Delineamento Experimental

Ratas virgens com idade em torno de 60 dias foram acasaladas com machos com cerca de 90 dias (duas fêmeas por macho) durante o período escuro do ciclo. A confirmação da cópula se deu pela verificação da presença de espermatozoides no lavado vaginal das ratas na manhã seguinte ao acasalamento e este foi considerado o dia zero de gestação (DG0). As ratas prenhes foram alojadas em caixas individuais e casualmente distribuídas nos seguintes grupos: 1) Controle (n=13), 2) Gestação, restrito durante todo o período de prenhez, do DG0 ao DG21 (n=12), 3) Pré-implantação, restrito durante o período pré-implantação, do DG0 ao

DG5 (n=12), 4) Embrionário, restrito durante o período embrionário, do DG6 ao DG15 (n=12), 5) Fetal, restrito durante o período fetal, do DG16 ao DG21 (n=13), e 6) Lactação, restrito durante toda a lactação, do dia pós-natal 1 (DPN1) ao DPN21 (n=7), sendo o dia do nascimento considerado o DPN0.

Parte das matrizes dos grupos restritos durante a gestação foi morta por decapitação no DG20 para a avaliação do desempenho gestacional. Os seguintes parâmetros foram considerados: peso do útero gravídico, número de pontos de implantação, número de pontos de reabsorção, número de fetos, número de placentas, peso médio dos fetos e das placentas, índice placentário médio, taxas de perda pré e pós-implantação, e os índices de fertilidade e gestação. As demais fêmeas (n=7/grupo) foram preservadas para o nascimento dos filhotes.

Durante os períodos de gestação e lactação as ratas receberam dieta sólida e água *ad libitum*. A restrição proteica se deu por meio de ração especial baseada em dieta isocalórica e normossódica. As matrizes dos grupos controle e restritos foram alimentadas, respectivamente, com ração normoproteica (proteína 17%) e hipoproteica (proteína 6%), conforme o delineamento experimental. As rações foram preparadas no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, e suas respectivas constituições nutricionais estão na Tabela 1.

O consumo materno de água e ração foi monitorado ao longo de todo o período experimental (gestação e lactação) e as matrizes e os filhotes foram periodicamente pesados para o acompanhamento da evolução de seus respectivos pesos corpóreos até o desmame (DPN21). No DPN1 as ninhadas foram padronizadas para 8 filhotes por matriz, e foram aferidas medidas como comprimento do corpo (distância céfalo-caudal) e a distância anogenital (DAG), parâmetro utilizado como marcador externo de diferenciação sexual, sendo aproximadamente duas vezes maior nos machos que nas fêmeas.

Após o desmame, os filhotes do sexo feminino foram preservados e avaliados quanto à idade de instalação da puberdade, peso dos órgãos reprodutivos e níveis de gonadotrofinas aos 55 (peri-puberdade) e 80 dias de idade (idade adulta), e a regularidade do ciclo estral.

Avaliação dos Aspectos Reprodutivos da Prole Feminina

Idade de Instalação da Puberdade

A partir do DPN30, a prole feminina foi acompanhada para averiguação do dia de instalação da puberdade, marcado externamente pela abertura vaginal (EUA-Agência de Proteção Ambiental Americana, 1996).

Peso de Órgãos e Ciclicidade Estral

No primeiro estro a partir do DPN55 uma fêmea de cada ninhada foi pesada e morta por decapitação (n=7/grupo), procedendo-se a coleta de sangue a partir da ruptura dos vasos cervicais para dosagem dos níveis de gonadotrofinas. Foram coletados ainda os ovários e o útero para pesagem. Os mesmos procedimentos foram adotados a partir do DPN80.

Para a avaliação da regularidade do ciclo estral, lavados vaginais foram coletados diariamente, e sempre no mesmo horário, entre os DPNs 60 e 80, conforme descrito por Marcondes *et al.* (2002). As fases do ciclo estral foram determinadas de acordo com os tipos celulares presentes no lavado e suas respectivas proporções: 1) Proestro: predominância de células epiteliais nucleadas, 2) Estro: predominância de células queratinizadas, 3) Metaestro: presença de células epiteliais, células queratinizadas e leucócitos aproximadamente na mesma proporção, e 4) Diestro: predominância de leucócitos. A duração do ciclo foi determinada por dois Estros consecutivos.

Dosagens Hormonais

Após a decapitação, o sangue foi coletado a partir da ruptura dos vasos cervicais em tubo cônico e centrifugado a 2500rpm por 20 minutos a 4°C para a separação do soro, que foi congelado e preservado a -20° para a dosagem dos níveis de gonadotrofinas (Hormônio Folículo Estimulante – FSH, e Hormônio Luteinizante – LH).

As concentrações séricas de LH e FSH foram determinadas por radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo utilizando Kits específicos fornecido pelo “National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases” (NIADDK; Baltimore, USA). Os anticorpos primários foram o anti-rat LH-S10 e FSH-S11, e as preparações padrões o LH-RP3 e o FSH-RP2. Os hormônios foram iodinados com ¹²⁵Iodo da NEN (Perkin Elmer, USA) e o segundo anticorpo foi produzido em ovelhas pelo Laboratório do Prof. Dr. C. R. Franci da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, utilizando como inócuo gamaglobulina de coelho. Todas as amostras foram dosadas em um mesmo ensaio para evitar erros inter-ensaios.

Análises Estatísticas

A comparação dos resultados foi feita por meio de Análise de Variância, One-way ANOVA, seguida pelo Teste para Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer ou pelo Teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrica), seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunn, conforme as características das variáveis. Os valores foram expressos, respectivamente,

como Média $\pm$ Desvio padrão e Mediana $\pm$ Desvio interquartílico. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

Resultados

Consumo Materno de Água e Ração

Ao longo da gestação a ingestão média diária materna de água não diferiu entre os grupos experimentais, mas o consumo de ração foi em geral maior durante os períodos de restrição. Já ao longo da lactação os consumos de água e ração pelas mães foram significativamente reduzidos no grupo alimentado com a ração hipoproteica nesse período (dados não mostrados).

Peso Corpóreo e Desempenho Gestacional das Matrizes

Ao longo da prenhez o peso materno não diferiu significativamente entre os grupos. Já ao longo da lactação, as matrizes pesaram menos que as dos demais grupos a partir do DPN14 devido a uma maior perda de peso corpóreo (dados não mostrados). Considerando-se a porcentagem de ganho de peso materno, esta foi menor no grupo Gestação durante a prenhez, mas a diferença em relação ao Controle não foi significativa (Figura 1A). Já durante a lactação houve uma perda de peso expressiva pelas matrizes do grupo restrito nesse período, significativa apenas em relação aos grupos Gestação, Embrionário e Fetal, mas não comparado ao Controle (Figura 1B).

A cerca do desempenho gestacional materno apenas o peso fetal (g) foi alterado, sendo menor no grupo Gestacional ($3,38 \pm 0,24$) em relação aos grupos Controle ($3,75 \pm 0,22$) e Fetal ($3,82 \pm 0,11$) ($p < 0,05$). Outros parâmetros importantes como tamanho da ninhada, peso da placenta e as taxas de perda pré e pós-implantação, não diferiram significativamente ($p > 0,05$).

Dados da Prole do Nascimento ao Desmame

Tanto o peso natal (g) como a distância céfalo-caudal (cm) foram alterados no DPN1. Filhotes dos grupos Gestação e Fetal pesaram menos ($5,79 \pm 0,46$ e $6,14 \pm 1,00$, respectivamente) em relação ao grupo Pré-implantação ($7,56 \pm 0,74$) ($p < 0,05$), mas não houve diferença de nenhum desses grupos em relação ao Controle ($6,77 \pm 0,56$) ($p > 0,05$). O comprimento corpóreo foi reduzido no grupo Gestacional ($4,74 \pm 0,14$) comparado ao Pré-

implantação ($5,19 \pm 0,26$) ($p < 0,05$), mas também não diferiu do Controle ($4,96 \pm 0,17$) ($p > 0,05$). A distância anogenital e o índice anogenital não diferiram entre os grupos. Quando considerados todos esses parâmetros em relação ao sexo dos filhotes, as mesmas variações foram observadas (dados não mostrados).

Os pesos corpóreos dos filhotes desde o nascimento (DPN1) até a idade do desmame (DPN21) estão na Tabela 2. Aos 7 dias de idade, a prole de mães do grupo Gestação foi mais leve que aquelas dos grupos Controle, Pré-implantação e Embrionário, e do grupo Lactação foi mais leve que a de todos os grupos, exceto o Gestação. Já nos DPNs 14 e 21, os filhotes do grupo Gestação foram mais leves que os do grupo Pré-implantação apenas, e aqueles do grupo Lactação formam menores comparados a todos os outros grupos experimentais. De modo geral, a restrição proteica materna durante a lactação resultou em uma taxa de crescimento pós-natal reduzida para os filhotes, representada por um menor ganho de peso corpóreo, em que a partir do DPN7 eles foram significativamente mais leves.

Aspectos Reprodutivos da Prole Feminina

Instalação da Puberdade

A idade de instalação da puberdade está representada na Figura 2. A abertura vaginal foi significativamente atrasada no grupo Lactação, comparado aos demais grupos e nos grupos Gestação e Pré-implantação ela foi, respectivamente, atrasada e adiantada, embora as diferenças não tenham sido significativas.

Peso dos Órgãos Reprodutivos, Dosagens Hormonais e Ciclicidade Estral

O peso corpóreo (g) das fêmeas do grupo Lactação foi menor que nos demais grupos experimentais aos 55 e aos 80 dias de idade. No DPN55, o peso absoluto dos ovários (g) foi reduzido no grupo Lactação ($0,05 \pm 0,008$) comparado ao Controle ($0,07 \pm 0,01$) ($p < 0,05$). Essa redução persistiu até a idade adulta, quando o peso ovariano (g) no grupo Lactação ($0,06 \pm 0,012$), foi menor que nos grupos Controle ($0,08 \pm 0,018$) e Fetal ($0,08 \pm 0,016$) ($p < 0,05$). O peso do útero e os pesos relativos não diferiram entre os grupos em nenhuma das idades (dados não mostrados).

Os níveis séricos de gonadotrofinas não foram alterados pela restrição proteica materna, aos 55, nem aos 80 dias de idade. Da mesma forma, não houve diferença entre os grupos quanto à regularidade do ciclo estral, seja em relação à frequência das fases, ou à duração do ciclo (dados não mostrados).

Discussão

O estado nutricional materno é crucial para o sucesso reprodutivo. No presente estudo foi observado que durante a gestação a restrição proteica resultou em uma ingestão alimentar maior pelas mães alimentadas com a ração restrita, o que concorda com relatos prévios (Desai *et al.*, 1996) e pode ser explicado pelo fato de que a deficiência de algum nutriente na dieta resultaria em estímulo de consumo no intuito de aumentar a disponibilidade do nutriente limitado (Widdowson e McCance, 1975).

Já ao longo da lactação houve uma redução significativa no consumo materno de ração e também de água. Segundo Mercer *et al.* (1994), quando há uma redução extrema no conteúdo de proteínas na dieta, o organismo tende a compensar aumentando a mobilização de proteína corporal (endógena) para suprir as suas necessidades nutricionais mínimas. As principais proteínas mobilizadas são a hemoglobina e a carnosina musculares que contêm níveis relativamente altos de histidina. A perda líquida de proteína corpórea também resulta na redução da atividade da enzima histidase hepática. Assim, a combinação desses dois fatores resulta em níveis elevados de histidina plasmática. A histidina atravessa a barreira hemato-encefálica e é convertida em histamina, um neurotransmissor que atua por meio de receptores no hipotálamo reduzindo a ingestão voluntária (Jessop, 1997), explicando assim os diferentes comportamentos alimentares observados durante a gestação e a lactação.

O peso corpóreo materno não diferiu entre os grupos durante a gestação, mas durante a lactação as matrizes alimentadas com a ração restrita pesaram significativamente menos a partir do DPN14, concordando com a menor ingestão alimentar. Ao se considerar a porcentagem de ganho de peso corpóreo, observou-se que durante a gestação ela foi menor nas matrizes alimentadas com a ração hipoproteica durante todo o período, em relação às demais, embora essa diferença não tenha sido significativa. Mesmo o consumo alimentar sendo em média maior, este não foi suficiente para suprir a carência de proteínas na dieta. Na literatura, os relatos variam desde nenhum efeito (Rees *et al.*, 1999) até redução significativa no ganho de peso materno ao longo da gestação (Zeman *et al.*, 1967). Durante a lactação, houve uma perda de peso expressiva nas matrizes do grupo Lactação, significativa apenas em relação aos grupos Gestação, Embrionário e Fetal. A perda de peso corpóreo menor pelas matrizes destes três grupos ao longo do período lactacional indica uma provável recuperação no estado nutricional das mesmas.

Quanto ao desempenho gestacional, apenas o peso fetal foi alterado, sendo reduzido no grupo Gestação, comparado aos grupos Controle e Fetal. Retardo no crescimento

intrauterino na prole de ratas subnutridas durante a prenhez foi relatado também por outros autores (Woodal *et al.*, 1996; Holemans *et al.*, 2003; Ballen *et al.*, 2009). Considerando-se que o ganho de peso pelo feto é mais expressivo nos últimos dias de gestação, os efeitos da restrição proteica ainda não haviam sido sentidos pelos filhotes do grupo Fetal no momento da laparotomia (DG20), mas ao nascimento eles foram em média mais leves que aqueles do grupo Controle, embora não tenha havido diferença significativa.

Diversos estudos relataram alterações no peso da placenta, tanto redução (Malandro *et al.*, 1996; Fernandez-Twinn *et al.*, 2003), como aumento (McCrabb *et al.*, 1991; Osgerby *et al.*, 2002), de acordo com o período da restrição nutricional materna, embora no presente estudo esse parâmetro não foi significativamente afetado. A placenta tem papel fundamental para o sucesso da reprodução em mamíferos, pois constitui a interface de comunicação entre os organismos materno e fetal, de forma que alterações no desenvolvimento desse órgão provavelmente vão resultar em alterações no desenvolvimento fetal (Jansson e Powell, 2007).

As taxas de perdas pré e pós-implantação e o tamanho da ninhada não foram alterados, em nenhum dos grupos restritos durante a gestação, discordando de trabalhos prévios que verificaram aumento no número de reabsorções (perdas pós-implantação) (Nelson e Evans, 1953) e redução no número de filhotes (Rees *et al.*, 1999). Dados da literatura mostraram que do conteúdo sérico de aminoácidos livres maternos e fetais, apenas a Treonina apresentou redução induzida pela dieta, e alterações no grupo de aminoácidos Treonina-Metionina-Homocisteína no início da prenhez poderia ser o ponto-chave nutricional que leva aos efeitos adversos da deficiência de proteínas, sendo a Treonina de particular importância (Rees *et al.*, 1999).

A distância anogenital é considerada um marcador de diferenciação sexual, sendo em média duas vezes maior em machos que nas fêmeas. No presente estudo a restrição proteica não alterou esse parâmetro, nem o índice anogenital (valor corrigido pelo peso corpóreo), embora outros autores já tenham observado alterações na distância anogenital nas proles feminina (Guzmán *et al.*, 2006) e masculina (Zambrano *et al.*, 2005).

O desenvolvimento intrauterino dos filhotes, estimado pelo peso e comprimento corpóreos no DPN1, foi afetado de diferentes maneiras de acordo com o intervalo de restrição proteica. Enquanto os filhotes dos grupos Gestação e Fetal foram em média menores e mais leves, os do grupo Pré-implantação foram maiores e mais pesados. Já na idade do desmame (21 dias), os filhotes do grupo Fetal praticamente não diferiam mais do grupo Controle, mostrando um crescimento compensatório. No grupo Gestação também houve um crescimento compensatório, porém este foi um pouco mais tardio, uma vez que aos 55 dias as

fêmeas já não diferiam mais dos outros grupos, (exceto o grupo Lactação). Crescimento pós-natal compensatório também foi relatado em outros estudos (Drouillard *et al.*, 1991; Kwong *et al.*, 2000; Desai *et al.*, 2005; Ozanne e Hales, 2005; Bieswal *et al.*, 2006).

No grupo Pré-implantação, o crescimento compensatório parece ter ocorrido ainda durante o desenvolvimento intrauterino, principalmente nos últimos dias da gestação. Embora não tenha sido significativo em relação ao Controle, o peso fetal no grupo Pré-implantação no DG20 foi em média menor, e ao nascimento maior. A gestação das fêmeas desse grupo durou um dia a mais que nos demais. Cleal *et al.* (2007) relataram em ovelhas que a restrição proteica no início da gestação resultou em um pequeno aumento da sua duração e esse aumento, mesmo modesto, poderia ser parte de uma estratégia permitindo um tempo maior *in utero* para maturação e crescimento, ou ainda, causando alterações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que confira alguma vantagem posteriormente. De acordo com esses autores, a estratégia desenvolvimentista adotada pela unidade materno-fetal depende em grande parte do momento, intensidade e duração da restrição. Kwong *et al.* (2000) sugerem uma possível influência da restrição proteica materna durante a gestação na programação do peso natal e na taxa de crescimento pós-natal e ainda, que sensibilidades sexo-específicas parecem existir.

Diversos trabalhos relacionam o baixo peso ao nascimento a um aumento na predisposição ao desenvolvimento de doenças na vida adulta, como diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares (Godfrey e Barker, 2001). Outros vêm associando também o crescimento compensatório (“*catch up growth*”) ao risco aumentado de doenças crônicas, como a obesidade, além das que já foram citadas, e que a magnitude dos efeitos depende do tipo e período da desnutrição inicial (Langley-Evans 2001; Bieswal *et al.*, 2006). O crescimento compensatório devido a retardo no desenvolvimento *in utero* também foi associado à uma menor sobrevivência em estudos com camundongos (Ozanne e Hales, 2005).

A restrição proteica durante a lactação resultou em uma taxa de crescimento menor, representada pelo menor ganho de peso pelos filhotes, significativamente mais leves desde o DPN7 e esses dados corroboram estudos prévios (Zambrano *et al.*, 2006). Sampson *et al.* (1986) observaram que a qualidade e a quantidade de proteína, e o nível de alimentação (controlado ou *ad libitum*) maternos afetam a síntese proteica, influenciando o valor nutricional das proteínas do leite e, conseqüentemente, o peso dos filhotes. Outro estudo revelou prejuízo no desempenho lactacional de ratas submetidas à restrição proteica durante a lactação, representada por um menor ganho de peso dos filhotes durante o período de aleitamento, e também por uma maior depleção no conteúdo proteico no organismo materno

(Pine *et al.*, 1994). De fato, o peso corpóreo reduzido nos filhotes do grupo Lactação, persistente até a idade adulta nas fêmeas, revela a importância do estado nutricional materno para a qualidade do leite e desempenho lactacional, e concorda com estudos prévios que apontam a lactação como o período mais crítico para o desenvolvimento geral da prole (Petry *et al.*, 1997).

A puberdade caracteriza o início da capacidade reprodutiva de um indivíduo, sendo um evento dependente de estímulos hormonais específicos, que podem ser influenciados por diversos fatores endógenos e exógenos, e a nutrição é muito importante. (Kennedy e Mitra, 1963; Glass e Swerdloff, 1980; Cameron, 1996). Em fêmeas, um marco externo do início da puberdade é a abertura vaginal, e no presente estudo ela foi significativamente atrasada no grupo Lactação, embora nos grupos Gestação e Pré-implantação ela foi em média, atrasada e adiantada, respectivamente. Atraso na idade de abertura vaginal já foi relatado em outros estudos devido a restrição alimentar ou proteica seja na gestação (Engelbregt *et al.*, 2000), ou na lactação (Faria *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2006).

Alguns autores consideram que o peso e, principalmente, a composição corpórea relacionada ao percentual de gordura, influenciam na instalação da puberdade em ratos (Frisch *et al.*, 1977; Frisch, 1990), e a leptina, um hormônio derivado do tecido adiposo, atuaria como sinalizador, ligando a adiposidade e a função reprodutiva, de forma que os níveis circulantes desse hormônio determinariam o início da puberdade (Ahima *et al.*, 1997). De fato o organismo feminino, demanda uma grande reserva energética para a reprodução, justificando assim a importância das reservas de gordura no momento da maturação sexual, no entanto, ainda existem controvérsias a cerca desta hipótese (Foster e Nagatani, 1999) e de acordo com Judd (1998) mudanças na massa gorda apenas, não seriam suficientes para fornecer um sinal. Engelbregt *et al.* (2001) concluíram que, de fato, o início da puberdade não depende apenas das reservas corpóreas de gordura ou dos níveis circulantes de leptina.

Dos demais parâmetros reprodutivos avaliados na prole feminina, apenas o peso ovariano foi reduzido no grupo Lactação aos 55 dias, persistente até a idade adulta (80 dias). Mas os pesos relativos não foram afetados, concordando com o fato de que essa prole foi menor. Assim, o peso ovariano reduzido pode estar associado a uma menor taxa de crescimento. Redução no peso ovariano na prole de mães com privação alimentar já foi observada em diferentes modelos animais, em diferentes idades e usando-se diferentes delineamentos experimentais (Rhind *et al.*, 2001; Guzmán *et al.*, 2006). Os relatos variaram desde atraso no desenvolvimento gonadal (Rhind *et al.*, 2001) até alteração na função

ovariana, caracterizada pela redução na taxa de ovulação, não necessariamente associada a alterações nos níveis de gonadotrofinas (Rae *et al.*, 2002).

Os níveis séricos de gonadotrofinas não foram alterados, corroborando estudos prévios em ovelhas (Rae *et al.*, 2002), embora Guzmán *et al.* (2006) tenham observado que a restrição proteica materna durante a gestação e/ou na lactação em ratas reduziu os níveis de LH na fase de Diestro, enquanto no presente estudo, os níveis hormonais foram aferidos na fase de Estro do ciclo.

Em estudo prévio, a ciclicidade estral entre 2 e 4 meses de idade em ratas submetidas a restrição nutricional durante o desenvolvimento inicial não foi alterada (Chernoff *et al.*, 2009), concordando com o observado no presente trabalho. Porém, vários estudos têm apontado para um adiantamento da senescência reprodutiva feminina em ratas (Guzmán *et al.*, 2006; Chernoff *et al.*, 2009) e também em ovelhas (Gunn *et al.*, 1995; Rhind *et al.*, 2001), caracterizada pela perda precoce da função ovariana e por irregularidades no ciclo estral.

Em suma, a restrição proteica durante os períodos de gestação e lactação influenciou o comportamento alimentar materno, promovendo aumento na ingestão média diária nos períodos correspondentes à restrição durante a prenhez, enquanto na lactação houve redução, o que interfere na disponibilidade de nutrientes para a prole e, consequentemente, em seu desenvolvimento. De fato, o desenvolvimento intrauterino e pós-natal dos filhotes, bem como o desenvolvimento sexual da prole feminina foram influenciados de diferentes maneiras conforme o intervalo de restrição, sendo as consequências mais severas quando a restrição proteica materna se deu durante o período de lactação, resultando em uma menor taxa de crescimento pós-natal, caracterizada pelo peso corpóreo da prole reduzido até a idade adulta, e também prejuízos para a função reprodutiva feminina, como atraso na idade de instalação da puberdade e redução do peso ovariano.

Agradecimentos

Este estudo teve apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), na forma de uma bolsa de Mestrado. Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, pela ajuda no processamento das rações.

Referências

- Ahima, R. S.; Dushay, J.; Flier, S. N.; Prabakaran, D.; Flier, J. S. Leptin Accelerates the Onset of Puberty in Normal Female Mice. *J. Clin. Invest.*, v.99, p.391–395, 1997.
- Ballen, M. L. O.; Moretto, V. L.; Santos, M. P.; Gonçalves, T. S. S.; Kawashita, N. H.; Stoppiglia, L. F.; Martins, M. S. F.; Gomes-da-Silva, M. H. G. Restrição proteica na prenhez – efeitos relacionados ao metabolismo materno. *Arq. Bras. Endocrinol Metab.*, v.53(1), p.87-94, 2009.
- Barker, D. J. P. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Brit. Med. Bull.*, v.53, p.96-108, 1997.
- Bertram, C.; Khan, O.; Ohri, S.; Phillips D. I.; Matthews, S. G.; Hanson, m. a. Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenalfuction. *J. Physiol.*, v.586(8), pp.2217–2229, 2008.
- Bieswal, F., Ahn, M .T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W. D., and Remacle, C. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity*, v.14, p.1330-1343, 2006.
- Brasel, J. A. e Winick, M. Maternal nutrition and prenatal growth – Experimental studies of effects of maternal undernutrition on fetal and placental growth. *Arch. Dis. Child.*, v.47, p.479-485, 1972.
- Cameron, J. L. Nutritional determinants of puberty. *Nutr. Rev.*, v.54, p.S17-S22, 1996.
- Chernoff, N.; Gage, M. I.; Stoker, T. E.; Cooper, R. L.; Gilbert, M. E.; Rogers, E. H. Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: Age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. *Reprod. Toxicol.*, v.28, p.489-494, 2009.
- Cleal, J. K.; Poore, K. R.; Newman, J. P.; Noakes, D. E.; Hanson, M. A.; Green, A. L. R. The effect of maternal undernutrition in early gestation on gestation length and fetal and postnatal growth in sheep. *Pediatr. Res.*, v. 62, p.422-427, 2007.
- DelaHaye, F.; Breton, C.; Risold, P. Y.; Enache, M.; Dutriez-Casteloot, I.; Laborie, C.; Lesage, J.; Vieau, D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*, v.149, p.470-475, 2008.
- Desai, M.; Crowther, N. J.; Lucas, A.; Hales, C. N. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Brith. J. Nutri.*, v.76, p.591-603, 1996.

- Desai, M.; Gayle, D.; Babu, J.; Ross, M. G. programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: Modulation by newborn nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.288, p.R91-R96, 2005.
- Drouillard, J. S.; Ferrel, C.L.; Klopfenstein, T. J.; Britton, R. A. compensatory growth following metabolizable protein or energy restrictions in beef steers. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.811-818, 1991.
- Engelbregt, M. J. T.; Houduk, M. E. C. A. M.; Popp-Sniders, C.; Delamarre-van de Wall, H. A. The effects of intrauterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr. Res.*, v.48, p.803-807, 2000.
- Engelbregt, M. J. T.; Weissenbruch, M. M.; Popp-Snijders, C.; Lips, P.; Delemarre-van de Waal, H. A. Body mass index, body composition, and Leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. *Pediatr. Res.*, v.50, p.474-8, 2001.
- EUA – Agência de Proteção Ambiental Americana - EPA. Reproductive Toxicity Risk Assessment Guidelines, v.61, p.56273-56322, 1996.
- Faria, T. S.; Ramos, C. F.; Sampaio, F. J. B. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J. Nutr. Biochem.*, v.15, p.123-127, 2004.
- Fernandez-Twinn, D. S.; Ozanne, S. E.; Ekizoglou, S.; Doherty, C.; James, L.; Gusterson, G.; Hales, C. N. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intrauterine growth restriction. *Brith. J. Nutri.*, v.90, p.815-822, 2003.
- Foster, D.L.; Nagatani, S. Physiological Perspectives on Leptin as a Regulator of Reproduction: Role in Timing Puberty. *Biol. Reprod.*, v.60, p.205-215, 1999.
- Frisch, R. E.; Hegsted, D.M.; Yoshinaga, K. Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: body water, protein, and fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.74, p.379-383, 1977.
- Frisch R. E. Body fat, menarche, fitness and fertility. In 'Adipose Tissue and Reproduction'. Ed. R. E. Frisch. Basel, Switzerland: S. Karger, p. 1-26, 1990.
- Glass, A. R.; Swerdloff, R. S. Nutritional influences on sexual maturation in the rat. *Fed. Proc.*, v.39, p.2360-2364, 1980.
- Godfrey, K. M. e Barker, D. J. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.*, v.4, p.611-624, 2001.

- Gunn, R.G.; Sim, D.; Hunter, E.A. Effects of nutrition *in utero* and in early life on the subsequent lifetime reproductive performance of Scottish Blackface ewes in two management systems. *Anim. Sci.*, v.60, p.223–230, 1995.
- Guzmán, C.; Cabrera, M.; Cárdenas, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W., Zambrano, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J. Physiol.*, v.572, p.97-108, 2006.
- Holemans, K.; Aerts, L.; Van Assche, F. A. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J. Soc. Gynecol. Invest.*, v.10, p.392-399, 2003.
- Jansson, T. e Powell, T. L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical Science*, v.113, p.1–13, 2007.
- Jessop, N. S. Protein metabolism during lactation. *Proc. Nutr. Soc.*, v.56, p.169-175, 1997.
- Judd, S. J. Disturbance of the reproductive axis induced by negative energy balance. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.10, p.65-72, 1998.
- Kennedy, G. C.; Mitra, J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.*, v.166, p.408-18, 1963.
- Kwong, W. Y.; Wild, A. E.; Roberts, P.; Willis, A. C.; Fleming, T. P. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, v.127, p.4195-4202, 2000.
- Langley-Evans, S. C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *P. Nutr. Soc.*, v.60, p.505-513, 2001.
- Lau, C.; Rogers, J. M. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res.*, v.72, p.300-312, 2004.
- Lesage, J.; Blondeau, B.; Grino, M.; Bréant, B.; Dupouy, J. P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*, v.142, p. 1692-1702, 2001.
- Lucas, A. Programming by early nutrition in man. *CIBA Found. Symp.*, v.158, p.38-50, 1991.
- Malandro, M. S.; Beveridge, M. J.; Kilberg, M. S.; Novak, D. A. Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v.271, p.C295-C303, 1996.
- Marcondes, F. K.; Bianchi, F. J.; Tanno, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, v.62, p.609-614, 2002.

- Martin-Gronert, M. S. e Ozanne, S. E. Maternal niutrition during pregnancy and health of the offspring. *Biochem. Soc. T.*, v.34, p. 779-782, 2006.
- Mercer, L. P.; Kelly, D. S.; Humphries, L. L.; Dunn, J. D. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. *J. Nutr.*, v.124, p.1029–1036, 1994.
- McCrabb, G. J.; Egan, A. R.; Hosking, B. J. Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep. Placental size and its relationship to calcium transfer during late pregnancy. *Brit. J. Nutr.*, v.65, p.157-168, 1991.
- Nelson, M. M. e Evans, H. M. Relation of dietary protein levels to reproduction in the rat. *J Nutr*, v.51(1), p.71-84, 1953.
- Osgerby, J. C.; Wathes, D. C.; Howard, D.; Gadd, T. S. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J. Endocrinol.*, v.173, p.131-141, 2002.
- Ozanne, S. E. e Hales, C. N. Poor fetal growth followed by rapid postnatal catch-up growth leads to premature death. *Mech. Ageing Dev.*, v.126(8), p.852-854, 2005.
- Petry, C. J.; Desai, M.; Ozanne, S. E.; Hales, C. N. Early and late nutritional windows for diabetes susceptibility. *Proc. Nutr. Soc.*, v.56, p.233-242, 1997.
- Pine, A. P.; Jessop, N. S.; Oldham, J. D. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. *Brith. J. Nutri.*, v.71, p.13-27, 1994.
- Rae, M. T.; Kyle, C. E.; Miller, D. W.; Hammond, A. J.; Brooks, A. N.; Rhind, S. M. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim. Reprod. Sci.*, v.15, p.63-71, 2002.
- Rees, W. D.; Hay, S. M.; Buchan, V.; Antipatis, C.; Palmer, R. M. The effects of maternal protein restriction on the rat fetus and its amino acid supply. *Br. J. Nutr.*, v.81, p.243-250, 1999.
- Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. AIN-93Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, v.123, p.939-1951, 1993.
- Rhind, S. M.; Rae, M. T.; Brooks, A.N. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction*, v.122, p.205–214, 2001.
- Sampson, D. A.; Hunsaker, H. A.; Jansen, G. R. Dietary protein quality, protein quantity and food intake: Effects on lactation and on protein synthesis and tissue composition in mammary tissue and liver in rats. *J. Nutr.*, v.116, p. 365-375, 1986.
- Widdowson, E. M. e McCance, R. A. A review: new thoughts on growth. *Pediatr. Res.*, v.9, p.154-156, 1975.

- Woodal, S. M.; Johnston, B. M.; Breir, B. H.; Gluckman, P. D. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr. Res.*, v.40, p.438-443, 1996.
- Zambrano, E. Rodriguez-González, G. L.; Guzmán, C.; García-Becerra, R.; Boeck, L.; Díaz, L.; Menjivar, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol.*, v.563, p.275-284, 2005.
- Zambrano, E.; Bautista, C. J.; Déas, M.; Martínez-Samayoa, P. M.; González-Zamorano, M.; Ledesma, H.; Morales, J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J. Physiol.*, v.571, p.221-230, 2006.
- Zeman, F. J. Effect on the young rat of maternal protein restriction. *J. Nutr.*, v. 93, p.167-173, 1967.

Tabelas

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas (g/Kg)

Ingrediente	Normoproteica * (17% proteína)	Hipoproteica (6% proteína)
Amido de milho	397	480
Caseína (84%)	202	71,5
Dextrina (90-94%)	130,5	159
Sacarose	100	121
Óleo de soja	70	70
Fibra (Microcelulose cristalina)	50	50
Mistura de minerais **	35	35
Mistura de vitaminas **	10	10
L-cistina	3	1
Bitartarato de colina	2,5	2,5

*Dieta para as fases de crescimento, prenhez e lactação de roedores-AIN-93G (Reeves, 1993).

**Segundo AIN-93G.

Tabela 2 – Evolução do peso dos filhotes dos diferentes grupos experimentais do nascimento ao desmame

Dia Pós-natal	Controle	Gestacional	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
1	6,77 ± 0,56 ab**§	5,79 ± 0,46 a	7,56 ± 0,74 b	6,58 ± 0,67 ab	6,14 ± 1,00a	6,55 ± 0,58 ab
7	17,58 ± 1,10 ac	14,48 ± 1,82 bd	18,86 ± 1,29 c	17,36 ± 1,48 ac	15,71 ± 1,85 ab	12,92 ± 1,09 d
14	33,44 ± 4,37 ab	28,46 ± 2,63 a	35,57 ± 3,29 b	32,42 ± 3,79 ab	3,19 ± 2,2 ab	16,49 ± 1,96 c
21	54,15 ± 6,80 ab	48,67 ± 3,95 a	57,74 ± 3,68 b	53,87 ± 6,19 ab	53,34 ± 2,81 ab	21,89 ± 2,53 c

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Legenda das Figuras

Figura 1 – Porcentagem de ganho de peso corpóreo pelas matrizes ao longo dos períodos de Gestação (A) e Lactação (B) nos diferentes grupos experimentais. Resultados expressos como Mediana $\pm$ Desvio interquartílico (Kruskal-Wallis). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. C=Controle, G=Gestação, PI=Pré-implantação, E=Embrionário, F=Fetal, L=Lactação.

Figura 2 – Idade de abertura vaginal nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (One-way ANOVA). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. C = Controle, G = Gestação, PI = Pré-implantação, E = Embrionário, F = Fetal, L = Lactação.

Figuras

Figura 1

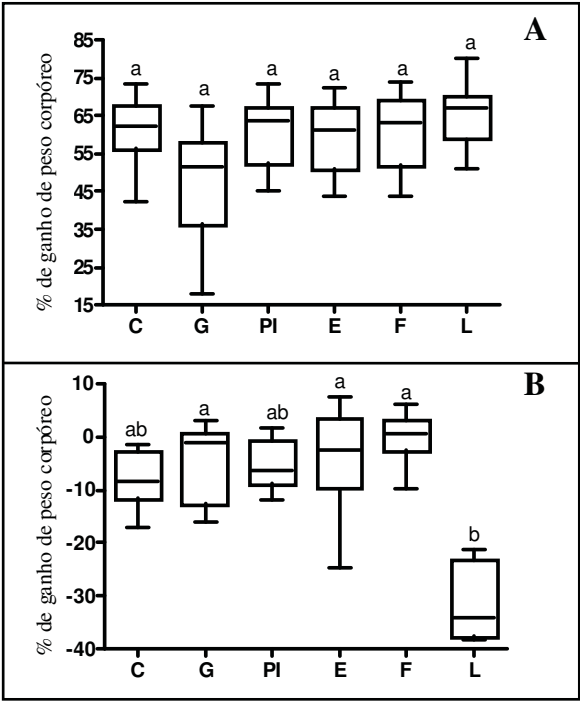
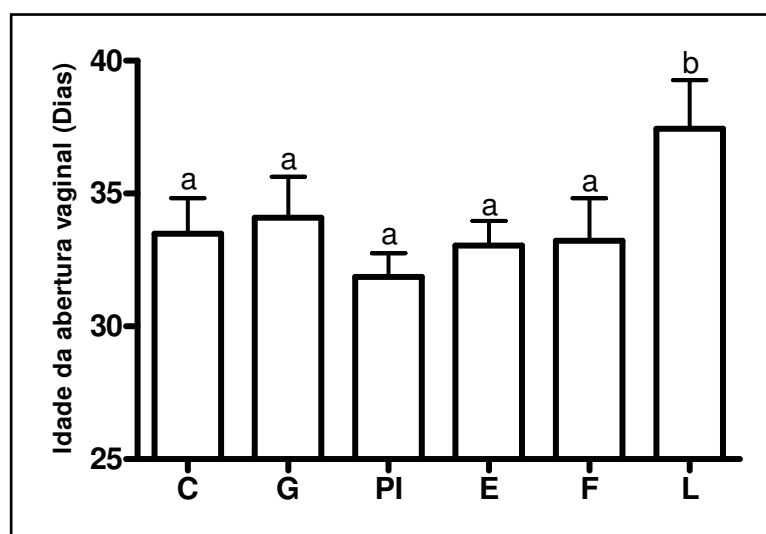


Figura 2



IV Capítulo 2

IV CAPÍTULO 2

Este trabalho foi submetido ao periódico “*Reproduction, Fertility and Development*”.

Differential reproductive effects in male offspring after maternal protein restriction in different intervals of rat early development

Gaspar, Ana Luisa Camolezi^{1,2}, Toledo, Fabíola de Choqueta^{2,3}, Perobelli, Julina Elaine^{2,3}, Silva, Denise Salioni^{1,2}, Anselmo-Franci, Janete Aparecida⁴, and Kempinas, Wilma De Grava³

¹Graduate Program on General and Applied Biology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu/SP-Brazil,

²Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu/SP-Brazil,

³Graduate Program on Cell and Structural Biology, Biology Institute, UNICAMP – State University of Campinas, Campinas/SP-Brazil,

⁴Department of Morphology, Stomatology and Physiology, School of Dentistry, USP – University of São Paulo, Ribeirão Preto/SP, Brazil.

Correspondent Author:

Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Distrito de Rubião Júnior sem número.

CEP: 18.618-970

e-mail: kempinas@ibb.unesp.br

Abstract

Maternal protein restriction is an experimental model for fetal programming whose effects on birth weight and reproductive function – and provocation of metabolic and physiological alterations – are well established. However, the specific developmental period at which the restriction occurs may program the progeny in different ways. To compare the effects of maternal protein restriction in different intervals of the early development on the growth and reproductive function of male offspring, pregnant *Wistar* rats were assigned into six groups (n=7dams/group): 1) Control; 2) restricted during pregnancy (Gestation); 3) restricted during the Pre-implantation period; 4) restricted during the Embryonic period; 5) restricted during the Fetal period and 6) restricted during Lactation. Dams were fed either control (protein 17%) or low protein (protein 6%) chow, according to the experimental design. Postnatal development was retarded in Lactation group whose reproductive organ weights were decreased at PND55 ($p<0.05$). At PND90 FSH levels were increased in Lactation group ($p<0.05$), and testicular sperm count was diminished in Gestation and Lactation groups compared to Control ($p<0.05$). In conclusion, maternal protein restriction affected the development and the reproductive function of male offspring, most critically during lactation.

Keywords: Fetal programming, Protein restriction, Gestation, Lactation, Male reproduction, Rat.

Introduction

The epidemiological profile of the worldwide population has undergone relevant changes in recent decades. Main causes of death and disability have shifted from a predominance of nutritional deficiencies and infectious diseases to degenerative or chronic diseases, such as cardiovascular diseases, hypertension, cancer, diabetes, obesity and dyslipidemia. This phenomenon has been called “the epidemiological transition” (Omran, 1971; Yusuf *et al.*, 2001), a profile shift that may have resulted from lifestyle changes, especially in relation to eating habits and physical activity.

Epidemiological data have pointed to a strong inverse association between birth weight and risk for chronic diseases (Lau and Rogers, 2004); and fetal programming is the term used to refer to this relationship. According to Lucas (1991), who first proposed the concept, fetal programming is a general process by which a stimulus or insult applied in a critical or sensitive period of development can lead to long-lasting or permanent changes in the structure and physiology of the organism. For example, an altered growth pattern that aims to improve immediate survival (Cleal *et al.*, 2007) would predispose individuals to chronic diseases later in life (Langley-Evans *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2001). Several epidemiological studies have also shown a “U” shaped relationship between birth weight and chronic disease risk (Barker, 1995; Lau and Rogers, 2004). That is, not only babies with low birth weight, but those ones above the average also represent a high risk group.

Several experimental models that have been proposed to study this phenomenon include: maternal protein or food restriction, induced maternal diabetes, restricted uterine blood flow, fetal overexposure to glucocorticoids (Zambrano *et al.*, 2005a), pre-eclampsia (Myatt, 2006), and also by prenatal maternal stress that leads to intrauterine overexposure to glucocorticoids (Kapoor *et al.*, 2006).

Experimental studies in this field, in general, focus on metabolic dysfunctions using maternal undernutrition, protein or food restriction, as the programming stimulus due to epidemiological evidence from the famine periods of the Second World War, for example.

Recent years have seen an increased interest in programming effects on the reproductive tract structure and function (Bielli *et al.*, 2002; Rae *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 2005b; Guzmán *et al.*, 2006; Chernoff *et al.*, 2009; Genovese *et al.*, 2010). Effects already reported among male offspring include hormonal changes (Zambrano *et al.*, 2005b; Teixeira *et al.*, 2007), increase in the anogenital distance, delayed testicular descent (Zambrano *et al.*, 2005b), altered puberty age (Engelbregt *et al.*, 2000; Chernoff *et al.*, 2009), reduced weight

and morphofunctional alterations in the testes (Bielli *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 2005b; Teixeira *et al.*, 2007; Genovese *et al.*, 2010), besides reductions in the sperm count and fertility rate (Zambrano *et al.*, 2005b).

Although some of these studies consider different intervals of restriction, none of them compared the effects of fetal programming in the different periods of pregnancy (Pre-implantation, Embryonic and Fetal), or during lactation. Therefore, the objective of this study was to compare the effects of a programming stimulus in different intervals of pregnancy or during lactation on the male progeny's postnatal growth and on some aspects of their reproductive function, aiming to identify which of these periods would be the most critical one, using maternal protein restriction as the experimental model.

Materials and Methods

Male and female Wistar rats 45 days old were obtained from the Central Vivarium of Botucatu – Univ. Estadual Paulista-UNESP. Animals were housed in polypropylene cages (43cm x 30cm x 15cm) with laboratory-grade pine shavings as bedding under controlled conditions of light (12:12 hours photoperiod, lights on 7:00am) and temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$). All experimental procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animals Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEAA) of the Institute of Biosciences of Botucatu-UNESP (Process 119-CEEAA).

Experimental Design

When females were about 60 and males 90 days old, they were allowed to mate (2 females for each male) in the dark phase of the photoperiod. The copulation was confirmed by the presence of sperm in the vaginal smears of females in estrus in the following morning. This was considered the gestational day 0 (GD0).

Pregnant rats were housed individually in cages and randomly assigned into the following experimental groups (n=7dams/group): (1) Control; (2) Gestation (restricted during all pregnancy); (3) Pre-implantation (restricted during the pre-implantation period, from GD0 to GD5); (4) Embryonic (restricted during the embryonic period, from GD6 to GD15); (5) Fetal (restricted during the fetal period, from GD16 to GD21); and (6) Lactation (restricted during all the lactation period, from postnatal day 1 (PND1) to PND21). The day of vaginal

delivering was considered the PND0 and in the PND1 litters standardized to eight pups per dam.

Dams were feed with Control (protein 17%) or Low protein (protein 6%) chow, according to experimental design. The standard and restricted diets, whose compositions are described in Table 1, were prepared in the Experimental Laboratory of the Medical Scholl of Botucatu-UNESP. Diets were isocaloric and normosodic. After weaning pups were feed with commercial chow for rodents. Food and water were always available *ad libitum*, for both, dams and pups.

To assess the age of puberty beginning characterized by the prepucial separation (Parker, 2006), the pups were investigated daily from PND30.

Reproductive Parameters Assessment

Collection and Weighting of Organs

At PND55 (peri-puberty age, according to Marty *et al.*, 2003), one male pup per litter (n=7/group) was weighted, killed by decapitation and blood was sampled for subsequent hormone levels assessment. Right testis, epididymis and vas deferens, ventral prostate and seminal vesicle (without the coagulating gland and full of secretion) were removed and weighted. The left testis was collected, fixed and processed for histological analysis and Sertoli cell count.

At adulthood (PDN90), the same procedures were performed, except the Sertoli cell count. After weighted, the right testis (without the tunica albuginea) and epididymis were frozen for late sperm counts, and both vas deferens were collected for sperm morphology and motility evaluations.

Histopathological Analysis and Sertoli Cell Number

The left testis were removed and submerged in Alfac fixing solution (80% ethanol, formaldehyde and glacial acetic acid, 8.5, 1.0, 0.5, v/v) for 24 h. The pieces were embedded in paraffin wax and sectioned at 5µm. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), and observed qualitatively for general histological aspect, and one hundred cross sections of seminiferous tubules per animal were classified as normal or abnormal (quantitative examination). On PND55, nuclei of Sertoli cells were counted in 20 seminiferous tubules (3 nonconsecutive testis cross-sections) per rat (n=7/group) at stage VII of spermatogenesis (Leblond and Clermont, 1952). All the morphological analysis were performed under a light microscope in blind assay.

Hormone Assays

After decapitation, blood was collected from the ruptured cervical vessels in a tube and centrifuged at 2500rpm for 20 minutes at 4°C, for serum separation, which was frozen and preserved at -20°C until hormone assays for measurement of gonadotropins (Luteinizing Hormone-LH, and Follicle-Stimulating Hormone-FSH) and testosterone.

Serum LH and FSH were determined by Radioimmunoassay (RIA), using double antibody specific kits provided by the National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Baltimore, USA). Primary antibodies are anti-rat LH-S10 and FSH-S11, and the standard preparations were LH-RP3 and FSH-RP2. The second antibody was produced in sheep by the laboratory of Dr. C.R. Franci from Medical School of Ribeirão Preto-USP, using rabbit gamma-globulin as harmless. Both Hormones were iodinated with 125iodo from NEM (Perkin Elmer, USA). Testosterone levels were measured using the Testosterone kit (Diagnostic Systems Laboratories, USA). All samples were assayed in a single assay to avoid inter-assay errors.

Sperm Evaluations at PND90

Sperm Morphology

Left vas deferens was collected and internally washed using a syringe coupled to a needle containing 1mL of formol-saline solution. The content was storage in an Eppendorf tube and, soon after; it was made smears on slides, left to dry for 90 minutes, and then observed in phase contrast microscopy. 200 sperms per animal were analyzed, and morphological abnormalities were assorted into two categories: head and flagellum defects.

Sperm Motility

Sperms were carefully obtained from the right vas deferens in modified HTF medium (Human Tubal Fluid, Irvine Scientific®, Israel) preheated to 37°C to prevent cell death. An aliquot of 10µL was transferred to a Makler Chamber (Irvine Scientific®, Israel). 100 sperms per animal were examined under light microscopy, and classified as: Type A: mobile and progressive; Type B: mobile and not progressive and Type C: immobile.

Sperm Counts, Daily Sperm Production (DSP) in Testis and Transit Time in the Epididymis

The spermatids resistant to the process of testicular homogenization (stage 19 of spermiogenesis) and the sperm present in the caput/corpus and cauda epididymis were enumerated as described by Robb et al. (1978), with modifications by Fernandes et al. (2007):

The right testicles, descapsulated and previously weighed, were homogenized in 5 ml of 0.9% NaCl containing Triton X-100 at 0.5% and submitted to sonication for 30 s. After 10-fold dilution, 1 sample was transferred to a Neubauer chamber (4 fields per animal) and mature spermatids were counted. To calculate the daily sperm production (DSP), the concentration of spermatids per testis was divided by 6.1, which is the number of days in which mature spermatids are present in the seminiferous epithelium. Then, the DSP per gram was calculated in order to determine the efficiency of the process (Johnson *et al.*, 2000). Similarly, caput/corpus and cauda epididymidis portions were cut into small fragments with the aid of scissors and homogenized for sperm counting, as described for the testis. The time of transit through the caput/corpus and cauda epididymis was obtained by dividing the number of sperm present in each of these regions by the DSP.

Statistical analysis

Data were compared using One-Way ANOVA, followed by Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, or Kruskal-Wallis Test (nonparametric ANOVA), followed by Dunn's Multiple Comparisons Test, according to variables characteristics, and values were expressed as Mean $\pm$ Standard deviation or Median $\pm$ Interquartile deviation, respectively. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Puberty Age

There was a delay in the age of prepuce separation in the Gestation and Lactation groups, and an advance in the Pre-implantation group (Figure 1), but the differences were not statistically significant.

Reproductive Organs Weight (PND55 and PND90)

Body weight was significantly reduced in the Lactation group compared to the others in both ages (Tables 2 and 3). At PND55, testis, epididymis, vas deferens and prostate weight were also reduced in the Lactation group, compared to the others, but relative organ weights did not differ (Table 2).

At adulthood (90 days), testis weight was decreased in Lactation, compared to Pre-implantation, Embryonic and Fetal groups, but not from Control. Vas deferens relative weight

was increased in Lactation group compared to Pre-implantation, and empty seminal vesicles relative weight was also reduced in Lactation, compared to Gestation and Pre-implantation groups, but not to Control (Table 3).

Testicular Histopathology and Sertoli Cell Count

Histological analysis revealed no change in the testis structure in the offspring of restricted groups. In the same way, the proportions of normal and abnormal tubules were similar among groups (data not shown).

The Sertoli cell number per seminiferous tubule was reduced in the Gestation and Lactation groups, although differences were not statistically significant (Table 4).

Hormone Levels

Serum testosterone levels did not differ among groups in any age ($p > 0.05$), but on the PND90 it was observed a little increase in the restricted groups (data not shown). At 55 days FSH levels were higher in the Lactation (16.61 ± 1.59 ng/mL) group compared to Embryonic (10.27 ± 1.49 ng/mL) ($p < 0.05$), but not to Control (113.81 ± 4.96 ng/mL) ($p > 0.05$). In adulthood LH levels did not differ from Control (0.71 ± 0.20 ng/mL) ($p > 0.05$), but it was lower in Gestation group (0.52 ± 0.17 ng/mL) compared to Pre-implantation (1.07 ± 0.45 ng/mL) ($p < 0.05$), and FSH serum levels were higher in Lactation (10.28 ± 2.97 ng/mL) compared to Control (6.68 ± 0.66 ng/mL) ($p < 0.05$).

Sperm Evaluations

Maternal protein restriction during gestation and lactation reduced testis sperm number and DSP, but not the DSP/g (Table 4). Other sperm features (morphology, motility, sperm count in the epididymis and sperm transit time through this organ) were not affected by the treatment (data not shown).

Discussion

Maternal protein restriction during lactation resulted in a decreased postnatal growth rate, represented by the reduced body weight of pups born to mothers restricted during this period and it corroborates previous reports that this is apparently the most critical period for overall development of offspring (Petry *et al.*, 1997). Other studies have also shown that

undernutrition during lactation in rats caused permanent growth retardation in the offspring characterized by a lower body weight, regardless of whether or not the dams were undernourished during pregnancy (Desai *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 2004; Bieswal *et al.*, 2006).

Puberty, which marks the beginning of fertility, is a hormone-dependent phenomenon influenced by endogenous and exogenous factors, among which nutrition is very important (Kennedy and Mitra, 1963, Glass and Swerdloff, 1980; Cameron, 1996). An external marker for puberty beginning in males is prepuccial separation. Although there was no significant change at the age of puberty, a trend was observed toward delay in the Lactation and Gestation groups and toward advance among Pre-implantation animals. Reports in the literature vary: Zambrano *et al.* (2005b) did not observe any difference in the age of prepuccial separation in pups whose mothers were protein restricted during pregnancy and/or lactation. But other studies reported that maternal food restriction *in utero* and/or lactation delayed prepuccial separation in rats (Engelbregt *et al.*, 2000; Chernoff *et al.*, 2009).

It has been considered that not only weight, but also an appropriate body composition, mainly with regard to the percentage of fat, is needed to trigger puberty in rats (Frisch *et al.*, 1977; Frisch, 1990); to this end, leptin, a fat-derived hormone, would be a signal linking adiposity and reproductive function by acting as a determinant of the time of puberty (Ahima *et al.*, 1997). There are many controversies about this (Foster and Nagatani, 1999) and according to Judd (1998) change in fat mass *per se* is not sufficient to provide a signal. Although most of these studies were focused on female reproductive development (Ahima *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1997), Engelbregt *et al.* (2001) concluded that puberty onset is not dependent on body fat or the leptin serum levels, either in females or in males.

The weights of male reproductive organs were reduced at PND55 in the Lactation group. But at PND 90, the Lactation animals differed only in the testis weight compared to Pre-implantation, Embryonic and Fetal groups, but not in relation to the Control. Empty seminal vesicle and vas deferens relative weights were also altered, but there was no difference between restricted and Control groups. Delayed testicular development in newborn lambs (Bielli *et al.*, 2002); and reduced testicular weight in rats due to maternal undernutrition during lactation (Teixeira *et al.*, 2007) or both pregnancy and lactation (Genovese *et al.*, 2010) had been reported. Zambrano *et al.* (2005b) verified that protein restriction during gestation and/or lactation also reduced testis weight at PNDs 25 and 70, and at PND270 only in the group restricted in both periods. These data partially agree with what we have observed showing a possible recovery in testis development, impaired by early protein restriction.

Leonhardt *et al.* (2003) reported that pups from dams undernourished during lactation only, presented gonadal development that was more extensively affected than the ones from mothers whose nutrition was restricted during both periods, or only in pregnancy, thereby corroborating our findings.

Histological analysis did not reveal any alteration in gonadal morphology, which is in agreement with previous studies (Bielli *et al.*, 2002; Genovese *et al.*, 2010). But the Sertoli cell number in the seminiferous tubules was reduced in the Gestation and Lactation groups at PND55, although not significantly. It is well established that in rats Sertoli cells do not proliferate after PND16 (Marty *et al.*, 2003), which is why this cell type was not counted again at adulthood. Bielli *et al.* (2002) observed that maternal undernutrition during the second half of pregnancy reduced the Sertoli cell number in the newborn lamb testis. Another study reported that nutritional deprivation *in utero* and during lactation also reduced the Sertoli cell number without altering the testis structure in rats (Genovese *et al.*, 2010).

Alterations in the development of gonads may affect their function while hormone levels are essential for initiation and maintenance of this function. Although in the present study only FSH levels at adulthood were significantly changed in the Lactation group compared to the Control, testosterone tended to be higher in the restricted groups at this age, a finding contrary to what other authors have been reporting (Zambrano *et al.*, 2005b).

In males FSH levels are controlled by inhibin, a hormone produced by Sertoli cells in the testes (Nett, 1993; Stanbenfeldt and Edquist, 1996). When the spermatogenesis rate is high the inhibin production is increased, resulting in a decreased FSH level (Stanbenfeldt and Edquist, 1996). The reduced number of Sertoli cells in the Lactation group probably resulted in a decreased inhibin secretion level, which is in accordance with the increased FSH levels in the animals of this group at adulthood, and may also be associated with a decrease in spermatogenesis.

Testicular sperm counts in the Gestation and Lactation groups showed diminishment in the total amount and DSP. Only the absolute numbers were affected, not the ones related to the weight of the organ (reproductive efficiency). So, the reduced DSP in these groups could result from a lower testis weight. However, in the Lactation group the higher FSH levels and reduced Sertoli cell number are in agreement with compromised gametogenesis.

Although morphologically ready when produced in the testes, spermatozoa are not yet mobile. It is during the transit through the epididymis that the sperm undergo the maturation process, during which they acquire motility and become capable of fertilizing the oocyte (Orgebin-Crist, 1969; Gatti *et al.*, 2004). Alterations in transit time through the epididymis

may compromise the maturation of sperm and, consequently, their fertilizing ability. In the present study, the maternal protein restriction did not influence the sperm transit time through the epididymis or the sperm reserves in the organ. Other sperm parameters such as morphology and motility were also not affected. A lack of alterations in semen quality was also reported in adult lambs born to mothers undernourished during pregnancy (Rae *et al.*, 2002).

In summary, maternal protein restriction interfered in development and also in the reproductive function of male pups. The moment in early development at which dams are submitted to the nutritional challenge resulted in different responses, and lactation seems to be the most critical period for both development and reproductive function.

Acknowledgments

This study was financial supported by CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel), as a Masters scholarship. The authors thank the technicians from the Experimental Laboratory of the School of Medicine of Botucatu - UNESP, Brazil, for helping with the production of animal diets.

References

- Ahima, R. S., Dushay, J., Flier, S. N., Prabakaran, D., and Flier, J. S. (1997). Leptin Accelerates the Onset of Puberty in Normal Female Mice. *J. Clin. Invest.* **99**, 391–395.
- Barker, D. J. P. (1995). Fetal origins of coronary heart diseases. *BMJ.* **311**, 171-174.
- Bielli, A., Pérez, R., Pedrana, G., Milton, J. T., Lopez, A., Blackberry, M. A., Duncombe, G., Rodriguez-Martinez, H., and Martin, G. B. (2002). Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod. Fertil. Dev.* **14**, 333-337.
- Bieswal, F., Ahn, M. T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W. D., and Remacle, C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* **14**, 1330-1343.
- Cameron, J. L. (1996). Nutritional determinants of puberty. *Nutr. Rev.* **54**, S17-S22.
- Chernoff, N., Gage, M. I., Stoker, T. E., Cooper, R. L., Gilbert, M. E., and Rogers, E. H.

- (2009). Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: Age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. *Reprod. Toxicol.* **28**, 489-494.
- Cheung, C.C., Thornton, J.E., Kuijper, J.L., Weigle, D.S., Clifton D.K., and Steiner, R.A. (1997). Leptin Is a Metabolic Gate for the Onset of Puberty in the Female Rat. *Endocrinology* **138**, 855-858.
- Cleal, J. K., Poore, K. R., Newman, J. P., Noakes, D. E., Hanson, M. A., and Green, L. R. (2007). The effect of maternal undernutrition in early gestation on gestation length and fetal and postnatal growth in sheep. *Pediatr. Res.* **62**, 422-427.
- Desai, M., Crowter, N. J., Lucas, A., and Hales, C. N. (1996). Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br. J. Nutr.* **76**, 591-603.
- Edwards, L. J., Coulter, C. I., Symonds, M. E., and McMillen, I. C. (2001). Pre-natal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **28**, 938-941.
- Engelbregt, M. J. T., Houduk, M. E. C. A. M., Popp-Sniders, C., and Delamarre-van de Wall, H. A. (2000). The effects of intrauterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatr. Res.* **48**, 803-807.
- Engelbregt, M. J. T., Weissenbruch, M. M., Popp-Snijders, C., Lips, P., and Delemarre-van de Waal, H. A. (2001). Body mass index, body composition, and Leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. *Pediatr. Res.* **50**, 474-8.
- Faria, T. S., Ramos, C. F., and Sampaio, F. J. B. (2004). Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 123-7
- Fernandes, G. S., Arena, A. C., Fernandez, C. D, Mercadante, A., Barbisan, L.F., and Kempinas, W. G. (2007). Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.*, **23**, 106-112.
- Foster, D.L., and Nagatani, S. (1999). Physiological Perspectives on Leptin as a Regulator of Reproduction: Role in Timing Puberty. *Biol. Reprod.* **60**, 205-215.
- Frisch, R. E., Hegsted, D.M., and Yoshinaga, K. (1977). Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: body water, protein, and fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 379-383.
- Frisch R. E. (1990). Body fat, menarche, fitness and fertility. In 'Adipose Tissue and Reproduction'. (Eds R. E. Frisch) pp. 1-26. (Basel, Switzerland: S. Karger).

- Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecruyd, H., Métayer, S., Thimon, V., and Dacheux, J. L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* **82-83**, 321-339.
- Genovese, P., Núñez, M. E., Pombo, C., and BIELLI, A. (2010). Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reprod. Domest. Anim.* **45**, 233-236.
- Glass, A. R., and Swerdloff, R. S. (1980). Nutritional influences on sexual maturation in the rat. *Fed. Proc.* **39**, 2360-2364.
- Guzmán, C., Cabrera, R., Cárdenas, M., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., and Zambrano, E. (2006). Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J. Physiol.* **572**, 97-108.
- Johnson, L., Varner, D. D., Roberts, M. E., Smith, T. L., Keillor, G. E., and Scrutchfield, W. L. (2000). Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.*, **60-61**, 471-480.
- Judd, S. J. (1998). Disturbance of the reproductive axis induced by negative energy balance. *Reprod. Fertil. Dev.* **10**, 65-72.
- Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M. H., and Matthews, S. G. (2006). Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J. Physiol.* **572**, 31-44.
- Kennedy, G. C., and Mitra, J. (1963). Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.* **166**, 408-18.
- Langley-Evans, S. C., Gardner, D. S., and Welhan, S. J. (1998). Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition* **14**, 39-47.
- Lau, C., and Rogers, J. M. (2004). Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res.* **72**, 300-312.
- Leblond, C. P, and Clermont, Y. (1952). Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the “periodic acid-fuchsin sulfurous acid” technique. *Am. J. Anat.* **90**, 167-215.
- Léonhardt, M., Lesage, J., Croix, D., Dutriez-Casteloot, I., Beauvillain, J. C., and Dupouy, J. P. (2003). Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin concentration in rat pup at birth and weaning and on time of puberty. *Biol. Reprod.* **68**, 390-400.
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *CIBA Found. Symp.* **158**, 38-50.

- Marty, M. S., Chapin, R. E., Parks, L. G., and Thorsrud, B. A. (2003). Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res. B.* **68**, 125-136.
- Myatt, L. (2006) Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol.* **572**, 25–30.
- Nett, T.M. (2001). Reproductive peptide and protein hormones. In ‘Equine Endocrine Reviews’. (Eds A. O. McKinnon, and J. L. Voss,) v.**22**, pp.289-318.
- Omran A. R. (1971). The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. *Millbank Memorial Fund. Q.* **49**, 509–38.
- Orgebin-Crist, M. C. (1969). Studies on the function of the epididymis. *Biol. Reprod.* **1**, 155-175.
- Parker, K.L., and Shimmer, B.P. (2006). Embryology and genetic of the mammalian gonads and ducts. In: ‘Knobil and Neill-s Physiology of Reproduction’ (Eds J. D. Neill.) pp. 313-336 (Elsevier: St Louis).
- Petry, C. J., Desai, M., Ozanne, S. E., and Hales, C. N. (1997). Early and late nutritional windows for diabetes susceptibility. *Proc.Nutr. Soc.* **56**, 233-242.
- Rae, M. T., Kyle, C. E., Miller, D. W., Hammond, A. J., Brooks, A. N., and Rhind, S. M. (2002). The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim. Reprod. Sci.* **15**, 63-71.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C. (1993). AIN-93Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 939-1951.
- Robb, G. W., Amman, R. P., and Killian, G. J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* **54**, 103-107.
- Stabenfeldt, G.H. and Edqvist, L. (1996). Processos reprodutivos do macho. In: ‘Dukes-Fisiologia dos animais domésticos’ (Eds M. J. Swenson, and W. O. Reece), v.35, pp.603-614 (Guanabara Koogan: Rio de Janeiro).
- Teixeira, C. V., Silandre, D., Santos, A. M. S., Delalande, C., Sampaio, F. J. B., Carreau, S., Ramos, C. F. (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J. Endocrinol.* **192**, 301-311.
- Yusuf, S., Reddy, S., Ôunpuu, S., and Anand, S. (2001). Global burden of vardiocascular diseases: Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* **104**, 2746-53.
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P. M, Bautista, C. J., Déas, M., Guillém, L., Rodríguez-González, G. L., Guzmán, C., Larrea, F., and Nathanielsz, P.W. (2005a). Sex

differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* **566**, 225–236.

Zambrano, E., Rodríguez-González, G. L., Guzmán, C., García-Becerra, R., Boeck, L., and Díaz, L. (2005b). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol.* **563**, 275-284.

Tables

Table 1 – Diets nutritional composition (g/Kg)

Ingredient	Control * (17% protein)	Low protein (6% protein)
Corn starch	397	480
Casein (84%)	202	71.5
Dextrin (90-94%)	130.5	159
Sucrose	100	121
Soybean oil	70	70
Fiber	50	50
Mineral mixture **	35	35
Vitamin mixture **	10	10
L-cystine	3	1
Choline bitartrate	2.5	2.5

*Diet for growth, pregnancy and lactation stages in rodents-AIN-93G (Reeves, 1993).

**According to AIN-93G.

Table 2 – Body weight (g), absolute (g) and relative (g/100g of body weight) reproductive organs weight at PND55

	Control (n=7)	Gestation (n=7)	Pre-implantation (n=7)	Embryonic (n=7)	Fetal (n=7)	Lactation (n=7)
Body weight	285.27 ± 9.29 a ^{§§}	274.23 ± 33.92 a	300.3 ± 19.78 a	298.86 ± 17.42 a	290.67 ± 25.75 a	208.09 ± 19.29 b
Testis	1.31 ± 0.08 a	1.26 ± 0.12 a	1.31 ± 0.12 a	1.27 ± 0.09 a	1.30 ± 0.10 a	0.96 ± 0.07 b
Testis RW**	0.46 ± 0.028 a	0.48 ± 0.053 a	0.43 ± 0.033 a	0.42 ± 0.024 a	0.44 ± 0.058 a	0.45 ± 0.044 a
Epididymis	0.23 ± 0.02 a	0.23 ± 0.03 a	0.24 ± 0.04 a	0.23 ± 0.02 a	0.22 ± 0.02 a	0.15 ± 0.01 b
Epididymis RW	0.08 ± 0.009 a	0.08 ± 0.007 a	0.08 ± 0.012 a	0.08 ± 0.006 a	0.08 ± 0.017 a	0.07 ± 0.006 a
Vas deferens	0.06 ± 0.006 a	0.06 ± 0.008 a	0.06 ± 0.006 a	0.06 ± 0.011 a	0.06 ± 0.007 a	0.04 ± 0.009 b
Vas deferens RW	0.02 ± 0.002 a	0.02 ± 0.003 a	0.02 ± 0.003 a	0.02 ± 0.005 a	0.02 ± 0.004 a	0.02 ± 0.003 a
Prostate	0.22 ± 0.03 a	0.20 ± 0.03 a	0.22 ± 0.02 a	0.25 ± 0.05 a	0.22 ± 0.03 a	0.15 ± 0.02 b
Prostate RW	0.08 ± 0.019 a	0.07 ± 0.021 a	0.08 ± 0.010 a	0.09 ± 0.019 a	0.08 ± 0.026 a	0.07 ± 0.013 a
Full seminal vesicle	0.52 ± 0.07 ab	0.47 ± 0.11 ab	0.54 ± 0.11 a	0.53 ± 0.12 a	0.51 ± 0.06 ab	0.35 ± 0.15 b
Full seminal vesicle RW	0.18 ± 0.020 a	0.17 ± 0.058 a	0.20 ± 0.064 a	0.18 ± 0.067 a	0.18 ± 0.044 a	0.14 ± 0.120 a
Empty seminal vesicle	0.34 ± 0.04 a	0.25 ± 0.04 a	0.31 ± 0.07 a	0.31 ± 0.06 a	0.30 ± 0.06 a	0.24 ± 0.09 a
Empty seminal vesicle RW	0.11 ± 0.019 a	0.09 ± 0.018 a	0.11 ± 0.040 a	0.10 ± 0.030 a	0.10 ± 0.023 a	0.09 ± 0.061 a

*Values expressed as Mean ± Standard deviation (One-way ANOVA).

**RW = Relative weight. Values expressed as Median ± Interquartile deviation (Kruskal-Wallis Test).

§Different letters in the line indicates statistical significant differences (p<0.05).

Table 3 — Body weight (g), absolute (g) and relative (g/100g of body weight) reproductive organs weight at PND90

	Control (n=7)	Gestation (n=7)	Pre-implantation (n=7)	Embryonic (n=7)	Fetal (n=7)	Lactation (n=7)
Body weight	405.8 ± 37.7 a [§]	393.9 ± 29.9 a	435.2 ± 23.9 a	434.6 ± 3.9 a	429.2 ± 37.8 a	332.1 ± 48.1 b
Testis	1.57 ± 0.10 ab	1.52 ± 0.18 ab	1.65 ± 0.09 b	1.62 ± 0.05 b	1.62 ± 0.16 b	1.39 ± 0.13 a
Testis RW**	0.40 ± 0.055 a [§]	0.39 ± 0.037 a	0.38 ± 0.044 a	0.38 ± 0.014 a	0.39 ± 0.055 a	0.41 ± 0.034 a
Epididymis	0.56 ± 0.04 a	0.54 ± 0.04 a	0.57 ± 0.05 a	0.56 ± 0.04 a	0.56 ± 0.03 a	0.50 ± 0.07 a
Epididymis RW	0.14 ± 0.015 a	0.14 ± 0.009 a	0.13 ± 0.010 a	0.13 ± 0.008 a	0.13 ± 0.014 a	0.15 ± 0.015 a
Vas deferens	0.11 ± 0.01 a	0.11 ± 0.01 a	0.11 ± 0.01 a	0.11 ± 0.02 a	0.11 ± 0.01 a	0.11 ± 0.02 a
Vas deferens RW	0.027 ± 0.005 ab	0.027 ± 0.003 ab	0.025 ± 0.005 a	0.025 ± 0.005 ab	0.025 ± 0.003 ab	0.034 ± 0.009 b
Prostate	0.37 ± 0.09 a	0.38 ± 0.04 a	0.43 ± 0.11 a	0.38 ± 0.09 a	0.51 ± 0.09 a	0.41 ± 0.10 a
Prostate RW	0.10 ± 0.041 a	0.09 ± 0.055 a	0.10 ± 0.033 a	0.09 ± 0.023 a	0.11 ± 0.012 a	0.12 ± 0.032 a
Full seminal vesicle	1.07 ± 0.14 a	1.08 ± 0.16 a	1.26 ± 0.16 a	1.20 ± 0.18 a	1.20 ± 0.19 a	1.13 ± 0.24 a
Full seminal vesicle RW	0.26 ± 0.037 a	0.28 ± 0.062 a	0.28 ± 0.046 a	0.25 ± 0.070 a	0.29 ± 0.036 a	0.32 ± 0.066 a
Empty seminal vesicle	0.45 ± 0.09 a	0.40 ± 0.06 a	0.42 ± 0.05 a	0.49 ± 0.05 a	0.51 ± 0.08 a	0.45 ± 0.07 a
Empty seminal vesicle RW	0.11 ± 0.022 ab	0.10 ± 0.014 a	0.09 ± 0.023 a	0.11 ± 0.013 ab	0.12 ± 0.012 ab	0.13 ± 0.017 b

*Values expressed as Mean ± Standard deviation (One-way ANOVA).

**RW = Relative weight. Values expressed as Median ± Interquartile deviation (Kruskal-Wallis Test).

§Different letters in the line indicates statistical significant differences (p<0.05).

Table 4 – Sertoli cell count on PND55 and sperm counts ($\times 10^6$) in the testis on PND90

	Control (n=7)	Gestation (n=7)	Pre-implantation (n=7)	Embryonic (n=7)	Fetal (n=7)	Lactation (n=7)
Sertoli cell count	13.79 $\pm$ 1.03 a [§]	12.86 $\pm$ 1.73 a	13.75 $\pm$ 1.79 a	13.41 $\pm$ 1.30 a	13.31 $\pm$ 1.40 a	12.71 $\pm$ 2.03 a
Spermatids / testis	202.95 $\pm$ 17.30 a	160.29 $\pm$ 27.52 b	178.31 $\pm$ 26.45 ab	184.94 $\pm$ 18.11 ab	184.41 $\pm$ 27.29 ab	152.14 $\pm$ 10.65 b
DSP	33.27 $\pm$ 2.84 a	26.28 $\pm$ 4.51 b	29.23 $\pm$ 4.33 ab	30.32 $\pm$ 2.97 ab	30.23 $\pm$ 4.47 ab	24.94 $\pm$ 1.75 b
DSP / gram of testis	25.63 $\pm$ 3.43 a	21.73 $\pm$ 3.96 a	21.20 $\pm$ 2.68 a	23.86 $\pm$ 2.53 a	24.21 $\pm$ 3.41 a	22.64 $\pm$ 3.09 a

*Values expressed as Mean $\pm$ Standard deviation (One-Way ANOVA).

[§]Different letters in the line indicates statistical significant differences ($p < 0.05$).

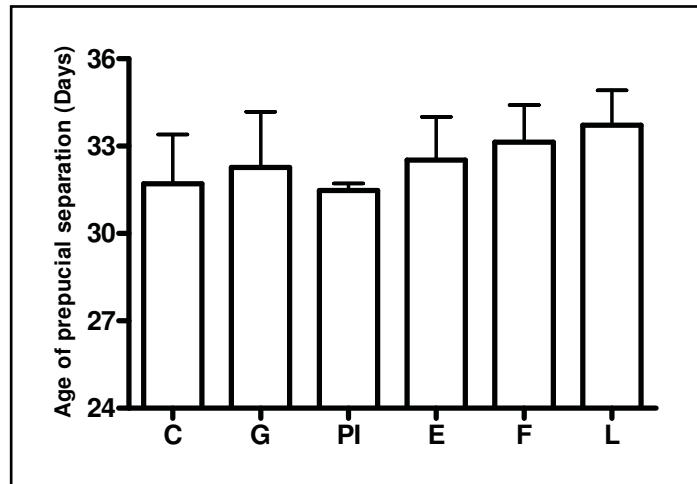
DSP = Daily sperm production.

Figure Captions

Figure 1 – Age of prepucial separation for male pups from mother of the different experimental groups. Values expressed as Mean $\pm$ Standard deviation (One-way ANOVA). C = Control, G = Gestation, PI = Pre-implantation, E = Embryonic, F = Fetal, L = Lactation.

Figures

Figure 1



V Conclusões



V CONCLUSÕES

A restrição proteica alterou o comportamento alimentar das matrizes, de forma que a ingestão média diária aumentou nos períodos correspondentes à restrição durante a prenhez, enquanto na lactação, diminuiu. O desenvolvimento intrauterino e pós-natal dos filhotes diferiu conforme o momento da prenhez em que a restrição proteica materna ocorreu. Embora o peso fetal tenha sido significativamente menor no grupo Gestação, em comparação ao Controle, a diferença deixou de existir durante o desenvolvimento pós-natal. Por outro lado, a redução do peso dos filhotes cujas mães foram submetidas à restrição proteica durante a lactação permaneceu até a idade adulta.

Os efeitos da restrição proteica materna sobre a função reprodutiva da prole foram também dependentes do momento em que ela ocorreu. A idade da instalação da puberdade em ambos os sexos tendeu a ser adiantada no grupo Pré-implantação e atrasada nos grupos Gestação e Lactação, com significância estatística apenas na prole feminina do grupo Lactação, na qual houve também redução do peso ovariano aos 55 dias, persistente na idade adulta. Na prole masculina o peso dos órgãos reprodutivos (testículo, epidídimo, ducto deferente e próstata) foi reduzido no grupo Lactação no DPN55, mas na idade adulta essa redução já não foi mais significativa. Os níveis de testosterona não diferiram, mas a concentração sérica de gonadotrofinas foi alterada, sendo os níveis de FSH do grupo Lactação aumentados no DPN90, quando houve também redução na contagem total e na produção diária de espermatozoides nos grupos Gestação e Lactação, sem alterar a eficiência da espermatogênese. Em suma, o momento do desenvolvimento inicial em que a restrição proteica materna ocorre influencia de diferentes maneiras o desenvolvimento e a função reprodutiva da progênie e a lactação foi o período mais crítico.

VI Referências Bibliográficas
da Introdução

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- Andrade, A.; Bosi, M. L. M. Mídia e subjetividade: impacto no comportamento alimentar feminino. *Revista de Nutrição*, v.16, pp.117-125, 2003.
- Armitage, J. A.; Taylor, P. D.; Poston, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *The Journal of Physiology*, v.565(1), pp.3-8, 2005.
- Ballen, M. L. O.; Moretto, V. L.; Santos, M. P.; Gonçalves, T. S. S.; Kawashita, N. H.; Stoppiglia, L. F.; Martins, M. S. F.; Gomes-da-Silva, M. H. G. Restrição proteica na prenhez – efeitos relacionados ao metabolismo materno. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.53(1), pp.87-94, 2009.
- Barker, D. J. P. *Fetal and infant origins of adult disease*. Londres: BMJ Publishing, 1992.
- Barker, D. J. P. Fetal origins of coronary heart diseases. *British Medical Journal*, v.311, pp.171-174, 1995.
- Barker, D. J. P. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *British Medical Bulletin*, v.53, pp.96-108, 1997.
- Bauer, M. K.; Harding, J. E.; Basset, N. S.; Breier, B. H.; Oliver, M. H.; Gallaher, B. H.; Evans, P. C.; Woodal, S. M.; Gluckman, P. D. Fetal growth and placental function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.140, pp.115-120, 1998.
- Bertram, C.; Khan, O.; Ohri, S.; Phillips D. I.; Matthews, S. G.; Hanson, M. A. Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal function. *The Journal of Physiology*, v.586(8), pp.2217–2229, 2008.
- Bielli, A.; Pérez, R.; Pedrana, G.; Milton, J. T.; Lopez, A.; Blackberry, M. A.; Duncombe, G.; Rodriguez-Martinez, H.; Martin, G. B. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, Fertility and Development*, v.14(5-6), pp.333-337, 2002.
- Blair, H. T.; Jenkinson, C. M. C.; Peterson, S. W.; Kenyon, P. R.; Van Der Linden, D. S.; Davenport, L. C.; Mackenzie, D. D. S.; Morris, S. T.; Firth, E. C. Dam and granddam feeding during pregnancy in sheep affects milk supply in offspring and reproductive performance in grand-offspring. *Journal of Animal Science*, v.88, pp.E40-E50, 2001.

- Brasel, J. A.; Winick, M. Maternal nutrition and prenatal growth – Experimental studies of effects of maternal undernutrition on fetal and placental growth. *Archives of Disease in Childhood*, v.47, pp.479-485, 1972.
- Burdge, G. C.; Slater-Jefferies, J.; Torrens, C.; Phillips, E. S.; Hanson, M. A.; Lillicrop, K. A. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *British Journal of Nutrition*, v.97, pp.435-439, 2007.
- Burke, B. S.; Stevenson, S. S.; Worcester, J.; Stuart, H. C. Nutrition studies during pregnancy. V. Relation of maternal nutrition to condition of infant at birth: study of siblings. *The Journal of Nutrition*, v.38(4), pp.453-467, 1949.
- Chernoff, N.; Gage, M. I.; Stoker, T. E.; Cooper, R. L.; Gilbert, M. E.; Rogers, E. H. Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: Age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. *Reproductive Toxicology*, v.28(4), pp.489-494, 2009.
- Chuang, J. C.; Jones, P. A. Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research*, v.61(5), pp.24R-29R, 2007.
- DelaHaye, F.; Breton, C.; Risold, P. Y.; Enache, M.; Dutriez-Casteloot, I.; Laborie, C.; Lesage, J.; Vieau, D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology*, v.149, pp.470-475, 2008.
- Desai, M.; Crowter, N. J.; Lucas, A.; Hales, C. N. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *British Journal of Nutrition*, v.76, pp.591-603, 1996.
- Drake, A. J.; Walker, B. R. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology*, v.180, pp.1–16, 2004.
- Edwards, L. J.; Coulter, C. I.; Symonds, M. E.; McMillen, I. C. Pre-natal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.28, pp.938-941, 2001.
- Engelbregt, M. J. T.; Houduk, M. E. C. A. M.; Popp-Sniders, C.; Delamarre-Van De Wall, H. A. The effects of intrauterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research*, v.48, pp.803-807, 2000.
- Escoda, M. S. Q. Para a crítica da transição nutricional. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.7, pp.219-226, 2002.

- Friggens, N. C.; Hay, D. E. F.; Oldhan, J. D. Interactions between major nutrients in the diet and the lactational performance of rats. *British Journal of Nutrition*, v.69, pp.59-71, 1992.
- Genovese, P.; Núñez, M. E.; Pombo, C.; Bielli, A. Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45(2), pp.233-236, 2010.
- Gluckman, P. D.; Hanson, M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v.15(4), pp.183-187, 2004.
- Gluckman, P. D.; Hanson, M. A. The developmental origins of health and disease: an overview. In: *Developmental Origins of Health and Disease*, ed. Gluckman, P.; Hanson, M. Cambridge University Press, pp.1-5, 2006.
- Guzmán, C.; Cabrera, R.; Cárdenas, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W.; Zambrano, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *The Journal of Physiology*, v. 572(1), pp.97-108, 2006.
- Hales, C.N.; Barker, D.J.P. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v.35, pp.595-601, 1992.
- Hales, C.N.; Barker, D.J.P. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, v.60, pp.5-20, 2001.
- Hanson, M. A.; Gluckman, P. D. Developmental Origins of Health and Disease: New insights. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v.102, pp.90-93, 2008.
- Holemans, K.; Aerts, L.; Van Assche, F. A. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v.10, pp.392-399, 2003.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Pesquisa Nacional de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003: Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil, 2008. Disponível em <<http://www.ibge.br>>. Acesso em: 09 fev. 2009.
- Jaenisch R.; Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics Supplement*, v.33 pp.245-254, 2003.
- Janson, T.; Powell, T. L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical Science*, v.113, pp.1-13, 2007.

- Kappor, A.; Dunn, E.; Kostaki, A.; Andrews, M. H.; Matthews, S. G. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *The Journal of Physiology*, v.572(1), pp.31–44, 2006.
- Karlberg, J. Jalil, F.; Lam, B.; Yeung, C.Y.; Linear growth retardation in relation to the three phases of growth. In: Causes and mechanisms of linear growth retardation. Waterlow, J.C.; Schurch, B. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.48(1), pp.S24-S44, 1994.
- Kwong, W. Y.; Wild, A. E.; Roberts, P.; Willis, A. C.; Fleming, T. P. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, v.127, pp.4195-4202, 2000.
- Langley-Evans, S. C.; Gardner, D.S.; Welhan, S.J. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition*, v.14, pp.39-47, 1998.
- Langley-Evans, S. C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.60, pp.505-513, 2001.
- Lau, C.; Rogers, J.M. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Research*, v.72, pp.300-312, 2004.
- Lesage, J.; Blondeau, B.; Grino, M.; Bréant, B.; Dupouy, J. P. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*, v.142, pp. 1692-1702, 2001.
- Lucas, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium*, v.158, pp.38-50, 1991.
- Lucas, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *The Journal of Nutrition*, v.128 (2), pp.401S-406S, 1998.
- Lumey, L.H. Reproductive outcomes in women prenatally exposed to undernutrition: a review of findings from the Dutch famine birth cohort. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.57, pp.129-135, 1998.
- Martin-Gronert, M. S.; Ozanne, S. E. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Biochemical Society Transactions*, v.34, pp. 779-782, 2006.
- McCrabb, G. J.; Egan, A. R.; Hosking, B. J. Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep. Placental size and its relationship to calcium transfer during late pregnancy. *British Journal of Nutrition*, v.65, pp.157-168, 1991.
- Mota, E. C.; Santos, A.M.; Toste, F. P.; Sampaio, F. J. B.; Ramos, C. F. R. Effects of malnutrition in the testis. *Brazilian Journal of Urology*, v.27, pp.500-506, 2001.

- Muller, H. R.; Prado, K. B. Epigenética: um novo campo da genética. *RUBS - Revista Unicenp de Biologia & Saúde*, v.1(3), pp.61-69, 2008.
- Myatt, L. Placental adaptive responses and fetal programming. *The Journal of Physiology*, v.572(1), pp.25–30, 2006.
- Nelson, M. M.; Evans, H. M. Relation of dietary protein levels to reproduction in the rat. *The Journal of Nutrition*, v.51(1), pp.71-84, 1953.
- Organização Mundial da Saúde – Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995.
- Osgerby, J. C.; Wathes, D. C.; Howard, D.; Gadd, T. S. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *Journal of Endocrinology*, v.173, pp.131-141, 2002.
- Painter, R. C.; Osmond, C.; Gluckman, P.; Hanson, M.; Phillips, D. I. W.; Roseboom, T. J. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v.115(10), pp.1243-1249, 2008.
- Petry, C. J.; Desai, M.; Ozanne, S. E.; Hales, C. N. Early and late nutritional windows for diabetes susceptibility. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.56, pp.233-242, 1997.
- Pine, A. P.; Jessop, N. S.; Oldham, J. D. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. *British Journal of Nutrition*, v.71, p.13-27, 1994.
- Rae, M. T.; Kyle, C. E.; Miller, D. W.; Hammond, A. J.; Brooks, A. N.; Rhind, S. M. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Animal Reproduction Science*, v.15, pp.63-71, 2002.
- Rees, W. D.; Hay, S. M.; Buchan, V.; Antipatis, C.; Palmer, R. M. The effects of maternal protein restriction on the rat fetus and its amino acid supply. *British Journal of Nutrition*, v.81, pp.243-250, 1999.
- Rhind, S. M.; Rae, M. T.; Brooks, A. N. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction*, v.122, pp.205–214, 2001.
- Rosso, P. Maternal-fetal exchange during protein malnutrition in the rat. Placental transfer of α -amino isobutyric acid. *The Journal of Nutrition*, v.107, pp.2002-2005, 1977.
- Sampson, D. A.; Hunsaker, H. A.; Jansen, G. R. Dietary protein quality, protein quantity and food intake: effects on lactation and on protein synthesis and tissue composition in mammary tissue and liver rats. *The Journal of Nutrition*, v.116, pp.365-375, 1986.
- Silveira, P. P.; Portella, A. K.; Goldani, M. Z.; Barbieri, M. A. Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Jornal de Pediatria*, v.83(6), pp.494-504, 2007.

- Stern, M. P.; Birtley, M.; Duggirala, R.; Bradshaw, B. Birth weight and the Metabolic Syndrome: thrifty phenotype or thrifty genotype? *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v.16, pp.88-93, 2000.
- Stolte, D.; Hennington, E. A.; Bernardes, J. S. Sentidos da alimentação e da saúde: contribuições para a análise do Programa de Alimentação do Trabalhador. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22, pp.1915-1924, 2006.
- Teixeira, C. V.; Silandre, D.; Santos, A. M. S.; Delalande, C.; Sampaio, F. J. B.; Carreau, S.; Ramos, C. F. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *Journal of Endocrinology*, v.192, pp.301-311, 2007.
- Valente, F. L. S. Fome, desnutrição e cidadania: inclusão social e direitos humanos. *Saúde e Sociedade*, v.2, pp.51-60, 2003.
- Verkauskiene, R.; Beltrand, J.; Claris, O.; Chevenne, D.; Deghmound, S.; Dorgeret, S.; Alison, M.; Gaucherand, P.; Sibony, O.; Lévy-Marchal, C. Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age. *European Journal of Endocrinology*, v.157, pp.605-612, 2006.
- Vonnahme, K. A.; Hess, B. W.; Hansen, T. R.; McCormick, R. J.; Rule, D. C.; Moss, G. E.; Murdoch, W. J.; Nijland, M. J.; Skinner, D. C.; Nathanielsz, P. W. Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biology of Reproduction*, v.69, pp.133-140, 2003.
- Wells, J.C.K. The thrifty phenotype hypothesis: thrifty offspring or thrifty mother? *Journal of Theoretical Biology*, v.221, pp.143-161, 2003.
- Wolansky, N.; Genetic and ecological factors in human growth. *Human Biology*, v.42, pp.349, 1970.
- Woodal, S. M.; Johnston, B. M.; Breier, B. H.; Gluckman, P. D. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatric Research*, v.40, pp.438-443, 1996.
- Zambrano, E.; Martínez-Samayoa, P. M.; Bautista, C. J.; Déas, M.; Guillém, L.; Rodríguez-González, G. L.; Guzmán, C.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *The Journal of Physiology*, v.566(1), pp.225–236, 2005a.

- Zambrano, E.; Rodríguez-González, G. L.; Guzmán, C.; García-Becerra, R.; Boeck, L.; Díaz, L. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *The Journal of Physiology*, v.563, pp.275-284, 2005b.
- Zambrano, E.; Bautista, C. J.; Deás, M.; Martínez-Samayoa, P. M.; González-Zamorano, M.; Ledesma, H.; Morales, J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P. W. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *The Journal of Physiology*. v.571, pp.221-230, 2006.
- Zeman, F. J. Effect on the young rat of maternal protein restriction. *The Journal of Nutrition*, v. 93, pp.167-173, 1967a.
- Zeman, F. J. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young rats. *The Journal of Nutrition*, v. 94, pp.111-116, 1967b.

VII Apêndices

ANEXO I

Figuras e Tabelas

DADOS DAS MATRIZES

Consumo Materno de Água e Ração

Durante a Gestação

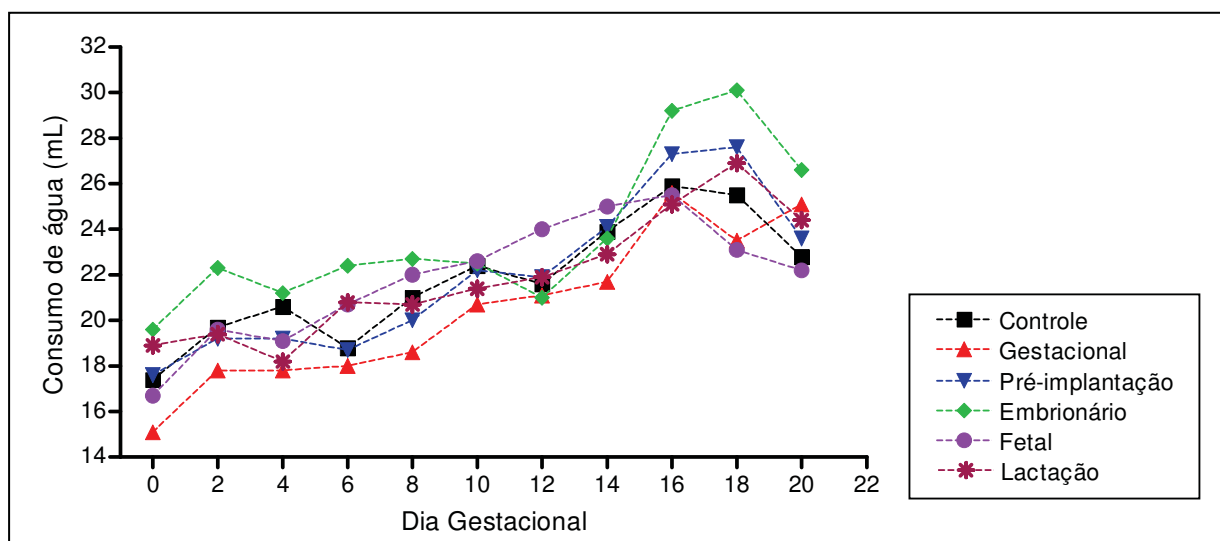


Figura 1 – Consumo materno de água durante a gestação nos diferentes grupos experimentais. Os valores de Média e Desvios padrão estão na Tabela 1.

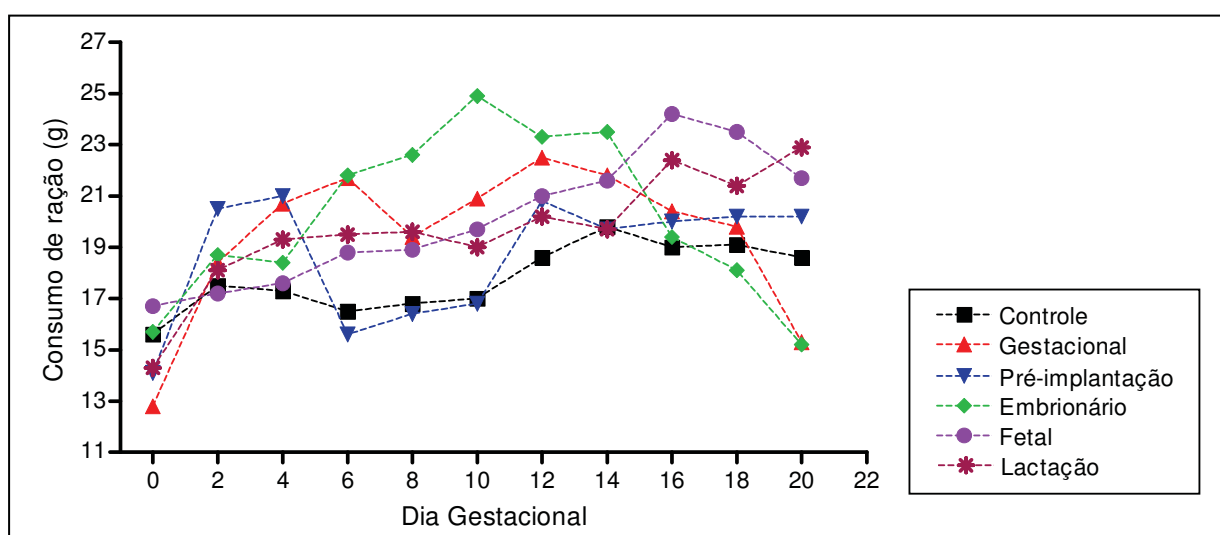


Figura 1 – Consumo materno de ração durante a gestação nos diferentes grupos experimentais. Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 2.

Tabela 1 – Consumo médio diário de água (mL) pelas matrizes durante a gestação

Dia Gestacional	Controle (n=13)	Gestacional (n=12)	Pré-implantação (n=12)	Embrionário (n=12)	Fetal (n=13)	Lactação (n=7)
0	17,4 ± 6,1 a*§	15,1 ± 5,3 a	17,6 ± 5,5 a	19,6 ± 6,5 a	16,7 ± 5,1 a	18,9 ± 6,3 a
2	19,7 ± 5,6 a	17,8 ± 4,0 a	19,2 ± 6,5 a	22,3 ± 7,0 a	19,6 ± 3,6 a	19,4 ± 2,7 a
4	20,6 ± 5,4 a	17,8 ± 2,8 a	19,2 ± 4,8 a	21,2 ± 4,7 a	19,1 ± 3,2 a	18,2 ± 4,3 a
6	18,8 ± 5,7 a	18,0 ± 3,5 a	18,7 ± 6,8 a	22,4 ± 7,2 a	20,7 ± 3,4 a	20,8 ± 2,7 a
8	21,0 ± 5,7 a	18,6 ± 3,3 a	20,0 ± 6,1 a	22,7 ± 6,3 a	22,0 ± 3,4 a	20,7 ± 3,7 a
10	22,4 ± 5,3 a	20,7 ± 4,1 a	22,2 ± 5,3 a	22,5 ± 7,0 a	22,6 ± 4,7 a	21,4 ± 2,2 a
12	21,6 ± 2,7 a	21,1 ± 3,9 a	21,9 ± 4,3 a	21,0 ± 3,7 a	24,0 ± 4,4 a	21,9 ± 4,2 a
14	23,9 ± 6,1 a	21,7 ± 3,8 a	24,1 ± 5,0 a	23,6 ± 7,3 a	25,0 ± 4,6 a	22,9 ± 3,8 a
16	25,9 ± 7,0 a	25,6 ± 5,9 a	27,3 ± 4,7 a	29,2 ± 4,0 a	25,5 ± 4,9 a	25,1 ± 3,6 a
18	25,5 ± 4,5 a	23,5 ± 7,4 a	27,6 ± 5,6 a	30,1 ± 8,6 a	23,1 ± 6,8 a	26,9 ± 3,3 a
20	22,8 ± 8,6 a	25,1 ± 3,1 a	23,6 ± 5,8 a	26,6 ± 7,2 a	22,2 ± 5,9 a	24,4 ± 6,8 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Tabela 2 – Consumo médio diário de ração (g) pelas matrizes durante a gestação

Dia Gestacional	Controle (n=13)	Gestacional (n=12)	Pré-implantação (n=12)	Embrionário (n=12)	Fetal (n=13)	Lactação (n=7)
0	15,6 ± 5,2 a [§]	12,8 ± 2,1 a	14,1 ± 1,6 a	15,7 ± 1,7 a	16,7 ± 3,7 a	14,3 ± 2,6 a
2	17,5 ± 2,9 a	18,4 ± 6,5 a	20,5 ± 6,7 a	18,7 ± 3,9 a	17,2 ± 3,1 a	18,1 ± 4,2 a
4	17,3 ± 3,6 a	20,7 ± 3,5 a	21,0 ± 6,2 a	18,4 ± 4,0 a	17,6 ± 2,5 a	19,3 ± 3,5 a
6	16,5 ± 4,0 a	21,7 ± 3,3 b	15,6 ± 4,7 a	21,8 ± 4,1 b	18,8 ± 3,1 ab	19,5 ± 6,0 ab
8	16,8 ± 2,7 a	19,4 ± 3,7 ab	16,4 ± 5,3 a	22,6 ± 4,8 b	18,9 ± 3,5 ab	19,6 ± 4,0 ab
10	17,0 ± 2,5 a	20,9 ± 2,6 ab	16,8 ± 5,0 a	24,9 ± 3,5 b	19,7 ± 3,8 a	19,0 ± 3,7 a
12	18,6 ± 1,9 a	22,5 ± 3,8 ab	20,8 ± 4,4 ab	23,3 ± 3,8 b	21,0 ± 2,7 ab	20,2 ± 3,4 ab
14	19,8 ± 1,8 a	21,8 ± 3,6 a	19,7 ± 3,2 a	23,5 ± 2,6 a	21,6 ± 4,2 a	19,7 ± 3,7 a
16	19,0 ± 2,4 a	20,4 ± 4,3 a	20,0 ± 4,8 a	19,4 ± 4,7 a	24,2 ± 5,0 b	22,4 ± 4,2 a
18	19,1 ± 2,5 a	19,8 ± 5,7 a	20,0 ± 4,6 a	18,1 ± 4,1 a	23,5 ± 4,6 a	21,4 ± 4,0 a
20	14,9 ± 3,3 a	14,2 ± 6,4 a	20,3 ± 5,3 a	14,9 ± 2,5 a	16,1 ± 7,3 a	16,9 ± 3,2 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Durante a Lactação

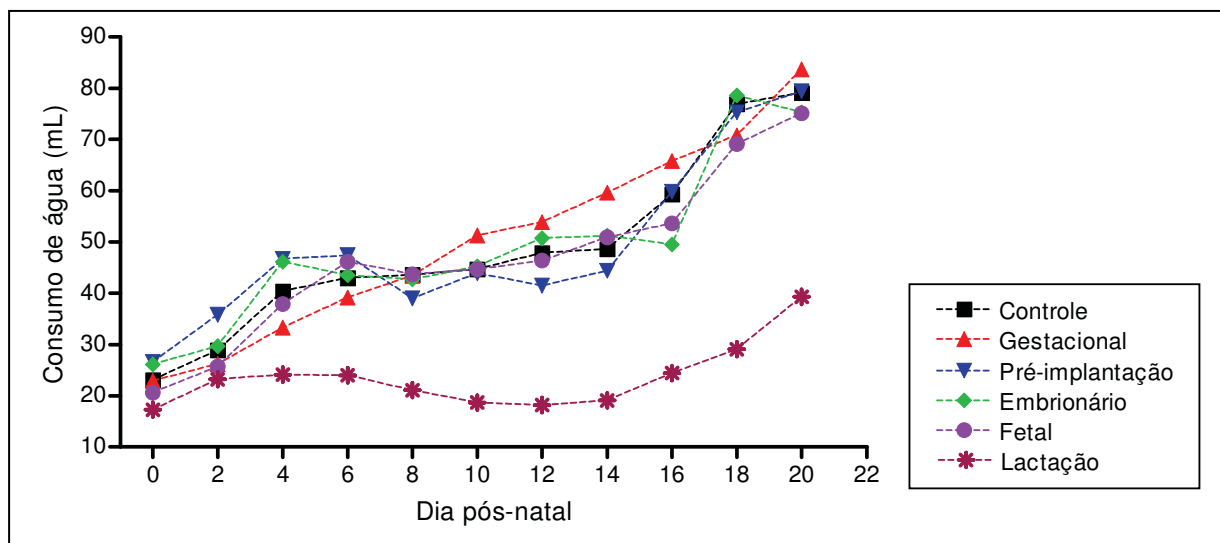


Figura 3 – Consumo materno de água durante a lactação nos diferentes grupos experimentais. Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 3.

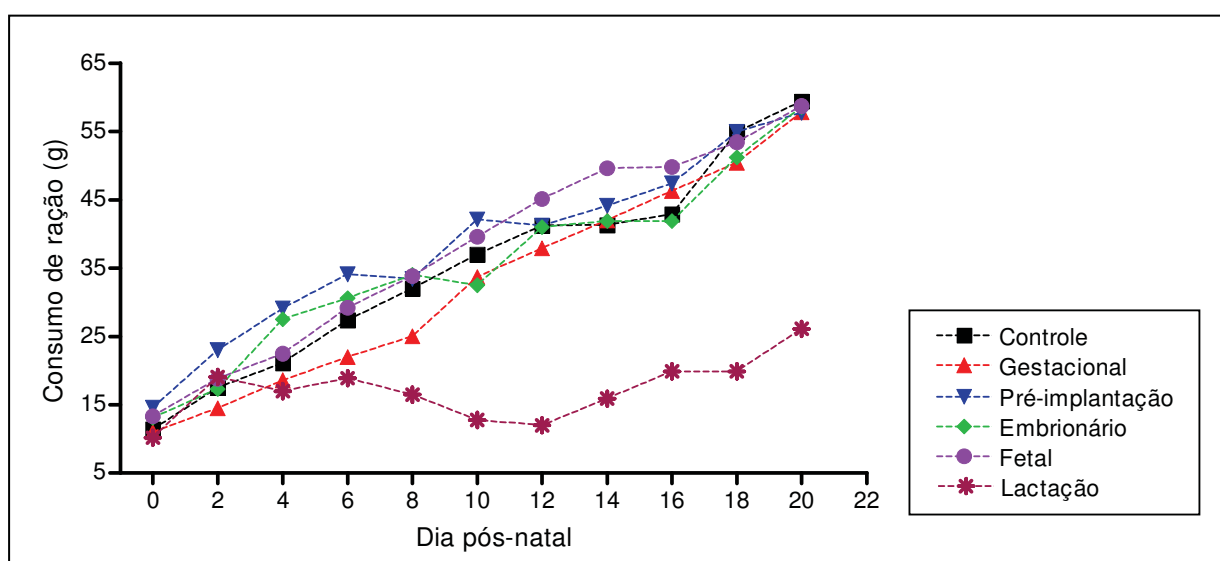


Figura 4 – Consumo materno de ração ao longo da lactação nos diferentes grupos experimentais. Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 4.

Tabela 3 – Consumo médio diário de água (mL) pelas matrizes durante a lactação

Dia	Controle	Gestacional	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
Pós-natal	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
0	23,1 ± 7,0 a*§	22,9 ± 2,7 a	26,6 ± 12,1 a	26,1 ± 4,1 a	20,6 ± 6,1 a	17,3 ± 2,9 a
2	28,9 ± 4,2 ab	26,2 ± 8,0 ab	35,8 ± 8,8 a	29,7 ± 4,9 ab	25,7 ± 10,0 ab	23,2 ± 2,9 b
4	40,4 ± 9,9 ab	33,3 ± 6,8 ac	46,7 ± 9,1 b	46,1 ± 9,2 b	37,9 ± 4,7 ab	24,1 ± 1,5c
6	43,0 ± 8,3 a	39,2 ± 6,5 a	47,4 ± 12,2 a	43,5 ± 12,9 a	46,1 ± 7,6 a	24,0 ± 4,6 b
8	43,6 ± 8,2 a	43,4 ± 10,0 a	39,0 ± 8,4 a	42,7 ± 11,2 a	43,7 ± 5,3 a	21,1 ± 5,0 b
10	44,7 ± 10,3 a	51,3 ± 15,1 a	43,9 ± 9,5 a	45,2 ± 15,8 a	44,7 ± 7,2 a	18,7 ± 3,7 b
12	47,9 ± 14,3 a	53,9 ± 15,1 a	41,5 ± 9,5 a	50,7 ± 24,1 a	46,4 ± 9,3 a	18,2 ± 3,7 b
14	48,6 ± 13,7 a	59,6 ± 21,4 a	44,4 ± 7,6 a	51,2 ± 23,2 a	50,9 ± 11,9 a	19,1 ± 3,4 b
16	54,3 ± 9,2 a	65,8 ± 18,2 a	59,8 ± 17,5 a	49,5 ± 17,0 a	53,6 ± 14,9 a	24,4 ± 11,0 b
18	76,9 ± 18,3 a	70,8 ± 13,4 a	75,3 ± 22,3 a	78,6 ± 34,7 a	69,1 ± 12,7 a	29,1 ± 8,6 b
20	79,1 ± 16,7 a	83,7 ± 22,6 a	79,4 ± 23,1 a	75,3 ± 19,7 a	75,1 ± 16,3 a	34,3 ± 16,4 b

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Tabela 4 – Consumo médio diário de ração (g) pelas matrizes durante a lactação

Dia	Controle	Gestacional	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
Pós-natal	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
0	11,4 ± 2,8 a [§]	11,0 ± 2,4 a	14,6 ± 2,6 a	13,1 ± 3,0 a	13,3 ± 4,6 a	10,2 ± 2,8 a
2	17,5 ± 2,7 ab	14,5 ± 3,4 a	23,0 ± 4,3 b	17,3 ± 3,8 ab	18,8 ± 7,8 ab	19,1 ± 4,8 ab
4	21,1 ± 6,7 a	18,6 ± 5,5 b	29,1 ± 3,0 a	27,5 ± 3,9 a	22,5 ± 2,1 ab	17,0 ± 2,5 b
6	27,4 ± 7,9 ab	22,0 ± 5,9 ac	34,1 ± 3,2 b	30,6 ± 4,0 b	29,2 ± 5,6 ab	18,9 ± 3,2 c
8	32,0 ± 9,4 a	25,0 ± 7,5 ab	33,4 ± 7,3 a	34,0 ± 5,8 a	33,8 ± 5,5 a	16,5 ± 6,0 b
10	37,0 ± 7,6 a	33,7 ± 5,1 a	42,1 ± 5,2 a	32,5 ± 12,3 a	39,6 ± 3,1 a	12,8 ± 7,1 b
12	41,2 ± 7,4 a	37,9 ± 6,7 a	41,2 ± 6,9 a	41,0 ± 8,0 a	45,1 ± 2,1 a	12,0 ± 7,5 b
14	40,5 ± 6,5 a	42,0 ± 6,2 a	40,7 ± 6,8 a	40,1 ± 8,5 a	48,6 ± 5,0 a	17,3 ± 7,9 b
16	42,9 ± 7,5 a	46,3 ± 4,2 a	47,4 ± 6,1 a	41,9 ± 7,5 a	49,8 ± 3,8 a	19,9 ± 8,0 b
18	54,9 ± 9,2 a	50,4 ± 6,4 a	54,9 ± 3,9 a	51,2 ± 10,1 a	53,4 ± 3,9 a	19,9 ± 6,1 b
20	59,4 ± 8,3 a	57,8 ± 5,0 a	57,7 ± 5,6 a	58,6 ± 7,4 a	58,7 ± 7,8 a	26,1 ± 8,9 b

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Peso Corpóreo Materno

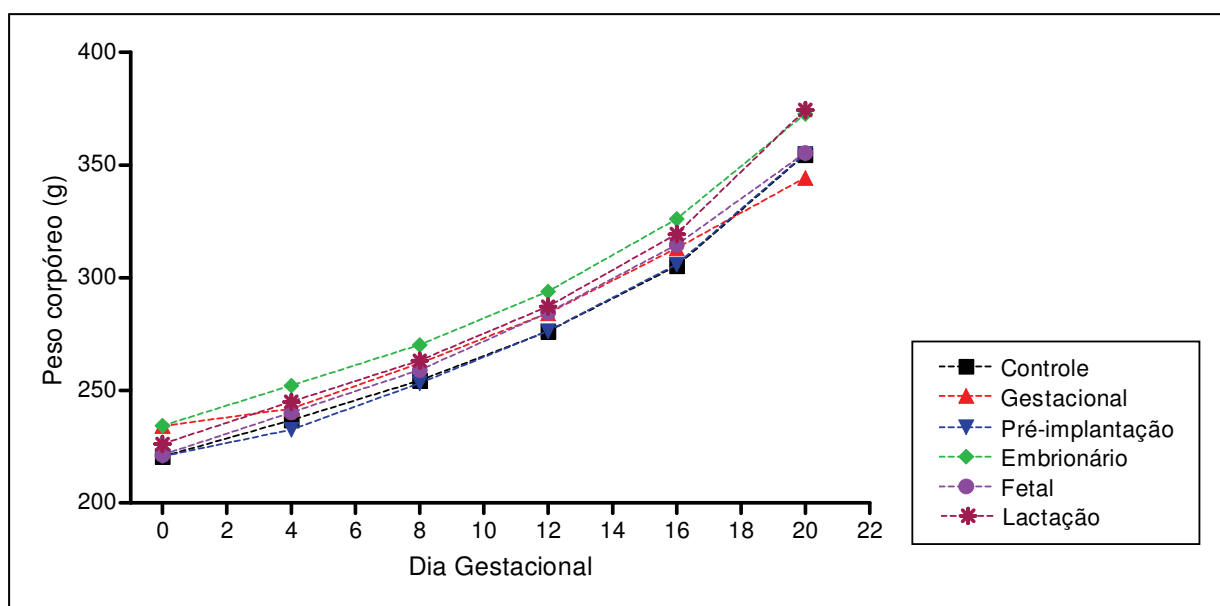


Figura 5 – Evolução do peso corpóreo materno ao longo da gestação nos diferentes grupos experimentais. Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 5.

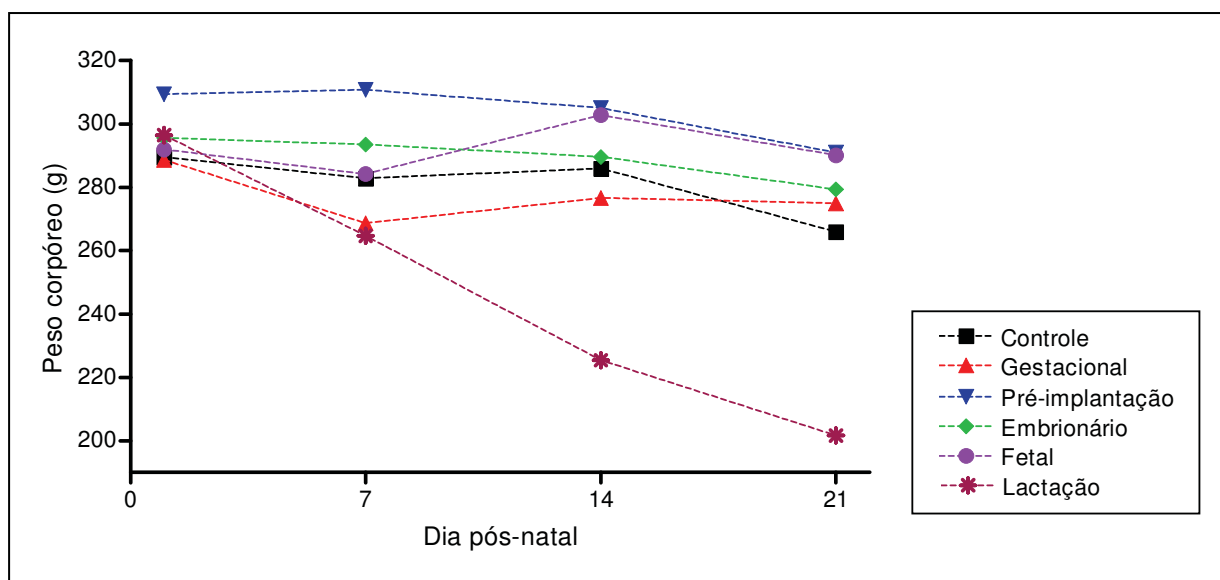


Figura 6 – Evolução do peso corpóreo materno ao longo da lactação nos diferentes grupos experimentais. Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 6.

Tabela 5 – Evolução do peso corpóreo (g) materno durante a gestação

Dia Gestacional	Controle (n=13)	Gestacional (n=12)	Pré-implantação (n=12)	Embrionário (n=12)	Fetal (n=13)	Lactação (n=7)
0	220,5 ± 23,5 a*§	234,2 ± 21,1 a	220,6 ± 24,6 a	234,3 ± 20,4 a	221,3 ± 18,1 a	226,2 ± 18,0 a
4	236,8 ± 23,2 a	241,8 ± 23,5 a	232,5 ± 29,0 a	252,1 ± 19,4 a	240,2 ± 19,9 a	244,9 ± 23,0 a
8	254,3 ± 26,0 a	262,0 ± 23,7 a	253,1 ± 33,9 a	270,2 ± 21,9 a	259,0 ± 21,2 a	263,2 ± 29,2 a
12	276,2 ± 26,4 a	284,2 ± 24,2 a	276,3 ± 39,1 a	293,8 ± 21,9 a	284,4 ± 23,2 a	287,2 ± 34,1 a
16	305,2 ± 27,8 a	313,1 ± 24,3 ± a	305,9 ± 44,5 a	326,1 ± 25,1 a	314,6 ± 29,5 a	319,4 ± 35,7 a
20	354,5 ± 33,3 a	344,3 ± 31,9 a	354,9 ± 49,2 a	372,6 ± 28,9 a	355,4 ± 32,7 a	374,4 ± 43,2 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Tabela 6 – Evolução do peso corpóreo (g) materno durante a lactação

Dia	Controle	Gestacional	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
Pós-natal	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
1	289,5 ± 27,8 a**§	288,6 ± 28,8 a	309,4 ± 39,3 a	295,6 ± 33,8 a	291,9 ± 39,1 a	296,5 ± 33,3 a
7	282,8 ± 30,0 a	268,7 ± 36,5 a	310,7 ± 36,6 a	293,5 ± 30,5 a	284,2 ± 39,0 a	264,7 ± 33,9 a
14	285,9 ± 33,6 a	276,6 ± 33,3 ab	305,0 ± 35,2 a	289,6 ± 31,8 a	302,8 ± 34,7 a	225,4 ± 26,7 b
21	266,0 ± 28,6 a	275,0 ± 21,7 a	291,0 ± 28,9 a	279,3 ± 27,1 a	290,1 ± 29,4 a	201,7 ± 28,5 b

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

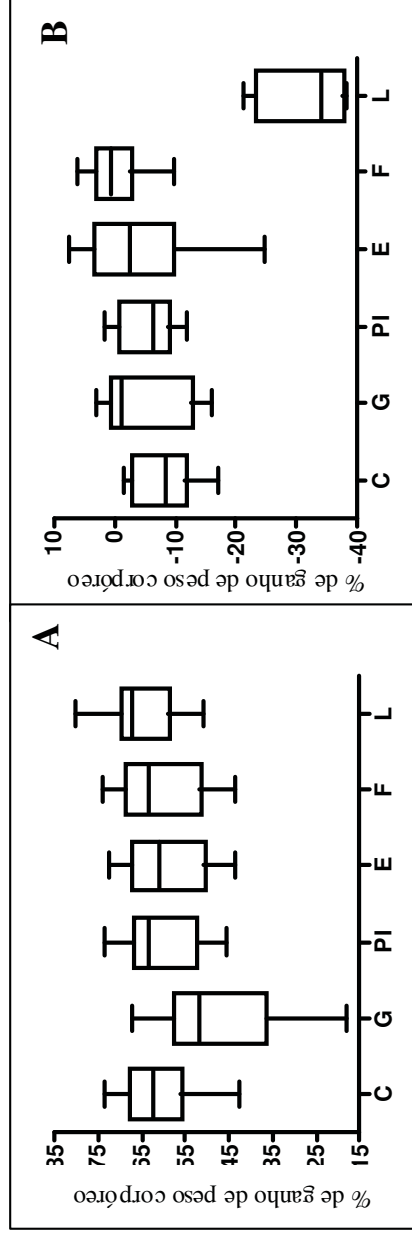


Figura 7 – Porcentagem de ganho de peso corpóreo pelas matrizes ao longo dos períodos de Gestação (A) e Lactação (B) nos diferentes grupos experimentais. Resultados expressos como Mediana $\pm$ Desvio interquartil. C=Controle, G=Gestação, PI=Pré-implantação, E=Embrionário, F=Fetal, L=Lactação.

Tabela 7 – Porcentagem (%) de ganho de peso corpóreo materno

Período	Controle	Gestacional	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
Gestação	62,29 $\pm$ 6,83 a [§]	51,88 $\pm$ 21,29 a	63,48 $\pm$ 14,4 a	61,14 $\pm$ 16,22 a	63,39 $\pm$ 11,95 a	67,07 $\pm$ 10,94 a
Lactação	-8,26 $\pm$ 8,75 ab	-0,93 $\pm$ 13,16 a	-6,37 $\pm$ 7,03 ab	-2,44 $\pm$ 12,9 a	-0,64 $\pm$ 5,53 a	-34,2 $\pm$ 14,24 b

*Valores expressos como Mediana $\pm$ Desvio interquartil (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

Desempenho Gestacional

Tabela 8 – Parâmetros reprodutivos das ratas (F0) dos diferentes grupos experimentais tratados nos períodos gestacionais

Parâmetros	Controle (n=6)	Gestacional (n=5)	Pré-implantação (n=5)	Embrionário (n=5)	Fetal (n=6)
Peso do útero gravídico (g)*	61,68 ± 12,01 a [§]	56,99 ± 6,84 a	50,88 ± 9,05 a	66,79 ± 10,23 a	57,88 ± 10,93 a
Implantações*	11,50 ± 2,74 a	13,00 ± 0,00 a	10,80 ± 1,92 a	13,00 ± 1,58 a	13,00 ± 1,58 a
Reabsorções*	0,00 ± 0,00 a	1,40 ± 1,34 a	0,80 ± 1,09 a	0,80 ± 1,09 a	0,67 ± 1,21 a
Nº de fetos*	11,50 ± 2,74 a	11,60 ± 1,34 a	10,00 ± 1,871 a	12,60 ± 2,07 a	10,83 ± 2,14 a
Nº de placentas*	11,50 ± 2,74 a	11,60 ± 1,34 a	10,00 ± 1,871 a	12,60 ± 2,07 a	10,83 ± 2,14 a
Peso médio dos fetos (g)*	3,75 ± 0,22 a	3,38 ± 0,24 b	3,50 ± 0,21 ab	3,69 ± 0,17 ab	3,82 ± 0,11 a
Peso médio das placentas (g)*	0,45 ± 0,07 a	0,41 ± 0,04 a	0,45 ± 0,04 a	0,43 ± 0,04 a	0,41 ± 0,02 a
Índice placentário médio (cm/g ^{1/3})**	8,64 ± 1,05 ab	8,33 ± 0,36 ab	7,80 ± 1,10 a	8,66 ± 0,74 ab	9,50 ± 0,67 b
Perdas pré-implantação (%)**	4,54 ± 10,00 a	0,00 ± 0,00 a	7,69 ± 8,33 a	8,33 ± 13,33 a	0,00 ± 7,69 a
Perdas pós-implantação (%)**	0,00 ± 0,00 a	15,38 ± 15,38 a	0,00 ± 15,38 a	0,00 ± 8,33 a	0,00 ± 10,00 a
Índice de fertilidade (%)	100	100	100	100	100
Índice de gestação (%)	100	100	100	100	100

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

**Valores expressos como Mediana ± Desvio interquartilico (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

ANEXO II

Figuras e Tabelas

DADOS DA PROLE DO NASCIMENTO AO DESMAME

Dados da Prole ao Nascimento

Peso e Comprimento (Distância Céfalo-caudal) Corpóreos

Tabela 1 – Peso corpóreo médio (g) e distância céfalo-caudal média (cm) no DPN1

	Controle (n=7)	Gestacional (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Peso natal médio	6,77 ± 0,56 ab*§	5,79 ± 0,46 a	7,56 ± 0,74 b	6,58 ± 0,67 ab	6,14 ± 1,00a	6,55 ± 0,58 ab
Distância céfalo-caudal média	4,96 ± 0,17 ab	4,73 ± 0,14 a	5,19 ± 0,26 b	4,98 ± 0,24 ab	4,98 ± 0,31 ab	4,97 ± 0,16 ab
Peso natal médio de machos	6,85 ± 0,50 ab	6,04 ± 0,46 a	7,77 ± 0,73 b	6,71 ± 0,68 ab	6,33 ± 1,10 a	6,80 ± 6,80 ab
Distância céfalo-caudal média de machos	4,94 ± 0,19 ab	4,74 ± 0,18 a	5,25 ± 0,28 b	5,02 ± 0,26 ab	4,88 ± 0,29 ab	5,07 ± 0,17 ab
Peso natal médio de fêmeas	6,32 ± 0,62 ac	5,59 ± 0,50 b	7,27 ± 0,81 a	6,38 ± 0,75 abc	5,84 ± 0,79 bc	6,31 ± 0,60 abc
Distância céfalo-caudal média de fêmeas	4,95 ± 0,18 ab	4,69 ± 0,17 a	5,09 ± 0,28 b	4,95 ± 0,21 ab	4,78 ± 0,18 ab	4,89 ± 0,17 ab

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Distância Anogenital (DAG) e Índice Anogenital

Tabela 2 – Distância anogenital (DGA) média (mm) e índice anogenital no DPN1

	Controle (n=7)	Gestacional (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
DAG*	2,23 ± 0,36 a [§]	2,19 ± 0,32 a	2,43 ± 0,31 a	2,07 ± 0,48 a	2,16 ± 0,34 a	1,94 ± 0,25 a
Índice anogenital**	1,09 ± 0,20 a	1,10 ± 0,17 a	1,38 ± 0,41 a	1,18 ± 0,20 a	1,18 ± 0,15 a	1,03 ± 0,11 a
DAG em machos	2,84 ± 0,33 a	2,73 ± 0,26 a	3,14 ± 0,54 a	2,69 ± 0,41 a	2,84 ± 0,25 a	2,61 ± 0,41 a
Índice anogenital em machos	1,50 ± 0,18 a	1,50 ± 0,15 a	1,58 ± 0,23 a	1,42 ± 0,20 a	1,54 ± 0,08 a	1,38 ± 0,19 a
DAG em fêmeas	1,36 ± 0,20 a	1,29 ± 0,18 a	1,44 ± 0,13 a	1,31 ± 0,13 a	1,31 ± 0,09 a	1,26 ± 0,14 a
Índice anogenital em fêmeas	0,72 ± 0,09 a	0,73 ± 0,11 a	0,75 ± 0,07 a	0,71 ± 0,06 a	0,73 ± 0,04 a	0,68 ± 0,08 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

**Valores expressos como Mediana ± Desvio interquartilico (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Evolução do Peso do nascimento (DPN1) ao desmame (DPN21)

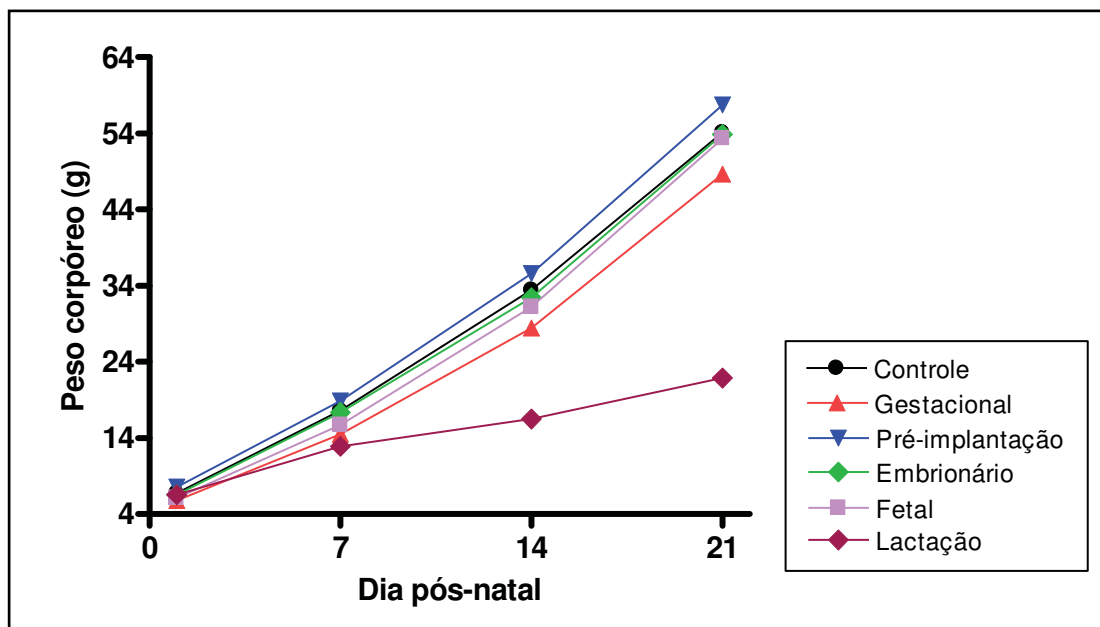


Figura 1 – Evolução do peso corpóreo dos filhotes dos diversos grupos experimentais do nascimento ao desmame. Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Evolução do peso dos filhotes do nascimento (DPN1) ao desmame (DPN21)

Dia	Controle	Gestacional	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
Pós-natal	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
1	6,77 ± 0,56 ab**§	5,79 ± 0,46 a	7,56 ± 0,74 b	6,58 ± 0,67 ab	6,14 ± 1,00 a	6,55 ± 0,58 ab
7	17,58 ± 1,10 ac	14,48 ± 1,82 bd	18,86 ± 1,29 c	17,36 ± 1,48 ac	15,71 ± 1,85 ab	12,92 ± 1,09 d
14	33,44 ± 4,37 ab	28,46 ± 2,63 a	35,57 ± 3,29 b	32,42 ± 3,79 ab	3,19 ± 2,2 ab	16,49 ± 1,96 c
21	54,15 ± 6,80 ab	48,67 ± 3,95 a	57,74 ± 3,68 b	53,87 ± 6,19 ab	53,34 ± 2,81 ab	21,89 ± 2,53 c

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

ANEXO III

Figuras e Tabelas

DADOS DA PROLE FEMININA APÓS O DESMAME

Evolução do Peso Corpóreo do DPN28 ao DPN80

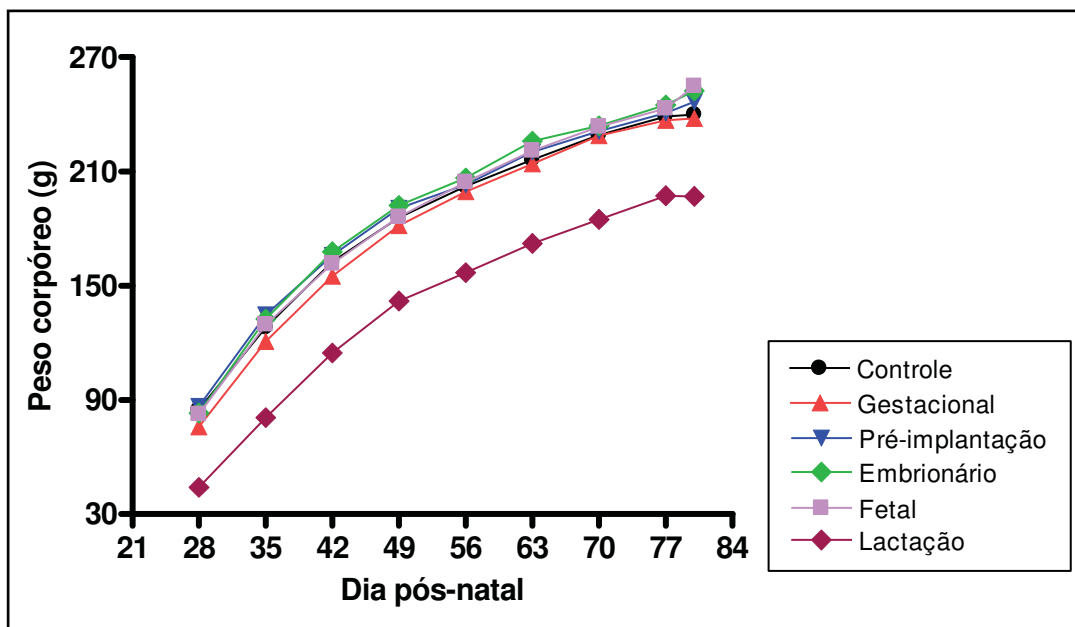


Figura 1 – Evolução do peso corpóreo da prole feminina a partir do DPN28 até a idade adulta (DPN80). Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Evolução do peso corpóreo feminino do DPN28 ao DPN80

Dia Pós-natal	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-Implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
28	84,88 ± 6,51 ab*§	75,83 ± 4,57 a	86,62 ± 4,30 b	83,13 ± 9,83 ab	82,60 ± 4,94 ab	44,11 ± 4,71 c
35	128,09 ± 6,77 ab	120,71 ± 7,62 a	134,66 ± 6,85 b	132,41 ± 13,00 ab	129,60 ± 7,21 ab	80,64 ± 8,41 c
42	162,69 ± 8,73 a	155,02 ± 10,13 a	165,98 ± 9,49 a	167,94 ± 16,34 a	161,61 ± 11,12 a	114,71 ± 11,68 b
49	185,73 ± 12,47 a	181,43 ± 7,84 a	190,58 ± 11,27 a	192,23 ± 20,61 a	186,11 ± 12,16 a	141,98 ± 13,38 b
56	202,19 ± 14,32 a	199,32 ± 8,74 a	203,11 ± 12,83 a	206,61 ± 19,91 a	204,42 ± 16,50 a	156,85 ± 12,91 b
63	216,23 ± 13,54 a	214,13 ± 11,92 a	220,11 ± 13,11 a	225,90 ± 20,49 a	220,96 ± 17,06 a	172,24 ± 16,03 b
70	229,08 ± 12,99 a	228,82 ± 11,14 a	231,16 ± 15,23 a	233,97 ± 23,19 a	233,50 ± 16,60 a	184,80 ± 17,19 b
77	238,95 ± 14,41 a	236,91 ± 11,90 a	240,62 ± 15,60 a	244,87 ± 24,65 a	243,05 ± 17,08 a	197,20 ± 12,45 b
80	240,03 ± 22,01 a	237,80 ± 13,34 a	246,64 ± 18,07 a	252,37 ± 31,23 a	254,80 ± 13,51 a	196,93 ± 23,08 b

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Idade da Puberdade – Abertura Vaginal

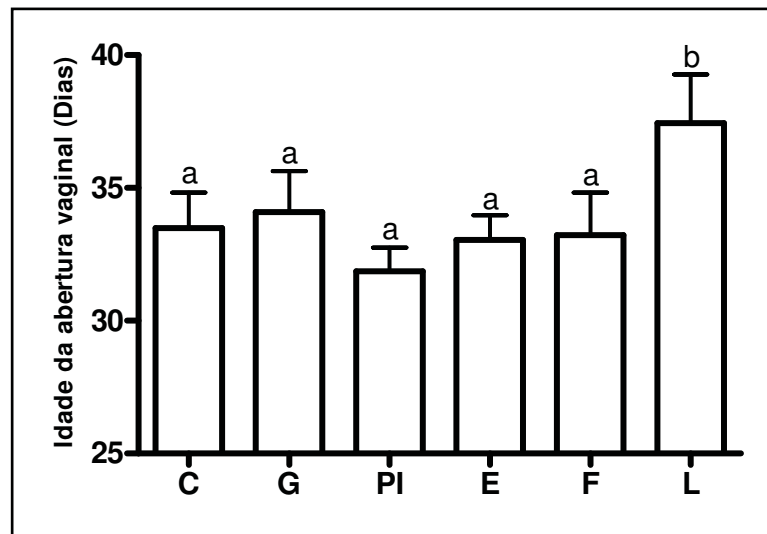


Figura 2 – Idade de abertura vaginal nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (One-way ANOVA). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos. C = Controle, G = Gestação, PI = Pré-implantação, E = Embrionário, F = Fetal, L = Lactação.

Tabela 2 – Idade da abertura vaginal e da separação prepucial em dias.

	Controle (n=7)	Gestacional (n=7)	Pré- implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Abertura vaginal	33,48 $\pm$ 1,34 a* [§]	34,1 $\pm$ 1,53 a	31,86 $\pm$ 0,90 a	33,05 $\pm$ 0,93 a	33,21 $\pm$ 1,61 a	37,44 $\pm$ 1,82 b

*Valores expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (One-way ANOVA).

[§]Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

Pesos Corpóreo e dos Órgãos Reprodutivos no DPN55 e no DPN80

Tabela 3 – Peso corpóreo (g) e pesos absoluto (g) e relativo dos órgãos reprodutivos femininos no DPN55

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-Implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Peso corpóreo	198,53 ± 11,64 a**§	195,53 ± 15,22 a	202,21 ± 22,04 a	200,86 ± 19,45 a	197,00 ± 19,22 a	157,09 ± 13,56 b
Peso do útero	0,33 ± 0,04 a	0,31 ± 0,03 a	0,33 ± 0,05 a	0,32 ± 0,04 a	0,32 ± 0,04 a	0,29 ± 0,02 a
PR** do útero	0,17 ± 0,025 a	0,017 ± 0,018 a	0,16 ± 0,032 a	0,16 ± 0,036 a	0,17 ± 0,016 a	0,18 ± 0,030 a
Peso dos ovários	0,07 ± 0,01 a	0,07 ± 0,01 ab	0,06 ± 0,01 ab	0,06 ± 0,005 ab	0,06 ± 0,006 ab	0,05 ± 0,008 b
PR dos ovários	0,04 ± 0,005 a	0,04 ± 0,006 a	0,03 ± 0,005 a	0,03 ± 0,003 a	0,03 ± 0,004 a	0,03 ± 0,003 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

** PR= Peso relativo, calculado em g/100g de peso corpóreo e expresso em Mediana ± Desvio interquartilício (Kruskal-Wallis).

§ Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Tabela 4 – Peso corpóreo (g) e pesos absoluto (g) e relativo dos órgãos reprodutivos femininos no DPN80

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-Implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Peso corpóreo	240,03 ± 22,01 a**§	237,80 ± 13,34 a	246,64 ± 18,07 a	252,37 ± 31,23 a	245,80 ± 13,51 a	196,93 ± 23,08 b
Peso do útero	0,40 ± 0,09 a	0,35 ± 0,03 a	0,36 ± 0,06 a	0,37 ± 0,02 a	0,39 ± 0,06 a	0,36 ± 0,06 a
PR** do útero	0,16 ± 0,032 a	0,14 ± 0,017 a	0,14 ± 0,41 a	0,15 ± 0,020 a	0,15 ± 0,023 a	0,18 ± 0,050 a
Peso dos ovários	0,08 ± 0,018 a	0,07 ± 0,014 ab	0,07 ± 0,011 ab	0,07 ± 0,012 ab	0,08 ± 0,016 a	0,06 ± 0,012 b
PR dos ovários	0,034 ± 0,005 a	0,030 ± 0,009 a	0,033 ± 0,008 a	0,031 ± 0,008 a	0,033 ± 0,010 a	0,031 ± 0,005 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

**PR= Peso relativo, calculado em g/100g de peso corpóreo e expresso em Mediana ± Desvio interquartilico (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Dosagens Hormonais no DPN55 e no DPN80

Tabela 5 – Dosagens Hormonais da Prole Feminina (ng/mL de soro)

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-Implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
DPN55						
LH	0,47 ± 0,13 a*§	0,51 ± 0,22 a	0,50 ± 0,14 a	0,42 ± 0,13 a	0,38 ± 0,08 a	0,63 ± 0,31 a
FSH	13,24 ± 1,83 a	11,41 ± 3,50 a	12,59 ± 2,55 a	9,37 ± 4,70 a	8,99 ± 2,28 a	12,09 ± 3,76 a
DPN80						
LH	0,31 ± 0,12 a	0,45 ± 0,20 a	0,40 ± 0,23 a	0,25 ± 0,07 a	0,44 ± 0,15 a	0,53 ± 0,20 a
FSH	8,37 ± 1,53 a	8,81 ± 2,56 a	7,57 ± 2,21 a	6,63 ± 1,33 a	7,15 ± 1,39 a	7,71 ± 2,18 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§ Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Avaliação da Regularidade do Ciclo Estral do DPN60 ao DPN80

Tabela 6 – Avaliação da Regularidade do Ciclo Estral do DPN60 ao DPN80

	Controle	Gestação	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
Nº de fêmeas	19	19	14	15	17	19
Nº de ninhadas	7	7	7	7	7	7
Fi de Estro	5,0 ± 2,0 a*§	5,0 ± 1,5 a	5,5 ± 1,0 a	5,0 ± 1,0 a	5,0 ± 1,0 a	5,0 ± 1,0 a
Fi de Metaestro	5,0 ± 5,0 a	6,0 ± 2,5 a	5,0 ± 2,0 a	6,0 ± 3,5 a	3,0 ± 5,0 a	5,0 ± 3,0 a
Fi de Diestro	5,0 ± 2,5 a	4,0 ± 3,5 a	5,0 ± 2,75 a	5,0 ± 3,0 a	8,0 ± 4,0 a	5,0 ± 3,0 a
Fi de Proestro	4,0 ± 1,0 a	5,0 ± 1,5 a	5,0 ± 1,0 a	5,0 ± 1,5 a	5,0 ± 1,0 a	5,0 ± 1,0 a
Duração média de cada ciclo (dias)	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a

*Valores expressos como Mediana ± Desvio interquartilico (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

ANEXO IV

Figuras e Tabelas

DADOS DA PROLE MASCULINA APÓS O DESMAME

Evolução do Peso Corpóreo do DPN28 ao DPN90

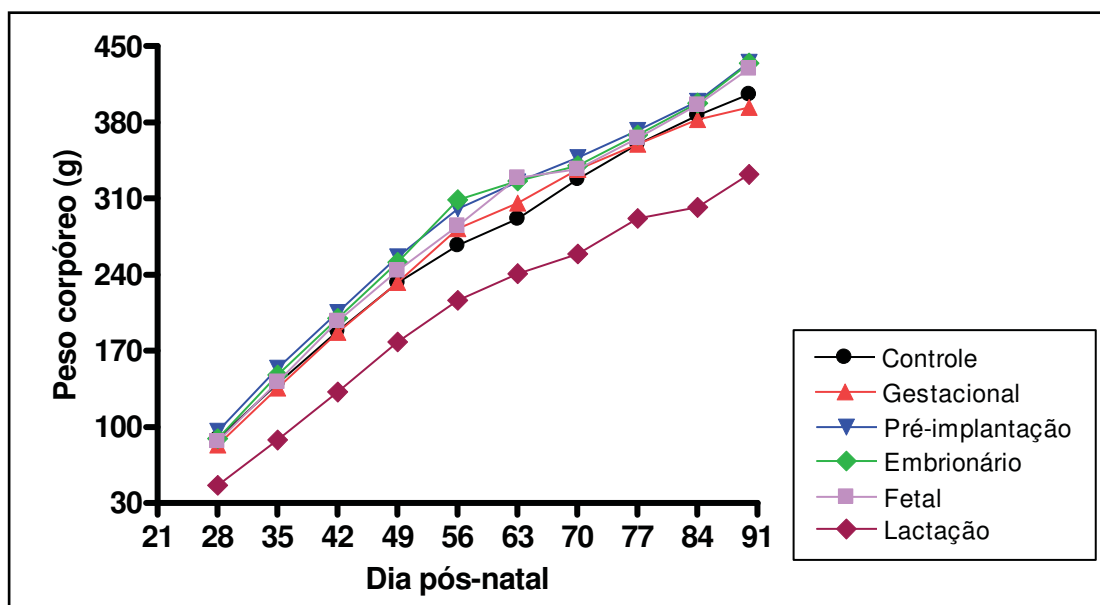


Figura 1 – Evolução do peso corpóreo da prole masculina a partir do DPN28 até a idade adulta (DPN90). Os valores de Média e Desvio padrão estão na Tabela 1.

Tabela 1 – Evolução do peso corpóreo dos filhotes machos do DPN28 ao DPN90

Dia	Controle	Gestação	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
Pós-natal	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
28	88,82 ± 7,61 ab**§	83,42 ± 6,63 a	95,94 ± 6,17 b	89,14 ± 7,79 ab	86,70 ± 6,75 ab	46,37 ± 4,55 c
35	139,97 ± 8,98 ab	135,77 ± 11,14 a	153,83 ± 10,11 b	147,87 ± 11,93 ab	141,44 ± 9,52 ab	88,00 ± 9,95 c
42	188,24 ± 17,14 a	186,88 ± 13,85 a	205,24 ± 10,12 a	200,00 ± 17,27 a	197,45 ± 12,31 a	132,10 ± 11,79 b
49	232,62 ± 25,88 a	232,88 ± 19,68 a	256,48 ± 14,58 a	251,24 ± 17,97 a	243,76 ± 21,88 a	178,23 ± 15,02 b
56	267,11 ± 33,46 a	282,39 ± 21,84 a	300,77 ± 21,69 a	308,81 ± 37,18 a	285,06 ± 33,16 a	216,30 ± 24,99 b
63	291,35 ± 49,68 a	306,01 ± 24,61 a	325,20 ± 13,56 a	326,08 ± 23,58 a	329,20 ± 18,63 a	240,92 ± 35,16 b
70	327,93 ± 33,84 a	336,91 ± 24,29 a	347,44 ± 14,95 a	340,28 ± 30,58 a	336,96 ± 30,39 a	258,92 ± 29,01 b
77	360,01 ± 37,83 a	360,07 ± 27,28 a	372,68 ± 24,20 a	368,22 ± 28,53 a	365,67 ± 35,60 a	291,83 ± 15,89 b
84	386,38 ± 44,42 a	382,86 ± 32,60 a	399,39 ± 18,17 a	397,84 ± 25,56 a	396,34 ± 40,77 a	302,00 ± 32,06 b
90	405,81 ± 37,67 a	393,87 ± 29,95 a	435,19 ± 23,94 a	434,64 ± 31,89 a	429,21 ± 37,81 a	332,06 ± 48,12 b

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Idade da Puberdade – Separação Prepucial

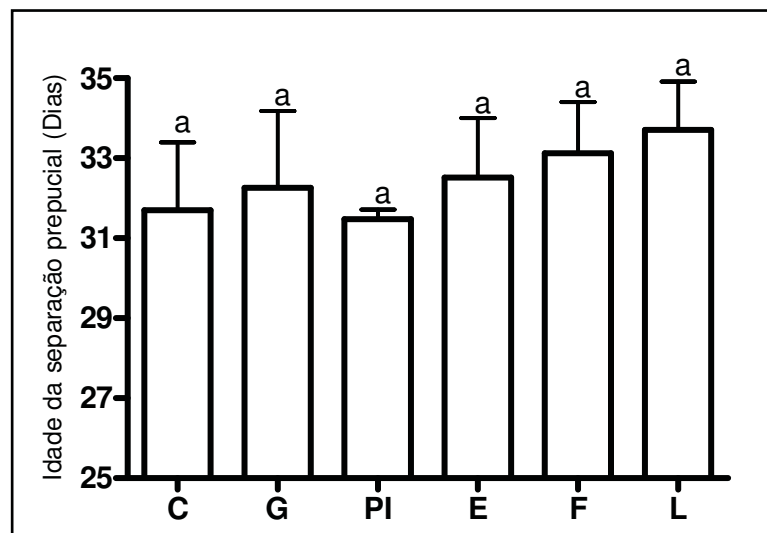


Figura 2 – Idade de separação prepucial nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (One-way ANOVA). C = Controle, G = Gestação, PI = Pré-implantação, E = Embrionário, F = Fetal, L = Lactação.

Tabela 2 – Idade da separação prepucial em dias

	Controle (n=7)	Gestacional (n=7)	Pré- implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Separação	31,70 $\pm$	32,26 $\pm$	31,48 $\pm$	32,52 $\pm$	33,13 $\pm$	33,71 $\pm$
prepucial	1,70 a*§	1,92 a	0,24 a	1,49 a	1,27 a	1,20 a

*Valores expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

Pesos Corpóreo e dos Órgãos Reprodutivos no DPN55 e no DPN90

Tabela 3 – Peso corpóreo (g) e pesos absoluto (g) e relativo dos órgãos reprodutivos masculinos no DPN55

	Controle (n=7)	Gestacional (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Peso Corpóreo	285,27 ± 9,29 a**§	274,23 ± 33,92 a	300,3 ± 19,78 a	298,86 ± 17,42 a	290,67 ± 25,75 a	208,09 ± 19,29 b
Testículo	1,31 ± 0,08 a	1,26 ± 0,12 a	1,31 ± 0,12 a	1,27 ± 0,09 a	1,30 ± 0,10 a	0,96 ± 0,07 b
PR do testículo **	0,46 ± 0,028 a	0,48 ± 0,053 a	0,43 ± 0,033 a	0,42 ± 0,024 a	0,44 ± 0,058 a	0,45 ± 0,044 a
Epidídimo	0,23 ± 0,02 a	0,23 ± 0,03 a	0,24 ± 0,04 a	0,23 ± 0,02 a	0,22 ± 0,02 a	0,15 ± 0,01 b
PR do epidídimo	0,08 ± 0,009 a	0,08 ± 0,007 a	0,08 ± 0,012 a	0,08 ± 0,006 a	0,08 ± 0,017 a	0,07 ± 0,006 a
Ducto deferente	0,06 ± 0,006 a	0,06 ± 0,008 a	0,06 ± 0,006 a	0,06 ± 0,011 a	0,06 ± 0,007 a	0,04 ± 0,009 b
PR do ducto deferente	0,02 ± 0,002 a	0,02 ± 0,003 a	0,02 ± 0,003 a	0,02 ± 0,005 a	0,02 ± 0,004 a	0,02 ± 0,003 a
Próstata	0,22 ± 0,03 a	0,20 ± 0,03 a	0,22 ± 0,02 a	0,25 ± 0,05 a	0,22 ± 0,03 a	0,15 ± 0,02 b
PR da próstata	0,08 ± 0,019 a	0,07 ± 0,021 a	0,08 ± 0,010 a	0,09 ± 0,019 a	0,08 ± 0,026 a	0,07 ± 0,013 a
Vesícula seminal cheia	0,52 ± 0,07 ab	0,47 ± 0,11 ab	0,54 ± 0,11 a	0,53 ± 0,12 a	0,51 ± 0,06 ab	0,35 ± 0,15 b
PR da vesícula seminal cheia	0,18 ± 0,020 a	0,17 ± 0,058 a	0,20 ± 0,064 a	0,18 ± 0,067 a	0,18 ± 0,044 a	0,14 ± 0,120 a
Vesícula seminal vazia	0,34 ± 0,04 a	0,25 ± 0,04 a	0,31 ± 0,07 a	0,31 ± 0,06 a	0,30 ± 0,06 a	0,24 ± 0,09 a
PR da vesícula seminal cheia	0,11 ± 0,019 a	0,09 ± 0,018 a	0,11 ± 0,040 a	0,10 ± 0,030 a	0,010 ± 0,023 a	0,09 ± 0,061 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

** PR= Peso relativo, calculado em g/100g de peso corpóreo e expresso em Médiana ± Desvio interquartilho (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Tabela 4 – Peso corpóreo (g) e pesos absoluto (g) e relativo dos órgãos reprodutivos masculinos no DPN90

	Controle (n=7)	Gestacional (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Peso Corpóreo	405,8 ± 37,7 a*§	393,9 ± 29,9 a	435,2 ± 23,9 a	434,6 ± 3,9 a	429,2 ± 37,8 a	332,1 ± 48,1 b
Testículo	1,57 ± 0,10 ab	1,52 ± 0,18 ab	1,65 ± 0,09 b	1,62 ± 0,05 b	1,62 ± 0,16 b	1,39 ± 0,13 a
PR do testículo **	0,40 ± 0,055 a*§	0,39 ± 0,037 a	0,38 ± 0,044 a	0,38 ± 0,014 a	0,39 ± 0,055 a	0,41 ± 0,034 a
Epidídimo	0,56 ± 0,04 a	0,54 ± 0,04 a	0,57 ± 0,05 a	0,56 ± 0,04 a	0,56 ± 0,03 a	0,50 ± 0,07 a
PR do epidídimo	0,14 ± 0,015 a	0,14 ± 0,009 a	0,13 ± 0,010 a	0,13 ± 0,008 a	0,13 ± 0,014 a	0,15 ± 0,015 a
Ducto deferente	0,11 ± 0,01 a	0,11 ± 0,01 a	0,11 ± 0,01 a	0,11 ± 0,02 a	0,11 ± 0,01 a	0,11 ± 0,02 a
PR do ducto deferente	0,027 ± 0,005 ab	0,027 ± 0,003 ab	0,025 ± 0,005 a	0,025 ± 0,005 ab	0,025 ± 0,003 ab	0,034 ± 0,009 b
Próstata	0,37 ± 0,09 a	0,38 ± 0,04 a	0,43 ± 0,11 a	0,38 ± 0,09 a	0,51 ± 0,09 a	0,41 ± 0,10 a
PR da próstata	0,10 ± 0,041 a	0,09 ± 0,055 a	0,10 ± 0,033 a	0,09 ± 0,023 a	0,11 ± 0,012 a	0,12 ± 0,032 a
Vesícula seminal cheia	1,07 ± 0,14 a	1,08 ± 0,16 a	1,26 ± 0,16 a	1,20 ± 0,18 a	1,20 ± 0,19 a	1,13 ± 0,24 a
PR da vesícula seminal cheia	0,26 ± 0,037 a	0,28 ± 0,062 a	0,28 ± 0,046 a	0,25 ± 0,070 a	0,29 ± 0,036 a	0,32 ± 0,066 a
Vesícula seminal vazia	0,45 ± 0,09 a	0,40 ± 0,06 a	0,42 ± 0,05 a	0,49 ± 0,05 a	0,51 ± 0,08 a	0,45 ± 0,07 a
PR da vesícula seminal vazia	0,11 ± 0,022 ab	0,10 ± 0,014 a	0,09 ± 0,023 a	0,11 ± 0,013 ab	0,12 ± 0,012 ab	0,13 ± 0,017 b

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

** PR= Peso relativo, calculado em g/100g de peso corpóreo e expresso em Médiana ± Desvio interquartilho (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Histologia de Testículo – Análise Quantitativa (DPN55 e DPN90)

Tabela 5 – Análise quantitativa do testículo de ratos aos 55 e aos 90 dias de idade

	Controle	Gestação	Pré-implantação	Embrionário	Fetal	Lactação
DPN55	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=6)	(n=7)
% de túbulos normais	93,00 ± 1,50 a*§	93,00 ± 1,50 a	91,00 ± 4,00 a	93,00 ± 1,50 a	93,50 ± 3,75 a	90,00 ± 2,50 a
% de túbulos anormais	7,00 ± 1,50 a	7,00 ± 1,50 a	9,00 ± 4,00 a	7,00 ± 1,50 a	6,50 ± 3,75 a	10,00 ± 2,50 a
DPN90	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
% de túbulos normais	91,00 ± 2,00 a	90,00 ± 2,75 a	92,00 ± 4,00 a	91,00 ± 4,00 a	92,00 ± 2,50 a	91,00 ± 2,00 a
% de túbulos anormais	9,00 ± 2,00 a	8,50 ± 3,25 a	8,00 ± 4,00 a	9,00 ± 4,00 a	8,00 ± 2,50 a	9,00 ± 2,00 a

*Valores expressos como Mediana ± Desvio interquartilico (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

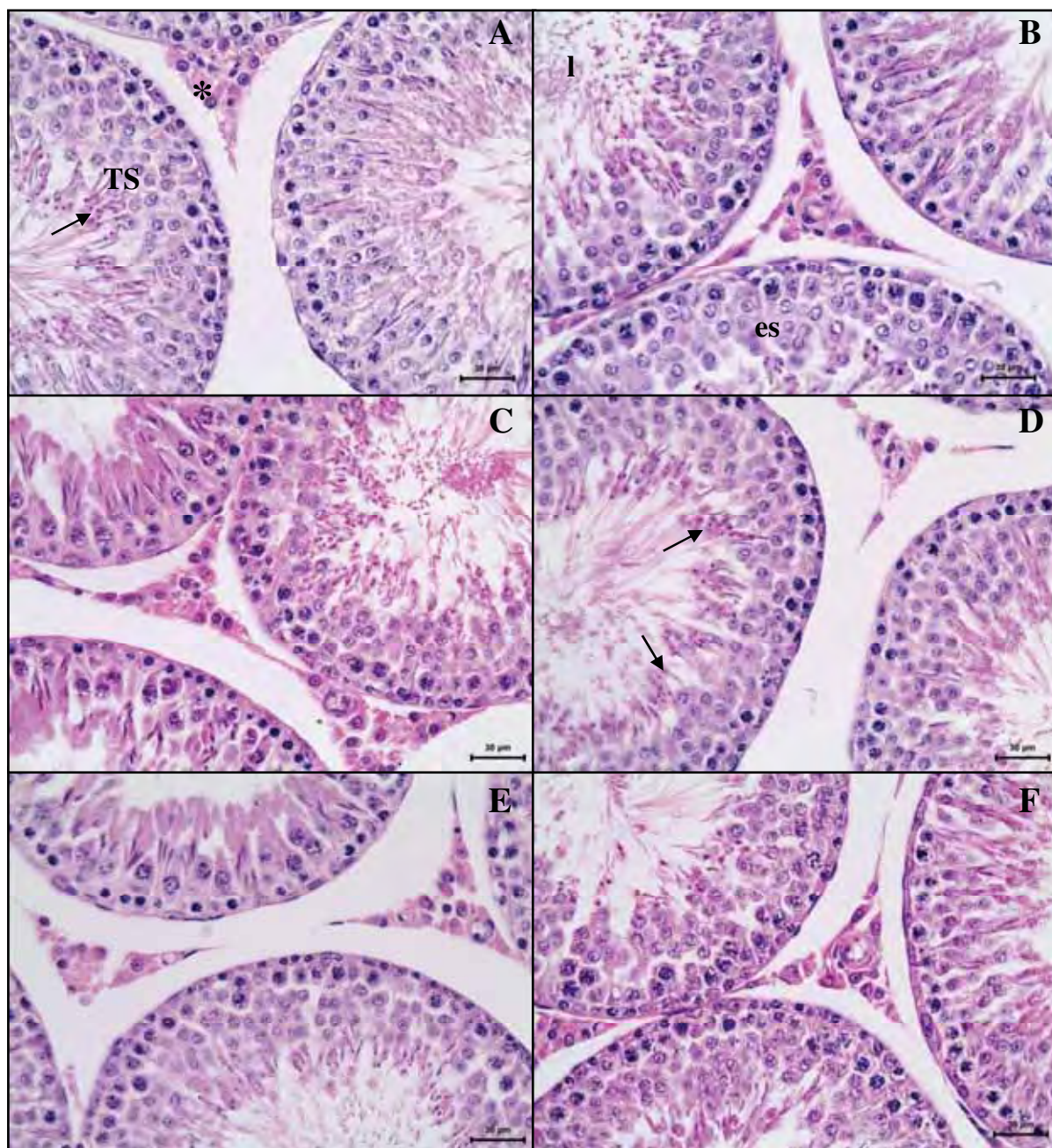


Figura 3 – Cortes transversais do testículo de ratos dos diferentes grupos aos 55 dias de idade. Não houve alterações aparentes na estrutura do órgão. As setas apontam espermatozoides prontos para serem liberados na luz do túbulo seminífero. A – Grupo Controle, B – Grupo Gestação, C – Grupo Pré-implantação, D – Grupo Embrionário, E – Grupo Fetal, F – Grupo Lactação. TS = Túbulo seminífero, * = Interstício, es = Epitélio seminífero, l = luz do túbulo seminífero. H.E., 5µm, 400x.

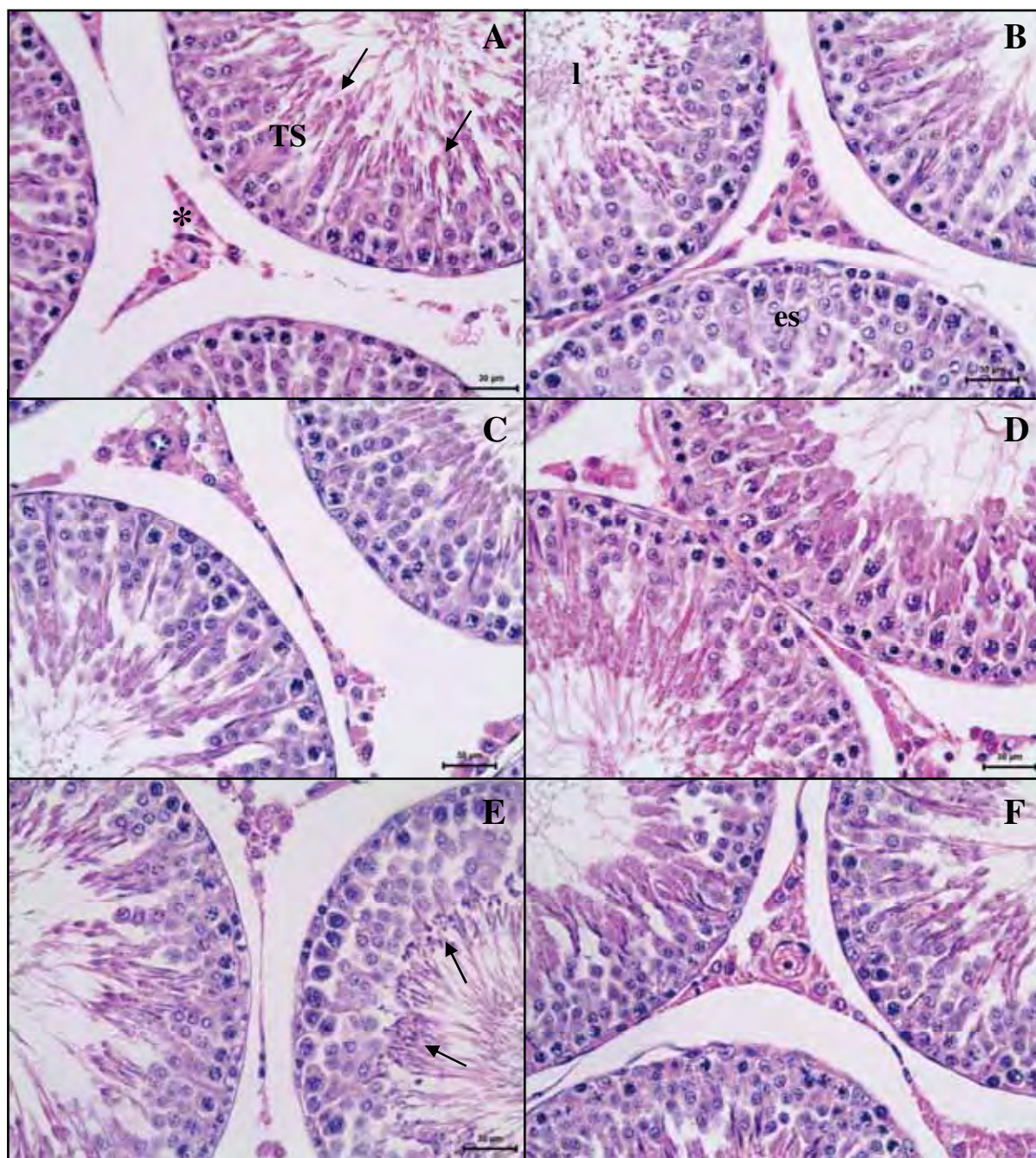


Figura 4 – Cortes transversais do testículo de ratos adultos (90 dias) dos diferentes grupos. Não houve alterações aparentes na estrutura do órgão. . As setas apontam espermatozoides prontos para serem liberados na luz do túbulo seminífero. A – Grupo Controle, B – Grupo Gestação, C – Grupo Pré-implantação, D – Grupo Embrionário, E – Grupo Fetal, F – Grupo Lactação. TS = Túbulo seminífero, * = Interstício, es = Epitélio seminífero, l = luz do túbulo seminífero. H.E., 5µm, 400x.

Contagem de Células de Sertoli (DPN55)

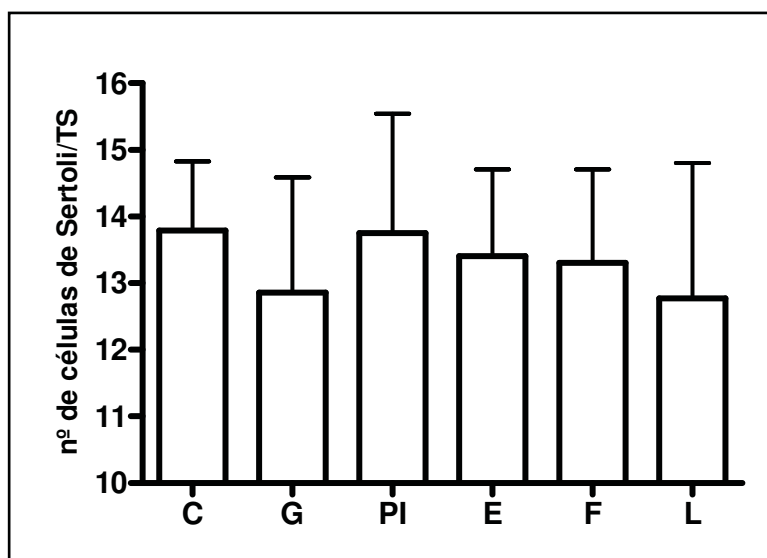


Figura 5 – Resultados referentes à contagem de células de Sertoli nos testículos de ratos aos 55 dias de idade. Os valores estão expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA). C = Controle, G = Gestação, PI = Pré-implantação, E = Embrionário, F = Fetal, L = Lactação, TS = Túbulo seminífero.

Tabela 6 – Contagem de células de Sertoli em animais com 55 dias de idade.

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré- implantação (n=7)	Embrionário (n=6)	Fetal (n=6)	Lactação (n=7)
Nº de Células de Sertoli / TS	13,79 ± 1,03 a*§	12,86 ± 1,73 ab	13,75 ± 1,79 ab	13,41 ± 1,30 ab	13,31 ± 1,40 ab	12,71 ± 2,03 b

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

TS = Túbulo seminífero.

Dosagens Hormonais (DPN55 e no DPN90)

Tabela 7 – Dosagens Hormonais da Prole Masculina (ng/mL de soro)

	Controle (n=7)	Gestacional (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
DPN55						
LH	0,70 ± 0,42 a*§	0,89 ± 0,62 a	0,72 ± 0,63 a	0,72 ± 0,28 a	0,53 ± 0,37 a	0,48 ± 0,29 a
FSH	13,81 ± 4,96 ab	12,37 ± 2,34 ab	11,89 ± 3,46 ab	10,27 ± 1,49 a	11,88 ± 3,07 ab	16,61 ± 1,59 b
Testosterona	3,53 ± 2,11 a	4,25 ± 2,27 a	3,39 ± 1,16 a	3,96 ± 1,13 a	4,67 ± 1,54 a	3,22 ± 2,24 a
DPN90						
LH	0,71 ± 0,20 ab	0,52 ± 0,17 a	1,07 ± 0,45 b	0,71 ± 0,17 ab	0,93 ± 0,44 ab	0,75 ± 0,20 ab
FSH	6,68 ± 0,66 a	7,92 ± 2,07 ab	7,75 ± 2,57 ab	7,84 ± 2,09 ab	9,73 ± 1,84 ab	10,28 ± 2,97 b
Testosterona	4,38 ± 2,20 a	5,17 ± 2,33 a	6,55 ± 1,69 a	5,47 ± 3,21 a	4,97 ± 1,95 a	5,38 ± 0,70 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§ Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Avaliações Espermáticas (DPN90)

Morfologia dos Espermatozoides

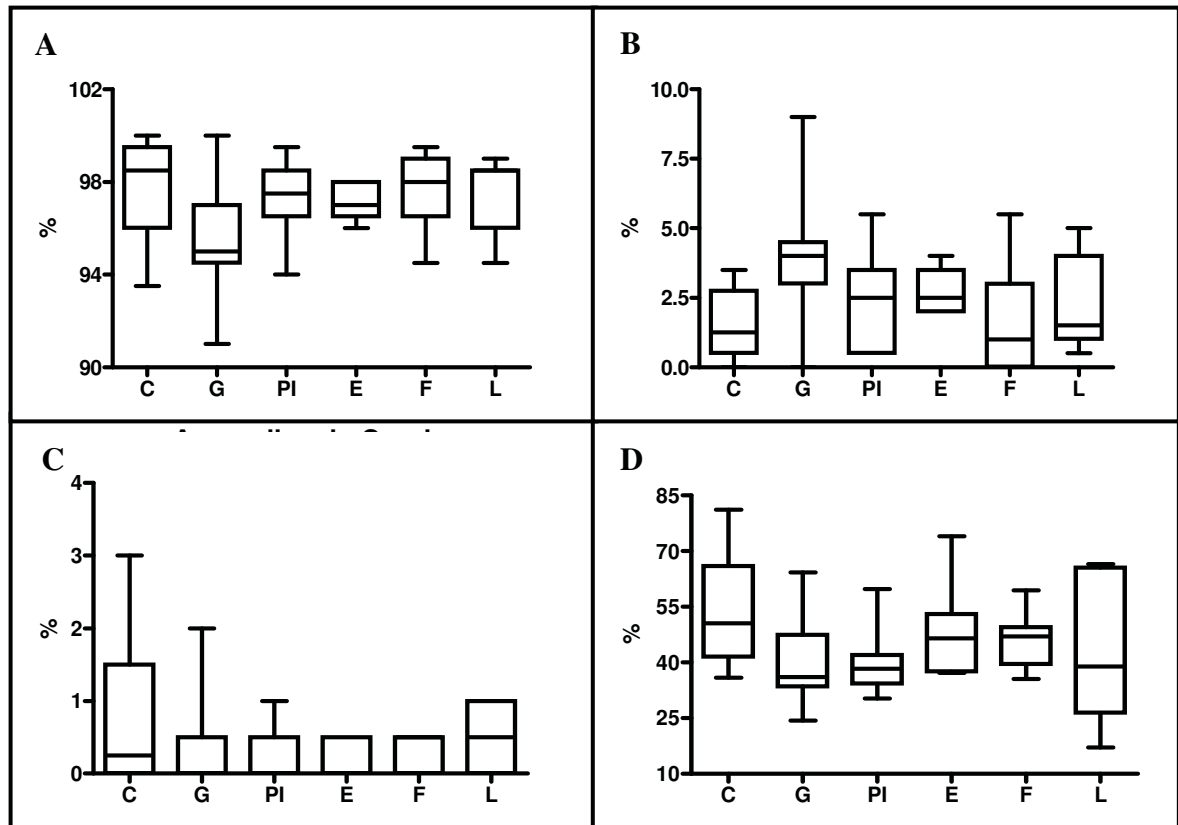


Figura 6 – Resultados de Morfologia espermática. Valores expressos como Mediana $\pm$ Desvio Interquartílico (Kruskal-Wallis). A – Frequência de espermatozoides normais, B – Frequência de anormalidades de cabeça, C – Frequência de anormalidades de flagelo, e D – Retenção da gota citoplasmática. C = Controle, G = Gestação, PI = Pré-implantação, E = Embrionário, F = Fetal, L = Lactação.

Tabela 8 – Morfologia espermática de ratos dos diferentes grupos experimentais aos 90 dias de idade.

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Espermatozoides normais (%)	98,5 ± 2,75 a*§	95,0 ± 1,75 a	97,5 ± 1,50 a	97,0 ± 1,00 a	98,0 ± 2,00 a	98,5 ± 1,50 a
Anomalias de cabeça (%)	1,25 ± 2,12 a	4,00 ± 1,25 a	2,50 ± 2,00 a	2,50 ± 1,25 a	1,00 ± 2,00 a	1,50 ± 1,75 a
Anomalias de cauda (%)	0,25 ± 1,00 a	0,00 ± 0,50 a	0,00 ± 0,25 a	0,00 ± 0,50 a	0,50 ± 0,50 a	0,05 ± 0,75 a
Retenção da gota citoplasmática (%)	50,5 ± 14,40 a	36,0 ± 10,15 a	38,3 ± 5,50 a	46,5 ± 9,95 a	47,0 ± 9,35 a	38,9 ± 20,45 a

*Valores expressos como Mediana ± Desvio interquartilico (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Motilidade dos Espermatozoides

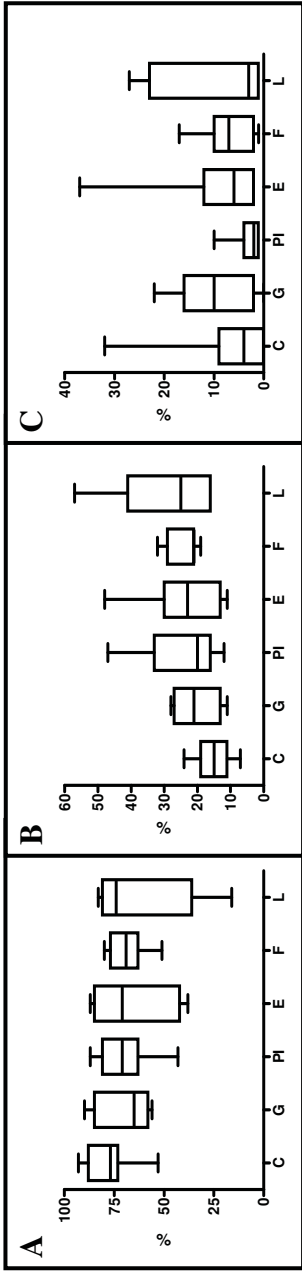


Figura 7 – Resultados de motilidade espermática. Valores expressos como Mediana ± Desvio Interquartilico (Kruskal-Wallis). A – Frequência de espermatozoides Tipo A, B – Frequência de espermatozoides Tipo B, C – Frequência de espermatozoides Tipo C. C=Controle, G=Gestação, PI=Pré-implantação, E=Embrionário, F=Fetal, L=Lactação.

Tabela 9 – Motilidade espermática de ratos dos diferentes grupos experimentais aos 90 dias de idade.

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Tipo A (%)	77 ± 9,5 a*§	65 ± 15,5 a	71 ± 14,5 a	71 ± 33,5 a	69 ± 11,5 a	74 ± 31,0 a
Tipo B (%)	15 ± 6,5 a	21 ± 9,5 a	20 ± 13,5 a	23 ± 13,0 a	21 ± 6,0 a	25 ± 15,5 a
Tipo C (%)	4 ± 6,5 a	10 ± 8,0 a	2 ± 2,5 a	6 ± 9,0 a	7 ± 7,0 a	3 ± 16,5 a

*Valores expressos como Mediana ± Desvio interquartilico (Kruskal-Wallis).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos (p<0,05).

Contagens de Espermatozoides no Testículo

Tabela 10 – Contagem de espermatozoides ($\times 10^6$) no testículo e produção diária de espermatozoides (PDE) ($\times 10^6$) de ratos aos 90 dias de idade.

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
Espermatozoides no testículo	202,95 $\pm$ 17,30 a*§	160,29 $\pm$ 27,52 b	178,31 $\pm$ 26,45 ab	184,94 $\pm$ 18,11 ab	184,41 $\pm$ 27,29 ab	152,14 $\pm$ 10,65 b
Espermatozoides por grama de testículo	156,37 $\pm$ 20,92 a	132,53 $\pm$ 24,12 a	134,56 $\pm$ 23,85 a	145,56 $\pm$ 15,44 a	147,69 $\pm$ 20,82 a	116,64 $\pm$ 47,20 a
PDE	33,27 $\pm$ 2,84 a	26,28 $\pm$ 4,51 b	29,23 $\pm$ 4,33 ab	30,32 $\pm$ 2,97 ab	30,23 $\pm$ 4,47 ab	24,94 $\pm$ 1,75 b
PDE por grama de testículo	25,63 $\pm$ 3,43 a	21,73 $\pm$ 3,96 a	21,20 $\pm$ 2,68 a	23,86 $\pm$ 2,53 a	24,21 $\pm$ 3,41 a	22,64 $\pm$ 3,09 a

*Valores expressos como Média $\pm$ Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

Contagens de Espermatozoides no Epidídimo

Tabela 11 – Contagem de espermatozoides ($\times 10^6$) e tempo de trânsito (Dias) nas diferentes porções do epidídimo de ratos aos 90 dias de idade nos diferentes grupos experimentais.

	Controle (n=7)	Gestação (n=7)	Pré-implantação (n=7)	Embrionário (n=7)	Fetal (n=7)	Lactação (n=7)
CABEÇA-CORPO						
Espermatozoides	112,75 ± 13,30 a*§	113,11 ± 21,2 a	111,00 ± 20,33 a	100,91 ± 22,85 a	99,13 ± 24,42 a	98,73 ± 24,03 a
Espermatozoides por grama de órgão	482,81 ± 129,76 a	599,82 ± 262,52 a	557,86 ± 207,23 a	505,00 ± 148,51 a	522,32 ± 209,07 a	615,54 ± 252,27 a
Tempo de trânsito	3,40 ± 0,43 a	4,35 ± 0,75 a	3,95 ± 0,64 a	3,34 ± 0,78 a	3,40 ± 0,94 a	3,95 ± 0,83 a
CAUDA						
Espermatozoides	192,08 ± 50,17 a	162,48 ± 31,54 a	210,03 ± 39,78 a	189,32 ± 42,10 a	222,54 ± 47,49 a	157,39 ± 35,19 a
Espermatozoides por grama de órgão	1111,87 ± 202,06 a	1313,57 ± 418,17 a	1231,79 ± 236,34 a	1340,00 ± 299,40 a	1371,79 ± 250,91 a	1421,43 ± 630,47 a
Tempo de trânsito	5,86 ± 1,83 a	6,20 ± 0,81 a	7,42 ± 2,38 a	6,35 ± 1,80 a	7,47 ± 1,93 a	6,28 ± 1,18 a

*Valores expressos como Média ± Desvio padrão (One-way ANOVA).

§Letras diferentes na linha indicam valores estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

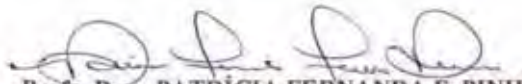
ANEXO V

Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **119-CEEA**, sobre "Desenvolvimento sexual da prole de ratas submetidas à restrição protéica em diferentes períodos da prenhez e lactação", sob a responsabilidade de **WILMA DE GRAVA KEMPINAS**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de **03/04/2009**.

Botucatu, 3 de abril de 2009.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Patrícia F. Pinheiro", is positioned above the printed name.

Profa. Dra. **PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO**
Presidente - CEEA