

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**CONSEQUÊNCIAS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA
SOBRE O COMPORTAMENTO PARENTAL E
MORFOFISIOLOGIA OVARIANA MATERNA**

LUISA ANNIBAL BARATA

LUIS ANTONIO JUSTULIN JR.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Barata, Luisa Annibal.

Consequências da restrição proteica materna sobre o comportamento parental e morfofisiologia ovariana materna / Luisa Annibal Barata. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Antonio Justulin Junior

Capes: 20600003

1. Comportamento Materno. 2. Desnutrição. 3. Dieta com restrição de proteínas. 4. Nutrição na gravidez.

Palavras-chave: Comportamento materno; Má nutrição; Vias esteroidogênicas ovarianas.

SUMÁRIO

1. Resumo	4
2. Introdução	5
2.1. Contextualização da problemática	5
2.2. Ovário e mecanismos morfofisiológicos	6
2.3. Restrição Proteica Materna: Impactos sistêmicos e comportamentais.....	8
3. Justificativa e relevância da temática	10
4. Objetivos.....	12
5. Metodologia.....	12
5.1. Animais e Procedimento experimental	12
5.2. Análise do comportamento materno	14
5.3. Análises morfológicas	15
5.4. Contagem e classificação de folículos ovarianos	15
5.5. Avaliação da Expressão por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RTq-PCR).....	15
5.6. Análises estatísticas	16
6. Resultados	16
7. Discussão	20
8. Conclusão	23
9. Referências Bibliográficas	23

1. RESUMO

O conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD) elucidada que a exposição a condições adversas durante a gestação e/ou lactação podem acarretar diversas problemáticas na prole, acometendo vários órgãos e sistemas. Nesse contexto, uma das adversidades que podem acometer as mães é dietética, sendo o modelo de restrição proteica materna (RPM) um importante modelo para compreensão dos mecanismos de desnutrição e modulações na prole. Assim, estudos experimentais já demonstraram que a RPM leva a alterações no sistema nervoso central e ao desequilíbrio de hormônios sintetizados e liberados pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, sendo esse essencial para a regulação pré e pós-natal por meio da secreção de hormônios esteroides. Além disso, mudanças nas vias esteroidogênicas afetam diretamente a responsividade materna ao filhote desde o início do comportamento parental, impactando também na adaptação das glândulas mamárias e no fornecimento adequado de leite. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos pré e pós-natal da RPM, com enfoque nas análises neonatais, comportamento parental materno e seus impactos sobre as vias esteroidogênicas ovarianas das mães. Para isso, ratas prenhas da linhagem *Sprague Dawley* foram divididas em 2 grupos: CTR, alimentadas com dieta normoproteica (17% de proteína) e GLLP, alimentadas com dieta hipoproteica (6% de proteína), durante gestação e lactação (CEUA Nº5119280121). Para análises morfológicas, morfométricas e neonatais, as mães foram eutanasiadas e seus ovários coletados no dia gestacional 20 (DG20). Também foi avaliado o comportamento materno durante o período de lactação e, ao final do mesmo, foram coletados os ovários dessas mães para análises moleculares. Os resultados demonstram que não houveram diferenças entre os grupos nos parâmetros de consumo alimentar, apesar do peso das mães do grupo GLLP se mostrar significativamente diminuído tanto na gestação como na lactação. A morfometria ovariana materna no DG20 demonstrou diminuição dos folículos primordiais e aumento dos folículos primários no grupo GLLP. Em relação às análises neonatais, observamos que o grupo GLLP apresenta maiores índices de reabsorção e diminuição no peso fetal no DG20. As análises durante o período lactacional indicaram uma diminuição significativa do comportamento parental materno no grupo GLLP. Ao final deste período, observamos que a expressão gênica de enzimas precursoras da via esteroidogênica ovariana materna apresentaram-se aumentadas no grupo GLLP, predizendo que variações nas concentrações de aromatase, por exemplo, durante a lactação, poderiam justificar o fornecimento não adequado de leite à prole. Portanto, os resultados demonstram que a RPM impacta na vida pré e pós-natal materno-fetal, afetando a morfofisiologia ovariana, vias esteroidogênicas e comportamento inicial das mães, o que resulta em consequências negativas na saúde e desenvolvimento da prole.

Palavras-chave: Má nutrição, Ovário, Gestação, Lactação, Comportamento materno.

2. INTRODUÇÃO

2.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA

O epidemiologista inglês David Barker foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar que a exposição a condições adversas durante o período gestacional está associada à maior incidência de doenças nos descendentes. Dentro dessa perspectiva, Ravelli e colaboradores estudaram filhos de mulheres que, durante a gravidez, foram expostas a um período de escassez alimentar durante o cerco alemão, contexto histórico conhecido como **inverno da fome holandesa** (1944-1945). Ambos demonstraram, portanto, que há um impacto negativo da desnutrição materna sobre a prole, e os efeitos poderiam variar dependendo do período gestacional em que o mesmo ocorre (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). Estas observações levaram à teoria conhecida como **Hipótese de Barker** (BARKER et al., 1993b), a qual estimulou o interesse médico-científico e fomentou a criação de uma sociedade denominada **Development Origins of Health and Disease (DOHaD)** (SCHULZ, 2010).

Nesse contexto, o conceito DOHaD engloba a perspectiva da **Programação Fetal (PF)**, a qual é caracterizada por exposição a condições estressoras durante os estágios do desenvolvimento intrauterino que podem afetar o indivíduo e impactar diretamente no fenótipo adulto (BARKER et al., 1993a, 1993b; DRAKE; WALKER, 2004; LUCAS; FEWTRELL; COLE, 1999). Um exemplo é a **Restrição Proteica Materna (RPM)**, condição que pode, seja durante gestação e/ou lactação, afetar diretamente a prole.

Arelado a essas investigações e englobando problemáticas sociais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) delimita que a má nutrição gestacional e lactacional caracteriza-se como grave problema de saúde pública, que tem correlação direta com a morbidade e mortalidade infantil. Os dados demonstram, pois, que 15 a 20% dos nascidos no mundo apresentam baixo peso ao nascer, totalizando aproximadamente 20 milhões de recém-nascidos nessa condição (KRASEVEC et al., 2022). Assim, efeitos adversos sobre ambiente intrauterino, tais como dietas pobres ou exacerbadas em macromoléculas ou aditivos dietéticos tendem a modular os níveis hormonais maternos, afetando diretamente a homeostasia do embrião/feto via placenta, podendo acarretar maior suscetibilidade a doenças cardiovasculares ao longo da vida (CHEN et al., 2018; DRAKE et al., 2012).

Em meio a esses cenários, a RPM atua como um estressor dietético, potencialmente ligado a desregulações sistêmicas de vários fatores, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (GRAZUL-BILSKA et al., 2009) devido à superexposição fetal de

glicocorticoides maternos (SILVEIRA et al., 2007). Além disso, outro eixo importantíssimo que pode ser afetado é o hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). Assim, os glicocorticoides atuam modulando o eixo HHG e se ligando a receptores específicos nas células ovarianas, desencadeando maiores índices de morte celular e alterações na via esteroidogênica, que podem impactar negativamente na fertilidade da prole (GERAGHTY; KAUFER, 2015; LIU et al., 1997).

Interessantemente, pesquisas epidemiológicas destacam que, somado ao ambiente dietético, os cuidados maternos representam um constituinte importante no início da vida e tem influência no desenvolvimento individual da prole, enfatizando a qualidade das interações mãe-filho nos padrões de comportamento (MASÍS-CALVO et al., 2013). Em ratos, as diferenças individuais no comportamento materno de lambidas e limpeza exercem uma regulação sobre o desenvolvimento fisiológico, morfológico, cognitivo e comportamental dos filhotes, sendo esses efeitos permanentes na idade adulta e, até mesmo, transmitidos às próximas gerações (FRANCIS et al., 2002; ZHANG et al., 2005). Ademais, variações no comportamento materno são capazes de causar efeitos significativos no eixo HHA (LIU et al., 1997; WEAVER et al., 2004).

2.2. OVÁRIO E MECANISMOS MORFOFISIOLÓGICOS

O ovário é uma glândula endócrina com propriedades biológicas que respondem a secreção cíclica hormonal de maneira altamente integrada e apresenta duas principais finalidades, a produção de hormônios esteroides sexuais e a produção de folículos (ADASHI, 1994; ZHOU; PENG; MEI, 2019). Sua estrutura é recoberta por epitélio germinativo, sob o qual encontra-se uma camada de tecido conjuntivo denso não modelado denominada túnica albugínea. Se encontram dispostos em pares dorsalmente na cavidade abdominal e possuem função endócrina e celular. Histologicamente, possuem uma porção externa e mais espessa denominada *cortéx*, o qual é preenchido por folículos ovarianos nos mais diversos estágios de desenvolvimento e por células auxiliares epiteliais, germinativas e células do estroma que atuam em sua nutrição e proteção, além de uma porção mais interna denominada medula, na qual se instalam os nervos e vasos sanguíneos (SILVERTHORN, 2017). Sua interação com hormônios reprodutivos e vias de retroalimentação constituem um dos sistemas de controle mais complexos do corpo humano (WEN et al., 2010).

A maturação sexual e a fertilidade feminina dependem da função ovariana adequada, que envolve a disponibilidade de folículos para oocitação (GUZMÁN et al., 2014; MCGEE;

HSUEH, 2000), regulada por hormônios esteroides, gonadotrofinas e fatores de crescimento. Em ratos, o desenvolvimento dos folículos começa na vida neonatal, com a formação das reservas de folículos primordiais, que são estimulados a crescer ciclicamente, e o estágio de desenvolvimento do oócito é indicado pela presença ou ausência de cavidade antral (HONDA et al., 2007), com a presença de folículos antrais bem desenvolvidos entre os dias 15-17 do período pós-natal (MCGEE et al., 1997, 1998). O objetivo da foliculogênese é nutrir e liberar o oócito maduro, cercado por células do *cumulus*, que está pronto para a fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário (HICKEY et al., 2005).

Adicionalmente, na produção de hormônios ovarianos, os níveis de estradiol antes da puberdade regulam a secreção pulsátil do hormônio luteinizante (LH). Ambas as gonadotrofinas LH e hormônio folículo estimulante (FSH), regulam a expressão de seus receptores associados à síntese de esteroides sexuais (SMITH; OJEDA, 1986). Assim, sob a ação do LH nas células da teca (CT), o colesterol circulante é captado, transportado para dentro da mitocôndria por meio da enzima StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese) e é convertido em pregnenolona, que posteriormente forma progesterona por meio da enzima 3 β -hidroxidesidrogenase (DRUMMOND, 2006; MIZRACHI; AUCHUS, 2009; VALDEZ et al., 2005). Após ser produzida, a progesterona poderá servir como substrato para a produção de outros andrógenos que penetram nas células da granulosa e são convertidos em estradiol pela enzima aromatase, a qual tem sua atividade estimulada pela atuação do FSH (DRUMMOND, 2006; STOCCO, 2008; YARAK et al., 2005).

Nos folículos antrais, os receptores de LH e FSH desempenham um papel fundamental no desenvolvimento ovariano pré-puberal (GUZMÁN et al., 2014). O FSH é essencial para a sobrevivência das células da granulosa e sua diferenciação (CHUN et al., 1996; HSUEH; BILLIG; TSAFRIRI, 1994; MCGEE et al., 1998), o qual permite a produção de estrógenos e a preparação dos folículos para a oocitação (HSUEH et al., 2000). Esse processo é regulado pelo eixo HHG, que responde à síntese e secreção do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH) (WEN et al., 2010). O GnRH estimula a produção de gonadotrofinas como o LH e o FSH pela hipófise, promovendo a esteroidogênese gonadal, e o controle desse sistema se dá por meio de *feedback* negativo (GERAGHTY; KAUFER, 2015).

O ciclo estral compreende um desses períodos, sendo ele acometido por mudanças fisiológicas, anatômicas e comportamentais. Em espécies de roedores, o ciclo estral é geralmente subdividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, que duram em média 4 a 5 dias, no qual o estro é a fase na qual os níveis circulantes de estradiol se

encontram mais altos, sendo esse, o período em que a fêmea se encontra receptiva ao acasalamento (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). Sendo assim, os aspectos reprodutivos apresentam diversos mecanismos que resultam na expressão do comportamento sexual e do cuidado parental (RUSSELL; DOUGLAS; INGRAM, 2001). Quaisquer modulações durante esses períodos, como parâmetros dietéticos, podem afetar diretamente o sucesso reprodutivo, e ainda, durante o período pós-fecundação como a gestação e a lactação, o ovário desempenha papéis cruciais na homeostasia, e efeitos adversos podem comprometer não só a fisiologia materna, mas também o desenvolvimento pré e pós natal da prole.

2.3. RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA: IMPACTOS SISTÊMICOS E COMPORTAMENTAIS

O DOHaD caracteriza-se como uma organização internacional que reúne diferentes áreas do conhecimento, possuindo interface entre as ciências biológicas e a área da saúde, com distintas abordagens científicas que incluem estudos epidemiológicos, clínicos, experimentais e translacionais (SILVEIRA et al., 2007). Assim, a programação pela dieta materna, sendo ela a restrição ou excesso de micronutrientes ou macronutrientes, já demonstra ter correlação com consequências fisiológicas e metabólicas amplamente relatadas na prole (HAY et al., 2016; VITHAYATHIL et al., 2018).

Já há evidências crescentes descrevendo forte associação entre exposições ambientais durante a gestação e a lactação, e o condicionamento biológico. Dessa forma, os efeitos da RPM são diversos, e englobam alterações em diversos mecanismos sistêmicos, tanto em modelo animal (MENENDEZ-CASTRO; RASCHER; HARTNER, 2018), quanto em humanos (CRISPI; MIRANDA; GRATACÓS, 2018). Especificamente, a literatura elucidada, em modelos experimentais, que a RPM afeta diversos níveis estruturais e órgão-específicos na prole, levando ao menor número de néfrons nos rins (HABIB; ZHANG; BAUM, 2011; RIZZI et al., 2017), afetando a fisiologia de filtração glomerular e diurese (SENE et al., 2018); quadros de hipertensão, cardiopatias, mudanças na morfologia e em vias moleculares cardíacas (ASSALIN; GONTIJO; BOER, 2019); alteração na microbiota intestinal (JIN et al., 2019; WANG et al., 2020); alteração na arquitetura hepática (BURNS et al., 1997); menor número de neurônios que controlam o apetite (GOULD et al., 2018; PLAGEMANN et al., 2000), acarretando problemáticas hormonais no eixo hipotalâmico-hipofisário e no centro da saciedade; e menor número de alvéolos pulmonares (ZANA-TAIEB et al., 2013), causando problemáticas na fisiologia respiratória e nos processos de hematose.

Assim, é bem estabelecido que o ambiente no início da vida desempenha um papel crucial na determinação da saúde ou doença da prole ao longo da biologia do desenvolvimento (GLUCKMAN et al., 2008), um fenômeno que se estende aos processos de diferenciação do sistema genital feminino (AIKEN; TARRY-ADKINS; OZANNE, 2016; WINSHIP et al., 2018). A literatura elucida que a prole de ratas submetidas à RPM apresentam prejuízos no desenvolvimento da reserva ovariana, aumento na apoptose das células da granulosa e de vacúolos nos oócitos (WINSHIP et al., 2018), impactos no padrão de produção de hormônios esteroides intraovarianos (GUZMÁN et al., 2014), além do atraso no desenvolvimento mamário (BAUTISTA et al., 2013). A Figura 02 resume os aspectos alterados pela RPM e as possíveis consequências sobre o ovário.

Somado a isso, o colesterol, molécula majoritariamente sintetizada no fígado, é o precursor de todos os hormônios esteroides incluindo os hormônios sexuais sintetizados pelo ovário. Todavia, o metabolismo lipídico e transporte de colesterol se apresentam alterados em modelos de RPM (CHENG et al., 2009; QASEM RANI J.; CHERALA GANESH; D'MELLO, 2010), causando esteatose e efeitos negativos sobre a estrutura hepática (REHFELDT et al., 2011; SOUZA-MELLO; MANDARIM-DE-LACERDA; AGUILA, 2007), impactando a síntese de hormônios esteroides.

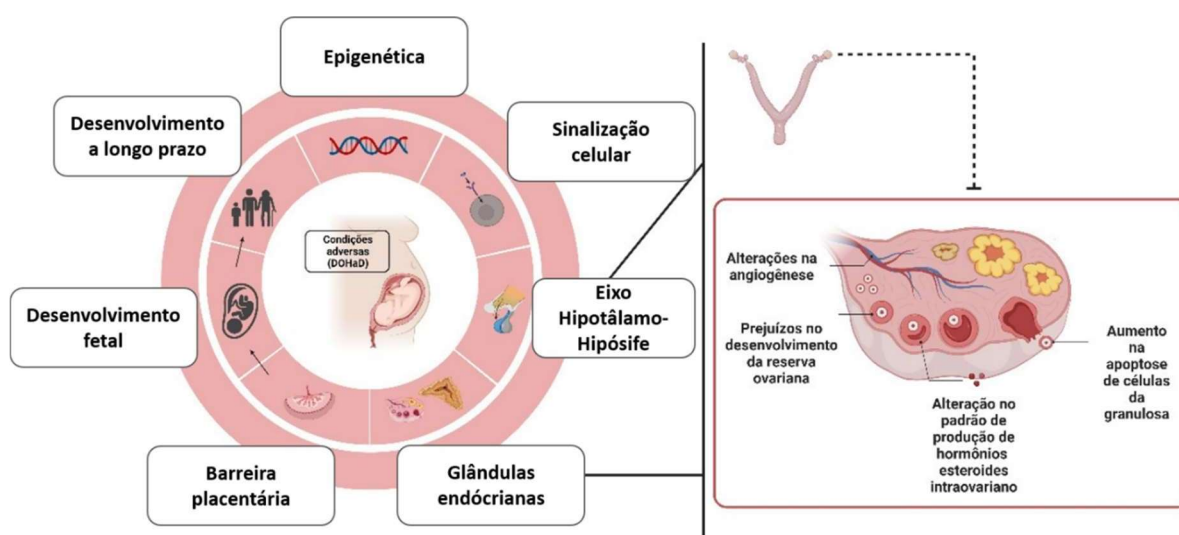


Figura 02. A figura remete a um ambiente intrauterino adverso que, contrastando com a programação fetal, abrange a plasticidade do desenvolvimento do conceito, no qual distúrbios durante as janelas de susceptibilidade como a gestação e a lactação tem a capacidade de alterar a estrutura e/ou função de células, além de impactar vias homeostáticas distintas, que refletem no desenvolvimento do sistema genital feminino, mais

especificamente no ovário, predizendo que tanto a mãe como a prole respondem às influências externas seguindo uma trajetória associada à vantagem adaptativa no útero. Adaptado de (JANSSON; POWELL, 2007).

Com base nesses dados, a RPM deturpa o sistema endócrino, desempenhando um papel crucial no estímulo ao início dos cuidados maternos (BRIDGES, 2015; DOERR; SIEGEL; ROSENBLATT, 1981). Em diversos mamíferos, incluindo ratos (BRIDGES, 1984), hormônios esteroides, estradiol (SIEGEL; ROSENBLATT, 1975), progesterona (DOERR; SIEGEL; ROSENBLATT, 1981; NUMAN, 1978), prolactina (BRIDGES et al., 1985) e ocitocina (FAHRBACH; MORRELL; PFAFF, 1984) são identificados obtendo papéis mais importantes na indução de cuidados maternos. Estes atuam em regiões cerebrais associadas à amamentação, lambidas, construção de ninho e recolhimento dos filhotes (BRIDGES, 2015b; NUMAN; BEHAVIOR; 2003, NUMAN; STOLZENBERG, 2009), sendo cruciais para o desenvolvimento da prole. Todavia, a RPM é um possível modulador do eixo hipotálamo-hipófise, afetando diretamente no ambiente sistêmico (BRIDGES, 2015) e interferindo na responsividade materna (GRATTAN et al., 2008).

Dentro do contexto comportamental materno, especialmente na fase inicial da lactação, estudos experimentais mostram que os filhotes não conseguem sintetizar metabólitos essenciais, dependendo do fornecimento pelo leite materno (LEVANT; OZIAS; CARLSON, 2006). Além disso, a produção máxima de leite está associada a mudanças no metabolismo materno, síntese de hormônios e adaptações fisiológicas que acompanham o crescimento e a maturação dos órgãos da prole (RAMOS-LOBO et al., 2018). Dessa forma, em condições ideais o leite materno é a forma fisiológica de nutrição neonatal. Todavia, a literatura engloba que a RPM impacta papéis bioquímicos maternos, afetando diretamente a composição, produção e mobilização dos estoques de leite, além de influenciar o comportamento de sucção do recém-nascido (BAUTISTA et al., 2019; CHERALA; SHAPIRO; D'MELLO, 2006), sendo insuficiente a entrega de nutrientes aos filhotes. Portanto, esses dados demonstram que a RPM afeta negativamente o *status* metabólico, a morfogênese e a homeostase de importantes órgãos e tecidos, sendo capaz de comprometer a capacidade e o sucesso reprodutivo.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DA TEMÁTICA

Do ponto de vista social, político e econômico, o número de pessoas afetadas pela fome ou que apresentam algum grau de insegurança alimentar/nutricional, à nível mundial, subiu para cerca de 828 milhões em 2021, segundo a edição de 2022 do relatório *The State of*

Food Security and Nutrition in the World (Unifec - Fundo das Nações Unidas para a Infância, 2022). Assim, levando em consideração a importância da boa alimentação materna, a fome, e o consumo de alimentos ultraprocessados e pouco nutritivos, bem como os conceitos de DOHaD, faz-se necessária uma investigação sistêmica acerca das consequências da má nutrição, visto que os impactos sobre a reprodução incluem efeitos sistêmicos no hipotálamo pela via de síntese e liberação de GnRH, na adeno-hipófise pela síntese e liberação de LH e FSH e hormônio de crescimento (GH), e nos ovários por meio da regulação do crescimento folicular e síntese de esteroides (DISKIN et al., 2003).

Nas fêmeas, o número de oócitos total é estabelecido antes do nascimento, uma vez que a reserva de folículos primordiais é definida durante a vida fetal (RHIND; RAE; NIGEL BROOKS, 2001), demonstrando que estressores dietéticos durante períodos críticos podem ter efeitos não só na primeira geração, mas de maneira transgeracional. Dessa forma, os critérios de qualidade dietética devem ser cruciais em todas as fases da gestação. Paralelamente ao desenvolvimento das gônadas e das células reprodutivas, ocorre a organogênese. Portanto, qualquer distúrbio no fornecimento de nutrientes pode comprometer a funcionalidade dos sistemas, inclusive o reprodutivo (FUNSTON; LARSON; VONNAHME, 2010).

Além disso, pesquisas demonstram que o desenvolvimento cerebral é sensível à programação gestacional, e moléculas como esteroides, seus receptores, fatores transcricionais e disponibilidade nutricional afetam a ontogênese neural de maneira permanente (MATSUMOTO, 1991; WELBERG; SECKL, 2001). Entre as estruturas neurais que são acometidas, demonstrou-se que o hipocampo é particularmente suscetível aos efeitos da programação por estressores emocionais e nutricionais (DARNAUDÉRY; MACCARI, 2008). Nesse contexto, sendo esta uma estrutura cerebral conhecida por estar relacionada ao comportamento emocional, quaisquer mudanças no ambiente nutricional intrauterino podem aumentar a incidência de transtornos mentais, disfunção de aprendizagem e memória, além de promover uma incidência significativa no menor desempenho cognitivo na idade adulta (GRIGOLETTI-LIMA et al., 2022; RONG et al., 2019), afetando a homeostasia materna e da prole.

Por fim, a compreensão das alterações morfofisiológicas nos ovários e suas principais vias pode ajudar no entendimento das alterações endócrinas, no comportamento materno e nas possíveis consequências para a prole. Essas delimitações também corroboram com observações prévias feitas pelo nosso grupo de pesquisa, das quais ratas submetidas a uma

condição de estresse crônico tendem a apresentar possíveis efeitos deletérios sobre o processo de implantação e maior propensão em reabsorver sua prole, caracterizando a importância do estudo em questão.

4. OBJETIVO

O **objetivo geral** do presente trabalho visa:

Avaliação dos efeitos pré e pós-natais da restrição proteica materna (RPM), com enfoque em parâmetros neonatais, comportamento parental e seus impactos sobre as vias esteroidogênicas ovarianas maternas.

5. METODOLOGIA

5.1. ANIMAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos da linhagem *Sprague Dawley*, machos e fêmeas (Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP). Os animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia, em caixas de polietileno (2 por caixa) com substrato de maravalha autoclavadas, em condições controladas de luminosidade (12 horas de fotoperíodo) e temperatura entre 22°C a 25°C, sendo fornecida água filtrada e ração ad libitum. Os procedimentos experimentais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu (CEUA N° 5119280121).

Após acasalamento e constatação da prenhez, as ratas foram colocadas em gaiolas individuais e alimentadas com ração padrão para ratos (grupo controle CTR, n=10, 17% de proteína) ou com ração hipoproteica (grupo restrição proteica materna RPM, n=10, 6% de proteína) conforme a Tabela 01. Uma parte das mães foi alimentada durante toda a gestação (DG20) e a outra parte, durante a gestação e lactação. Imediatamente após o nascimento foi padronizado o número de animais para 8 filhotes por rata (proporção entre machos e fêmeas de 1:1), até o dia pós-natal 21 (DPN21) ou dia do desmame, e durante esse período, as mães tiveram seu comportamento parental analisado.

Tabela 01: Composição das dietas normoproteica e hipoproteica.

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

A dieta hipoproteica foi preparada pela empresa PragSoluções (PragSoluções, SP, Brazil). Dieta foi suplementada com L-Cistina como aminoácido sulfúrico. Mistura de vitaminas e minerais foram formuladas pelo Instituto Americano de Nutrição AIN-93G recomendado para dieta de roedores (REEVES et al., 1993). Fosfato de Potássio, monobásico, foi adicionado à mistura de sais desta dieta para manter o fósforo nos níveis encontrados na dieta de caseína controle (3g/kg da dieta) e a relação de cálcio: a taxa de fósforo foi mantida em 1.3 em ambas as dietas.

Ao final do período experimental, as mães foram pesadas e anestesiadas tanto no dia gestacional 20 (DG20) como no DPN21, via intraperitoneal com o uso combinado de anestésico geral Ketamina na dose de 0,0075 mL/kg na concentração de 0,1g/ml e o relaxante muscular Xilazina com a dose de 0,0025 mL/kg e concentração de 0,02g/ml. Após a anestesia, foi realizada a ruptura dos vasos cervicais por decapitação com o uso de guilhotina para roedores e, em seguida, os ovários foram coletados e pesados para análises morfológicas e moleculares. Durante a gestação (DG20), uma parte dos ovários maternos foi fixada para análises histológicas e análises de índices de implantação. As mães mantidas até o DPN21 também tiveram os ovários coletados, os quais foram congelados em nitrogênio líquido a - 80°C para análises moleculares. O delineamento experimental está ilustrado na Figura 02.

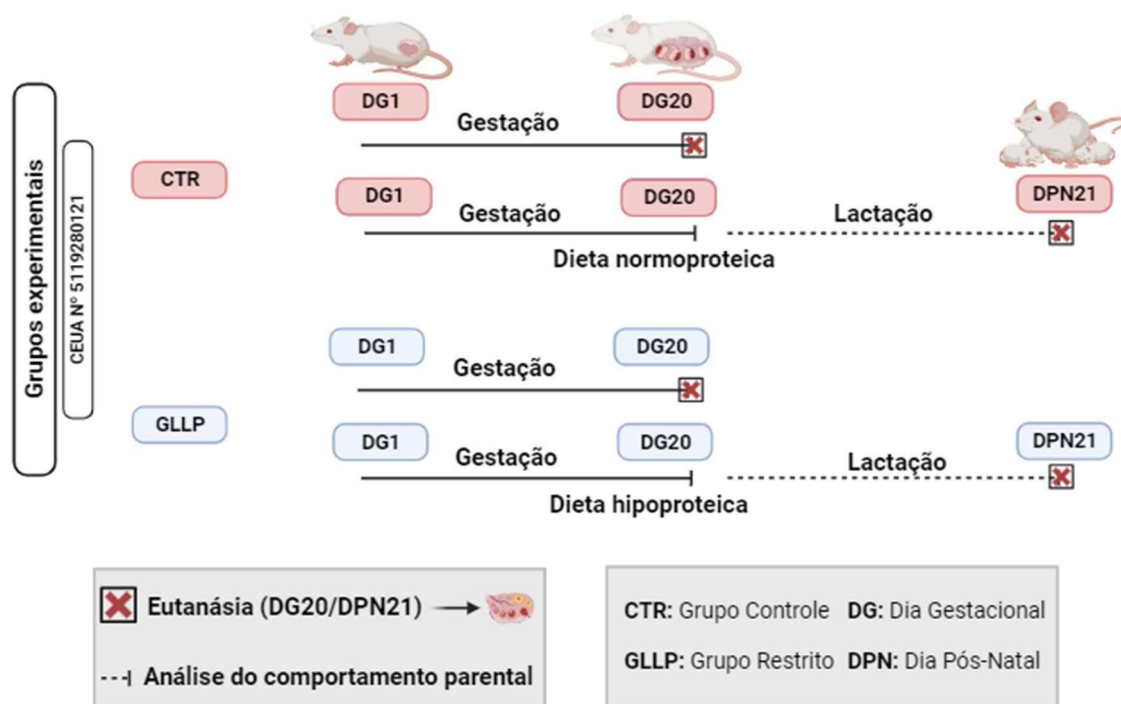


Figura 02. Delineamento experimental. Ratas prenhez no dia gestacional (DG) 1 foram separadas em dois grupos: Grupo Controle (CTR) que recebeu ração normoproteica (em rosa) e grupo Restrição Proteica Gestacional Lactacional (GLLP) que recebeu ração hipoproteica (em azul) durante a gestação e/ou lactação. As eutanásias aconteceram em dois momentos: DG20 e DPN21 (indicados com um X em vermelho), no qual no DG20 os ovários foram coletados para análises morfológicas e no DPN21, foram coletados para análises moleculares. Já a análise do comportamento parental aconteceu durante a lactação e foi representada com uma linha tracejada.

5.2. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO MATERNO

A avaliação do comportamento materno foi realizada diariamente desde o nascimento (DPN0) até o desmame (DPN21) (n=4 /grupo experimental). As observações foram feitas em dois momentos no dia: um no período diurno e outro ao final da tarde, e parâmetros comportamentais maternos como os descritos na tabela abaixo, foram observados. Para cada parâmetro (Tabela 02), foi dado um escore, e no momento da avaliação não houve qualquer tipo de manipulação na gaiola. O comportamento materno foi definido pela somatória dos escores diários (Modificado de SODERSTEN; ENEROTH, 1984).

Tabela 2: Parâmetros comportamentais observados e seus respectivos escores.

<u>Escore</u>	<u>Parâmetros observados</u>
0	Ausência de ninho
1	Presença de ninho
2	Todos os filhotes no ninho
3	Todos os filhotes no ninho com a mãe
4	Todos os filhotes no ninho, sendo amamentados com dorso arqueado
4.5	Todos os filhotes no ninho, sendo amamentados em posição passiva, de lado ou

5	supina Todos os filhotes no ninho, sendo amamentados e lambidos
---	--

5.3. ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Os ovários foram fixados em Methacarn (60% metanol + 30% clorofórmio + 10% ácido acético) por 4 horas (PUCHTLER et al., 1970). Após a fixação, o material passou pelo processo de desidratação em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast (Sigma). Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo com 5 µm de espessura, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento do uso. Para as análises morfológicas e de contagem e classificação dos folículos ovarianos (MYERS et al., 2004), n=4 animais por grupo experimental, os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (H&E), em seguida as lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional LeicaDM2500 (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), acoplada à câmera digital e software de análise de imagem (Leica Qwin.V3).

5.4. CONTAGEM E CLASSIFICAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS

A contagem e classificação folicular foi dada segundo a descrição prévia de (MYERS et al., 2004). Os folículos primordiais foram caracterizados pela presença de uma única camada de células foliculares pavimentosas envolvendo o oócito. Já os primários, uma única camada de células foliculares cuboides em torno do oócito. Folículos foram classificados como em crescimento quando apresentarem de 2-4 camadas de células na camada granulosa, enquanto folículos antrais (ou de *Graaf*) foram caracterizados quando apresentavam 3 ou mais camadas de células na camada granulosa, corona radiata, *cumulus oophorus* e espaço antral definidos. Por fim, os folículos atresícos foram caracterizados pela presença de células da granulosa desorganizadas e picnóticas (apoptose) e por apresentarem oócito em degeneração. Foram feitas medidas de área dos ovários (em mm²) e os resultados foram expressos em número total de folículos divididos pela área ovariana (mm²).

5.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-QPCR)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (BUSTIN et al., 2009).

A extração de RNA total das amostras, n=5 animais por grupo experimental, foi realizada seguindo o protocolo do TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, USA). A quantificação e pureza do material foi verificada pelo espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE HealthCare, EUA), e a integridade do RNA foi verificada pela obtenção do número da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN). Após esta etapa, foi realizado o tratamento do RNA com DNase, conforme as instruções do protocolo DNase I–Amplification Grade (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), e em seguida a reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o High Capacity cDNA Archive kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificação do fabricante.

Os primers para os genes analisados foram desenhados através do software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com), e sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, na plataforma QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Ct comparativo (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando o Data Assist 2.0 (Life Technologies). Foi avaliada a expressão dos genes: STAR, Aromatase, 3βHSD, RNAs mensageiros traduzidos em enzimas que participam da esteroidogênese.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados estatísticos foi utilizado o teste de normalidade por Shapiro Wilk, com posterior análise estatística Teste “*T de Student*”, se paramétrico, e Mann-Whitney, para não paramétrico, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Por fim, as demais análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism*® (versão 5.0, Graph Pad, Inc., San Diego, CA).

6. RESULTADOS

Parâmetros de consumo alimentar analisados durante a gestação e a lactação indicam que não houve diferenças significativas nas quantidades de ração ingeridas entre os grupos CTR e GLLP (Figura 03 A e B). Já dados biométricos maternos como peso gestacional e lactacional demonstram que as mães submetidas à RPM têm menor propensão em ganhar

massa corporal em ambos os períodos (Figura 03 C e D). De modo geral, o grupo GLLP apresentou ganho de peso gestacional significativamente menor do que o grupo CTR, enquanto na lactação o mesmo grupo apresentou perda de peso significativa, quando comparado ao grupo CTR.

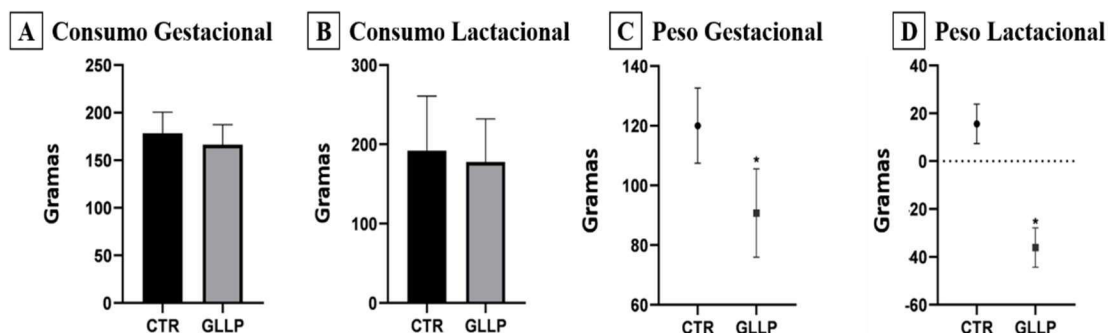


Figura 03. Dados de consumo e peso das mães na gestação e na lactação. Gráfico representativo do consumo alimentar materno na gestação (A) e na lactação (B), sem diferenças significativas entre os grupos e gráfico representativo do ganho de massa na gestação (C) e na lactação (D). Diferença significativa na diminuição do peso gestacional e lactacional (C e D) dos animais do grupo GLLP. Os dados são expressos como média $\pm$ DP. * Diferença estatística entre grupos experimentais com $p < 0.05$

Em relação aos parâmetros biométricos do ovário das mães no DG20, não obtivemos diferenças significativas no peso do órgão entre os grupos CTR e GLLP. Entretanto, a morfometria ovariana indicou diminuição significativa no número de folículos primordiais e um aumento significativo de folículos primários no grupo GLLP, quando comparado ao grupo CTR (Figura 04).

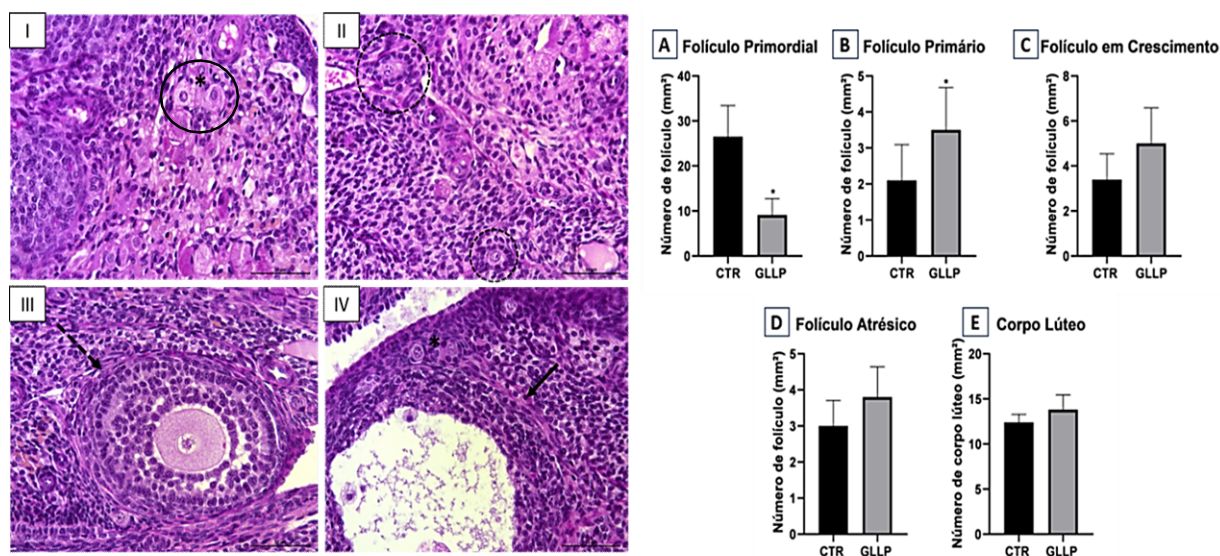


Figura 04. Fotomicrografias, em aumento de 40x, de cortes histológicos corados com HE representando os folículos ovarianos e morfometria por contagem folicular/área (mm²) das mães no DG20. Imagem representativa dos folículos primordiais (I), primário (II), de crescimento (III), atresico (IV). A morfometria apresentou

diminuição significativa no número de folículos primordiais do grupo GLLP (A), aumento significativo dos folículos primários (B) e não apresentou diferenças significativas no número de folículos em crescimento (C), atresícos (D) e corpo lúteo (E). Os dados são expressos como média $\pm$ DP. * Diferença estatística entre grupos experimentais com $p < 0.05$.

Atrelado às análises do DG20, parâmetros neonatais como pontos de reabsorção e peso fetal também foram mensurados e indicaram que as mães do grupo GLLP apresentaram maiores índices de reabsorver sua prole quando comparado ao grupo CTR, além de apresentarem parâmetros biométricos fetais indicando que há uma diminuição significativa do seu peso no grupo GLLP. Os dados neonatais estão representados na tabela abaixo (Tabela 03).

Tabela 03: Parâmetros neonatais representativos que foram observados.

Grupos experimentais	Pontos de reabsorção	Peso fetal (g)
GLLP	4 pontos ^a	2,911 (g) ^a
CTR	1 ponto ^b	4,216 (g) ^b

Em relação às análises maternas desenvolvidas durante o período de lactação, o comportamento materno indicou uma diminuição significativa no grupo GLLP da somatória dos escores que definem o cuidado parental dessas mães (Figura 05).

Comportamento materno

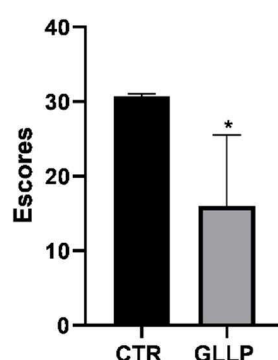


Figura 05. Parâmetros comportamentais maternos. Imagem representativa da somatória dos escores que definem o comportamento parental das mães e indicam uma diminuição significativa da pontuação no grupo GLLP. Os dados são expressos como média $\pm$ DP. * Diferença estatística entre grupos experimentais com $p < 0.05$.

Ao final da lactação, as análises de expressão gênica para enzimas envolvidas na esteroidogênese ovariana materna indicaram que houve aumento significativo da enzima aromatase no grupo GLLP, enquanto a STAR e a 3 β HSD não demonstraram diferenças entre os grupos (Figura 06).

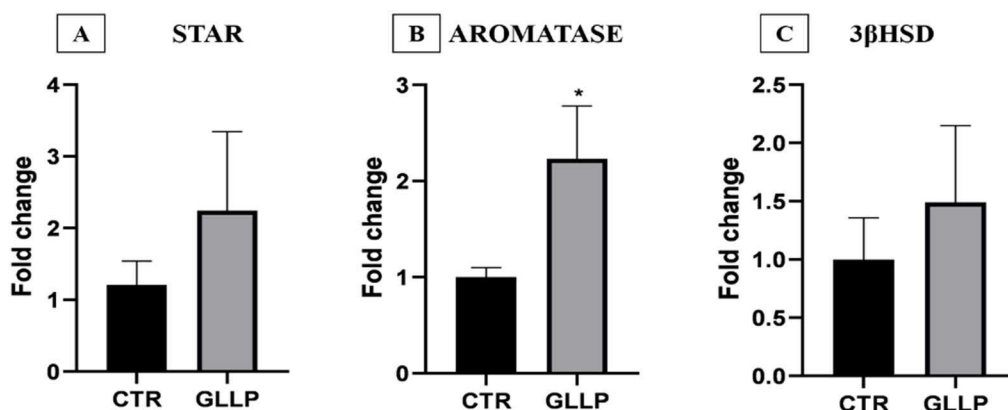


Figura 06. Imagem representativa da expressão gênica (PCR) de alvos relacionados a via esteroidogênica ovariana materna. Os dados demonstram um aumento significativo da Aromatase (B) no grupo GLLP, quando comparado ao grupo CTR. Os demais alvos STAR (A) e 3 β HSD (C) não demonstraram diferenças entre os grupos. Os dados são expressos como média $\pm$ DP. * Diferença estatística entre grupos experimentais com $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

Desafios nutricionais como a RPM, principalmente durante o períodogestacional e lactacional, têm sido associados a impactos no desenvolvimento materno, bem como o desenvolvimento pré e pós-natal da prole. Atrelado a isso, a programação da função reprodutiva também demonstra adversidades quando exposta a um ambiente subótimo, visto que a RPM altera componentes-chave da via esteroidogênica materna (GUZMÁN et al., 2014; LÉONHARDT et al., 2003; ZAMBRANO et al., 2005), levando a um atraso da puberdade, ciclos estrais, e nas taxas de fertilidade (GUNN; SIM; HUNTER, 1995), diminuindo a longevidade reprodutiva (GUZMÁN et al., 2006). Assim, a avaliação da função ovariana tanto na gestação como na lactação, fornece indicadores da programação pré-natal bem como alterações nas vias de esteroides maternas que se tornam indicativos de modulações no comportamento das mães e no fornecimento de um ambiente adequado à prole.

Resultados obtidos relacionados aos parâmetros biométricos maternos confirmam os prejuízos causados pela RPM, visto que a alimentação e a queda drástica no ganho de peso do grupo GLLP em ambos os períodos sugere uma possível adaptação para manter os aportes

energéticos suficientes, apesar da falta de proteínas. As mães submetidas à RPM provavelmente mobilizam parte dos seus estoques através de mecanismos secundários como a proteólise muscular (AGNOUX et al., 2015; PINE; JESSOP; OLDHAM, 1994) ou albumina circulante (SUNEHAG; HAYMOND, 2003), a fim de sustentar as demandas fisiológicas associadas à gestação e subsequente lactação.

Além disso, tanto a literatura quanto dados do nosso grupo elucidam que determinados parâmetros só são significativamente modulados quando a restrição acontece na gestação e lactação. Portanto, dados relacionados ao peso total do ovário no DG20 não demonstraram diferenças entre os grupos. Entretanto, ao realizar a morfometria, os animais do grupo GLLP apresentaram alterações no número dos folículos, podendo predizer uma possível modulação na secreção de LH e FSH. Sabe-se que o LH é produzido em níveis consistentes durante a fase folicular, estimulando a esteroidogênese e a formação do corpo lúteo (SMITZ; PLATTEAU, 2020). Todavia, quando há aumento em seus níveis por mecanismos de *feedback* devido ao aumento de estradiol secretado por folículos maduros, há estímulo para a formação de corpo lúteo e síntese precoce de progesterona (REED; CARR, 2018).

Nossos resultados demonstram um aumento no número de folículos em fase de maturação, evidenciando uma possível hipersecreção de LH durante a gestação, corroborando com uma possível desregulação no eixo HHG. Este, segundo a literatura, é modulado diante de um ambiente estressado (GUZMÁN et al., 2014), além de apresentar uma demanda hormonal desnecessária durante essa janela, o que deveria ser direcionada para a manutenção da gravidez e crescimento fetal (COLE, 2010; SMITZ; PLATTEAU, 2020).

Ainda nesse sentido, já é descrito que a qualidade do folículo está diretamente ligada com a qualidade da ninhada. Nossos resultados revelam que as mães submetidas à RPM apresentam maior número de pontos de reabsorção, corroborando com descritos na literatura que evidenciam que tanto a proteína quanto a energia da dieta desempenham papel essencial na regulação da sobrevivência embrionária/fetal, já que a mesma tem potencial de modular o ambiente intrauterino acarretando em efeitos negativos no endométrio, dificultando uma implantação bem sucedida (ZHAO et al., 2022). Ademais, nossos resultados relacionados aos parâmetros biométricos fetais indicam que a prole das mães do grupo GLLP apresentam menor peso no DG20, assim como estudos de Côrtes et al., 2021 (CÔRTEZ et al., 2021), corroborando com os resultados da baixa eficiência alimentar com consequente perda de peso por essas mães, enfatizando o subdesenvolvimento da prole do grupo restrito.

Assim, foi demonstrado que um ambiente nutricional prejudicial durante a vida fetal e no início da vida pós-natal pode impactar a saúde a longo prazo (WATERLAND; GARZA, 1999).

Esse mesmo ambiente tem potencial de modular composição e fornecimento do leite materno pois o mesmo contém fatores bioativos (HAMOSH, 2001; LONNERDAL et al., 1976) que são considerados determinantes para o desenvolvimento saudável. Durante a gravidez, os estrógenos e a progesterona materna desempenham papéis importantes no desenvolvimento das glândulas mamárias (KUIJPER et al., 2013), sendo os estrógenos responsáveis pela estimulação da secreção de prolactina, enquanto a progesterona induz a maturação da mama (CONNELLY; MULAC-JERICEVIC; ARNETT-MANSFIELD, 2007). Entretanto, a concentração desses hormônios deve cair imediatamente após o nascimento (NEVILLE; MCFADDEN; FORSYTH, 2002). Observamos que houve um aumento significativo na expressão gênica da enzima aromatase nas mães do grupo GLLP. A aromatase é uma das enzimas responsáveis pela transformação de andrógenos em estrógenos e seu aumento pode ser indicativo uma possível desregulação hormonal no período lactacional, visto que o aumento da mesma acarreta em um aumento da síntese de progesterona, o qual já é descrito que inibe a ejeção do leite.

Ainda assim, mães sob condição de RPM possivelmente mobilizam seus estoques para demandas secundárias como a manutenção nutricional do leite, provavelmente pelo aumento no teor de ácidos graxos na sua composição, provenientes da lipogênese da glândula mamária durante a lactação (RUDOLPH et al., 2007; VERNON, 2005). Porém, isso pode acarretar em um aumento na mobilização de ácidos graxos do tecido hepático, configurando a essas mães um fenótipo de fígado esteatótico. Ainda assim, dados do nosso grupo revelam que a diminuição significativa no peso da prole perpetua até o final da lactação, apoiando os achados sobre o possível fornecimento e composição não adequada de leite.

Além das influências sistêmicas, a deficiência nutricional causada pela RPM afeta também o estado físico e mental das mães, impactando na sua resposta parental. Essa condição leva ao estresse e ao desequilíbrio hormonal, além de ter efeitos diretos no desenvolvimento neural tanto das mães como dos filhotes (DARNAUDÉRY; MACCARI, 2008; MATSUMOTO, 1991). O cuidado parental consiste em múltiplos comportamentos específicos da espécie como preparação, construção de ninhos, alimentação (incluindo amamentação) e defesa dos filhotes (KOHL; AUTRY; DULAC, 2017). Associados, eles aumentam a probabilidade de sobrevivência da prole, bem como seu desenvolvimento mental e físico ideal (NUMAN; INSEL, 2006). Nossos resultados indicam que, apesar dos dois grupos apresentarem comportamentos de presença de ninho, as mães do grupo GLLP tendem a selecionar alguns filhotes além de, na maioria das vezes, não apresentarem cuidados como amamentação, lambidas e proteção da prole de maneira crônica. Englobando esses resultados e a literatura, pode-se dizer que há uma estreita correlação entre a nutrição materna, o comportamento parental, a composição do leite e as alterações

morfofisiológicas e biométricas encontradas na prole.

8. CONCLUSÃO

Portanto, a RPM afeta parâmetros ovarianos associados à sua morfofisiologia, alterando o número de folículos e impactando na reserva folicular materna bem como das gerações seguintes, além de afetar diretamente os processos de implantação, aumentando os índices de reabsorção. Além disso, impacta nas vias esteroidogênicas e no comportamento materno inicial, interferindo tanto no desenvolvimento pós-natal da prole bem como no seu desenvolvimento ao longo da vida.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 9, n. 5, p. 815–827, 1994.
- AGNOUX, A. M. et al. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 7, p. 784–795, 2015.
- AIKEN, C. E.; TARRY-ADKINS, J. L.; OZANNE, S. E. Transgenerational effects of maternal diet on metabolic and reproductive ageing. **Mammalian Genome**, v. 27, n. 7–8, p. 430, 1 ago. 2016.
- ASSALIN, H. B.; GONTIJO, J. A. R.; BOER, P. A. miRNAs, target genes expression and morphological analysis on the heart in gestational protein-restricted offspring. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019.
- BARKER, D. J. P. et al. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. **BMJ : British Medical Journal**, v. 306, n. 6875, p. 422, 2 fev. 1993a.
- BARKER, D. J. P. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet (London, England)**, v. 341, n. 8850, p. 938–941, 10 abr. 1993b.
- BAUTISTA, C. J. et al. Protein restriction in the rat negatively impacts long-chain polyunsaturated fatty acid composition and mammary gland development at the end of gestation. **Archives of medical research**, v. 44, n. 6, p. 429–436, ago. 2013.
- BAUTISTA, C. J. et al. Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. **The British journal of nutrition**, v. 122, n. 2, p. 141–151, 28 jul. 2019.
- BRIDGES, R. S. A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. **Endocrinology**, v. 114, n. 3, p. 930–940, 1984.
- BRIDGES, R. S. et al. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4688, p. 782–784, 1985.
- BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Frontiers in neuroendocrinology**, v.

36, p. 178–196, 1 jan. 2015a.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine Regulation of Maternal Behavior. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 0, p. 178, 1 jan. 2015b.

BURNS, S. P. et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 7, p. 1768–1774, 1 out. 1997.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CHEN, G. et al. IGF1/MAPK/ERK signaling pathway-mediated programming alterations of adrenal cortex cell proliferation by prenatal caffeine exposure in male offspring rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 341, p. 64–76, 15 fev. 2018.

CHENG, J. et al. Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. **Histochemistry and cell biology**, v. 132, n. 3, p. 281–291, set. 2009.

CHERALA, G.; SHAPIRO, B. H.; D'MELLO, A. P. Two low protein diets differentially affect food consumption and reproductive performance in pregnant and lactating rats and long-term growth in their offspring. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 11, p. 2827–2833, 2006.

CHUN, S. Y. et al. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1447–1456, 1996.

COLE, L. A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 8, 24 ago. 2010.

CONNELLY, O. M.; MULAC-JERICEVIC, B.; ARNETT-MANSFIELD, R. Progesterone signaling in mammary gland development. **Ernst Schering Foundation symposium proceedings**, n. 1, p. 45–54, 2007.

CÔRTEZ, L. S. et al. Maternal protein restriction impairs nutrition and ovarian histomorphometry without changing p38MAPK and PI3K-AKT-mTOR signaling in adult rat ovaries. **Life sciences**, v. 264, 1 jan. 2021.

CRISPI, F.; MIRANDA, J.; GRATACÓS, E. Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 218, n. 2S, p. S869–S879, 1 fev. 2018.

DARNAUDÉRY, M.; MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain research reviews**, v. 57, n. 2, p. 571–585, 14 mar. 2008.

DISKIN, M. G. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 345–370, 15 out. 2003.

DOERR, H. K.; SIEGEL, H. I.; ROSENBLATT, J. S. Effects of progesterone withdrawal and estrogen on maternal behavior in nulliparous rats. **Behavioral and neural biology**, v. 32, n. 1, p. 35–44, 1981.

DRAKE, A. J. et al. An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth. **Clinical endocrinology**, v. 77, n. 6, p. 808–815, dez. 2012.

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. **The Journal of**

endocrinology, v. 180, n. 1, p. 1–16, jan. 2004.

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 16, 10 abr. 2006.

FAHRBACH, S. E.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Oxytocin induction of short-latency maternal behavior in nulliparous, estrogen-primed female rats. **Hormones and behavior**, v. 18, n. 3, p. 267–286, 1984.

FRANCIS, D. D. et al. Environmental Enrichment Reverses the Effects of Maternal Separation on Stress Reactivity. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 18, p. 7840, 9 set. 2002.

FUNSTON, R. N.; LARSON, D. M.; VONNAHME, K. A. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: implications for beef cattle production. **Journal of animal science**, v. 88, n. 13 Suppl, 2010.

GERAGHTY, A. C.; KAUFER, D. Glucocorticoid Regulation of Reproduction. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 872, p. 253–278, 2015.

GLUCKMAN, P. D. et al. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 1, p. 61–73, 3 jul. 2008.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, abr. 2007.

GOULD, J. M. et al. Mouse maternal protein restriction during preimplantation alone permanently alters brain neuron proportion and adult short-term memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 31, p. E7398–E7407, 31 jul. 2018.

GRATTAN, D. R. et al. Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 4, p. 497–507, abr. 2008.

GRAZUL-BILSKA, A. T. et al. Cellular proliferation and vascularization in ovine fetal ovaries: effects of undernutrition and selenium in maternal diet. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 137, n. 4, p. 699–707, 2009.

GRIGOLETTI-LIMA, G. B. et al. Severe Gestational Low-Protein Intake Impacts Hippocampal Cellularity, Tau, and Amyloid- β Levels, and Memory Performance in Male Adult Offspring: An Alzheimer-Simile Disease Model? **Journal of Alzheimer's disease reports**, v. 6, n. 1, p. 17–30, 2022.

GUNN, R. G.; SIM, D. A.; 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. **Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 223–230, 1995.

GUZMÁN, C. et al. 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, n. Pt 1, p. 97–108, abr. 2006.

GUZMÁN, C. et al. Maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation negatively affects follicular ovarian development and steroidogenesis in the prepubertal rat offspring. **Archives of medical research**, v. 45, n. 4, p. 294–300, 2014.

HABIB, S.; ZHANG, Q.; BAUM, M. Prenatal programming of hypertension in the rat: effect of postnatal rearing. **Nephron extra**, v. 1, n. 1, p. 157–165, 25 out. 2011.

- HAMOSH, M. Bioactive Factors in Human Milk. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 69–86, 1 fev. 2001.
- HAY, S. M. et al. The effect of iron deficiency on the temporal changes in the expression of genes associated with fat metabolism in the pregnant rat. **Physiological reports**, v. 4, n. 21, 1 nov. 2016.
- HICKEY, T. E. et al. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 4, p. 825–832, out. 2005.
- HONDA, A. et al. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 30, p. 12389, 7 jul. 2007.
- HSUEH, A. J. W. et al. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 163, n. 1–2, p. 95–100, 25 maio 2000.
- HSUEH, A. J. W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine reviews**, v. 15, n. 6, p. 707–724, 1994.
- JANSSON, T.; POWELL, T. L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 113, n. 1, p. 1–13, jul. 2007.
- JIN, J. et al. Effects of Maternal Low-Protein Diet on Microbiota Structure and Function in the Jejunum of Huzhu Bamei Suckling Piglets. **Animals : an Open Access Journal from MDPI**, v. 9, n. 10, p. 713, 1 out. 2019.
- KOHL, J.; AUTRY, A. E.; DULAC, C. The neurobiology of parenting: A neural circuit perspective. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 39, n. 1, p. 1, 1 jan. 2017.
- KRASEVEC, J. et al. Study protocol for UNICEF and WHO estimates of global, regional, and national low birthweight prevalence for 2000 to 2020. **Gates Open Research**, v. 6, 2022.
- KUIJPER, E. A. M. et al. Reproductive hormone concentrations in pregnancy and neonates: a systematic review. **Reproductive biomedicine online**, v. 27, n. 1, p. 33–63, jul. 2013.
- LÉONHARDT, M. et al. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 2, p. 390–400, 1 fev. 2003.
- LEVANT, B.; OZIAS, M. K.; CARLSON, S. E. Diet (n-3) polyunsaturated fatty acid content and parity interact to alter maternal rat brain phospholipid fatty acid composition. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 8, p. 2236–2242, 2006.
- LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5332, p. 1659–1662, 12 set. 1997.
- LONNERDAL, B. et al. Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers. II. Lactose, nitrogen, and protein contents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 29, n. 10, p. 1134–1141, 1 out. 1976.
- LUCAS, A.; FEWTRELL, M. S.; COLE, T. J. Fetal origins of adult disease—the hypothesis revisited. **BMJ : British Medical Journal**, v. 319, n. 7204, p. 245, 7 jul. 1999.

- MASÍ-S-CALVO, M. et al. Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. **Physiology & behavior**, v. 118, p. 212–217, 3 jun. 2013.
- MATSUMOTO, A. Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 16, n. 1–3, p. 25–40, 1991.
- MCGEE, E. A. et al. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 5, p. 990–998, nov. 1997.
- MCGEE, E. A. et al. Cell death and survival during ovarian follicle development. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 140, n. 1–2, p. 15–18, 25 maio 1998.
- MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 2, p. 200–214, 1 abr. 2000.
- MENENDEZ-CASTRO, C.; RASCHER, W.; HARTNER, A. Intrauterine growth restriction - impact on cardiovascular diseases later in life. **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 5, n. 1, dez. 2018.
- MIZRACHI, D.; AUCHUS, R. J. Androgens, estrogens, and hydroxysteroid dehydrogenases. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 301, n. 1–2, p. 37–42, 25 mar. 2009.
- MYERS, M. et al. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 127, n. 5, p. 569–580, 2004.
- NEVILLE, M. C.; MCFADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 1, p. 49–66, jan. 2002.
- NUMAN, M. Progesterone inhibition of maternal behavior in the rat. **Hormones and behavior**, v. 11, n. 2, p. 209–231, 1978.
- NUMAN, M.; BEHAVIOR, T. I.-T. NEUROBIOLOGY OF PARENTAL; 2003, UNDEFINED. Hormonal and nonhormonal basis of maternal behavior. **SpringerM Numan, TR InselThe neurobiology of parental behavior, 2003•Springer**, [s.d.].
- NUMAN, M.; INSEL, T. The neurobiology of parental behavior. 2006.
- NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 46–64, jan. 2009.
- PINE, A. P.; JESSOP, N. S.; OLDHAM, J. D. Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats. **The British journal of nutrition**, v. 71, n. 1, p. 13–27, jan. 1994.
- PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2582–2589, 2000.
- QASEM RANI J., R. J.; CHERALA GANESH, G.; D'MELLO, A. P. Maternal protein restriction during pregnancy and lactation in rats imprints long-term reduction in hepatic lipid content selectively in the male offspring. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 30, n. 6, p. 410–417, 2010.
- RAMOS-LOBO, A. M. et al. Maternal metabolic adaptations are necessary for normal offspring growth and brain development. **Physiological reports**, v. 6, n. 5, 1 mar. 2018.
- REED, B. G.; CARR, B. R. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. **Endotext**, 5 ago. 2018.

- REHFELDT, C. et al. Limited and excess dietary protein during gestation affects growth and compositional traits in gilts and impairs offspring fetal growth. **Journal of animal science**, v. 89, n. 2, p. 329–341, fev. 2011.
- RHIND, S. M.; RAE, M. T.; NIGEL BROOKS, A. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 122, n. 2, p. 205–214, 2001.
- RIZZI, V. H. G. et al. Impact of long-term high-fat diet intake gestational protein-restricted offspring on kidney morphology and function. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 8, n. 1, p. 89–100, 1 fev. 2017.
- RONG, H. et al. Early-Life Exposure to the Chinese Famine and Risk of Cognitive Decline. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 4, 1 abr. 2019.
- RUDOLPH, M. C. et al. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. **Physiological genomics**, v. 28, n. 3, p. 323–336, 12 fev. 2007.
- RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; INGRAM, C. D. Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. **Progress in brain research**, v. 133, p. 1–38, 2001.
- SCHULZ, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16757–16758, 28 set. 2010.
- SENE, L. B. et al. Gestational low-protein intake enhances whole-kidney miR-192 and miR-200 family expression and epithelial-to-mesenchymal transition in rat adult male offspring. **The Journal of experimental biology**, v. 221, n. Pt 10, 1 maio 2018.
- SIEGEL, H. I.; ROSENBLATT, J. S. Progesterone inhibition of estrogen-induced maternal behavior in hysterectomized-ovariectomized virgin rats. **Hormones and behavior**, v. 6, n. 3, p. 223–230, 1975.
- SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494–504, nov. 2007.
- SILVERTHORN, D. UNGLAUB. Fisiologia humana : uma abordagem integrada. p. 957, 2017.
- SMITH, S. S.; OJEDA, S. R. Neonatal release of gonadotropins is essential for development of ovarian follicle-stimulating hormone receptors. **Biology of reproduction**, v. 34, n. 1, p. 219–227, 1986.
- SMITZ, J.; PLATTEAU, P. Influence of human chorionic gonadotrophin during ovarian stimulation: an overview. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 18, n. 1, 6 ago. 2020.
- SODERSTEN, P.; ENEROTH, P. Effects of exposure to pups on maternal behaviour, sexual behaviour and serum prolactin concentrations in male rats. **The Journal of endocrinology**, v. 102, n. 1, p. 115–119, 1984.
- SOUZA-MELLO, V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. **The British journal of nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1159–1169, dez. 2007.
- STOCCO, C. Aromatase Expression in the Ovary: Hormonal and Molecular Regulation. **Steroids**, v. 73, n. 5, p. 473, 2008.