

**IMPACTO DA PROGRAMAÇÃO FETAL POR RESTRIÇÃO
PROTEICA GESTACIONAL E LACTACIONAL SOBRE A
PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS: ASSOCIAÇÃO ENTRE O
DESENVOLVIMENTO VASCULAR E MORFOGÊNESE
EPITELIAL**

Ketlin Thassiani Colombelli

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 Estrutural e Funcional.

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Jr.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**IMPACTO DA PROGRAMAÇÃO FETAL POR RESTRIÇÃO
PROTEICA GESTACIONAL E LACTACIONAL SOBRE A
PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS: ASSOCIAÇÃO ENTRE O
DESENVOLVIMENTO VASCULAR E MORFOGÊNESE
EPITELIAL**

KETLIN THASSIANI COLOMBELLI

LUIS ANTONIO JUSTULIN JUNIOR

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 Estrutural e Funcional.

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Jr.

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. DE AQUÍ. E TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO – CRB 8/7500

Colombelli, Ketlin Thassiani.

Impacto da programação fetal por restrição proteica gestacional e lactacional sobre a próstata ventral de ratos: associação entre o desenvolvimento vascular e morfogênese epitelial / Ketlin Thassiani Colombelli. -Botucatu 2016

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientadora: Luis Antonio Justulin Jr

CAPES: 20603002

1. Feto – Desenvolvimento. 2. Desnutrição Fetal. 3. Próstata. 4. Neovascularização

Palavras-chave: Angiogênese; Programação fetal; Próstata; Restrição Proteica

É por todo amor, carinho, ensinamento, saudade, apoio incondicional, exemplo de esforço e determinação que dedico aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas”

São necessárias mudanças, desafios e coragem para desbravar o desconhecido, além do apoio e incentivo das pessoas mais próximas, por isso começo agradecendo aos meus Pais!!

Estes foram os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui, sempre tive apoio incondicional, incentivo e exemplo para lutar pelos meus sonhos, aliás, “Mais importante do que correr atrás dos sonhos é nunca desistir deles”, e o melhor, é você saber que se algo der errado sempre vou poder voltar e ter o apoio deles, que embora eu não possa voltar no começo poderei fazer um novo fim.

Ainda falando de mudanças, uma pessoa que me viu crescer, amadurecer e se tornar a pequena grande mulher de hoje, é o meu namorado Joshua. Muito obrigado por tantas vezes e em diferentes etapas da minha vida ter sempre me apoiado.

Ao meu orientador Dr. Luis Antonio Justulin Jr.

Que aceitou o desafio de orientar uma pessoa que nunca tinha pegado nas mãos nem se quer um roedor na vida. Muito obrigado por toda paciência, ensinamento, apoio e incentivo. Além de ter oferecido a grande oportunidade de poder crescer profissionalmente e cientificamente em uma equipe em que literalmente “A união faz a força”.

Aliás devo agradecer ao Pro. Dr. Sergio Luis Felisbino, por ter me indicado ao Prof. Justulin, sem sua indicação talvez hoje não estaria aqui completando mais uma importante fase da minha vida.

A toda equipe do Laboratório de Matriz Extracelular.

Caros amigos, Jaqueline, Sérgio, Flávia, Ana Carolina, Carol Barquilha, Nilton, Suelen, Luiz, Bruno, Helga, Maira, Isabela (Pipoca), Isabela (Poli), Bianca, Samara, Kely, Elian... Enfim, à todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Aliás, gostaria de agradecer às pessoas que conviveram comigo diariamente pois: “Esqueçamos as diferenças, juntos somos mais fortes”. Aprendi muito... Aprendi a viver mais, tolerar, respeitar, ajudar, trabalhar em equipe, ensinar e muitas outras coisas o qual sou muito grata e vou levar para o resto da vida.

Em especial para Sérgio Alexandre (Pei), que me ajudou e ensinou muito. Você é uma pessoa muito boa e especial para o nosso grupo. E sim acredite você faz falta. Às meninas, Ana Carolina e Flávia,

vocês também contribuíram muito, apesar de sermos um pouco diferente, aprecio e tenho muito respeito por vocês.

Além de toda a equipe LABMEC, os agradecimentos são direcionados para os agregados do laboratório: Bruno (Pira), Vivian, Bruno Fantinatti e Veridiana. Além de todas as pessoas do corredor do Departamento de Morfologia, que com certeza fizeram algum almoço, alguma tarde mais feliz.

À Carolina Barquilha, pelos abraços que você ofereceu nos momentos que eu precisei. Mostrando que não é necessário falar muitas coisas, um gesto/abraço vale muito mais que palavras!

Jaqueline, por ter me acolhido quando vim fazer estágio e depois ao assumir temporariamente o seu lugar no “predinho 481”. Poucas pessoas fazem o que você fez, de colocar uma pessoa totalmente desconhecida no seu lugar para morar. Sou muito grata pela confiança que você depositou em mim, além de todo apoio científico.

E foi neste lugar, no predinho “481” que conheci as pessoas que mais conviveram comigo fora do laboratório. Às minhas grandes amigas Patrícia, Priscila e Talita. Muito obrigado por vocês terem me aturado todo esse tempo. Agradeço pelos infinitos segredos trocados, dicas, conselhos e conversas jogadas fora.

Às minhas amigas, Priscila e Talita, vocês sempre me apoiaram e ajudaram muito. Sou infinitamente grata pelos vários conselhos trocados. Quem diria que iríamos formar uma amizade tão forte e verdadeira. Que ela continue assim por mais uns 100 anos!

À minha amiga Talita que esteve ao meu lado, e que nos últimos meses aguentou por muitas vezes o meu mau humor matinal. Muito obrigado por ter me ajudado, você foi muito importante principalmente na minha fase de qualificação.

À minha amiga Priscilanga, que também fez parte desta trajetória. Muito obrigado pelos inúmeros conselhos e conversas, pelas nossas comemorações que sempre ficarão na memória. Aliás a pensão Mello Colombelli sempre estará aberta para você!

Ao meu amigo Anderson, que conheci no finalzinho desses dois anos, porém muito me ajudou tanto quanto nas ‘perfumarias’ das tabelas quanto nos momentos de distração que foram proporcionadas pelos nossos vários passeios, além das comidas maravilhosas que a nossa amizade nos proporcionou. Aos amigos do Departamento de Anatomia, Karina, Marília e Ana que mais no finalzinho do mestrado melhoraram e muito a hora do meu almoço com várias estórias e fofocas.

À minha amiga Greyce que foi “semi” moradora do “predinho 481”, muito obrigado pelas nossas conversas, e pelos vários rolês, que no final sempre nos perdíamos em Botucatu!

Além dos meus amigos em Botucatu, gostaria de lembrar e agradecer dos meus companheiros de Foz: Mariana, Daniela, Amanda, Paulo e Raul. Apesar de encontrá-los duas a três vezes por ano vocês são muito especiais. Aliás, a frase “Conquiste amigos novos e conserve os velhos”, é muito importante para mim!

À minha amiga Luana, que mesmo distante toda vez que nos falávamos era como se tivesse visto ela ontem, isso é característica de uma amizade 20 anos. Amizades assim são difíceis de encontrar.

Aos Professores Profe. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Prof. Dra. Raquel Domeninconi e o Prof. Dr Willian Zambuzzi pelas colaborações oferecidas ao trabalho na fase da qualificação.

Aos Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino e Pro. Dr. Sérgio Pereira que aceitaram o convite para formar a banca examinadora desta dissertação. Muito obrigado pelos ensinamentos que serão passados e pelas contribuições que serão feitas para este trabalho.

Aos Professores do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências (IB) da UNESP pelo acolhimento, dicas e oportunidades que foram proporcionados.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, aos técnicos Vivian, Ricardo e José Eduardo por sempre estarem dispostos a auxiliar. Em especial a Dna Tera, que faz o Santo café de todos os dias, além das várias “gordices” que são feitas por ela.

À instituição Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências e Programa de Pós-Graduação Biologia Geral e Aplicada por toda estrutura oferecida para que este projeto fosse desenvolvido.

Aos meus animais experimentais, os quais foram tratados com muito respeito.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para que esta fase se realizasse.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Condições gestacionais adversas podem acarretar alterações morfofuncionais irreversíveis no embrião/feto, condição conhecida como Programação Fetal (PF). Dentre os modelos de estudos sobre PF, a restrição proteica intrauterina tem sido o mais utilizado. Considerando os resultados recentes que evidenciaram o atraso no desenvolvimento prostático de ratos submetidos à restrição proteica intrauterina, além do importante papel do suprimento vascular para a morfogênese prostática, o objetivo deste trabalho foi investigar os impactos da programação fetal induzida por restrição proteica materna sobre a próstata ventral da prole de ratos, com ênfase ao processo de angiogênese associado ao desenvolvimento glandular. Para tanto, foram utilizados ratos *Sprague Dawley* (n=15/grupo) nascidos de mães alimentadas com ração padrão (grupo controle-CTR, 23% de proteína) ou com ração hipoproteica (6% de proteína) durante a gestação (grupo RPG), ou durante a gestação e lactação (grupo RPGL). Após o período experimental, os animais foram pesados, eutanasiados e os complexos urogenitais (CUG) ou lobos prostáticos ventrais (PV) coletados nos dias pós-natal (DPN) 10 e 21, sendo ambos processados para análises histológicas e bioquímicas. Nossos resultados demonstraram redução do peso corpóreo, da distância ano-genital, além de atraso no desenvolvimento prostático na prole dos animais RPG e RPGL. Este atraso foi relacionado ao menor índice de proliferação e diferenciação celulares na próstata dos animais restritos. Além disso, observamos redução no processo de angiogênese prostático, especialmente na região subepitelial. Este resultado foi associado à diminuição na expressão de AQP-1, VEGF e VEGFR na prole de animais restritos. Assim, concluímos que a redução da microvascularização prostática afeta o fluxo bidirecional de moléculas entre o sangue e o tecido prostático, contribuindo para o atraso no desenvolvimento da próstata ventral dos animais submetidos à restrição proteica perinatal.

ABSTRACT

Adverse gestational conditions can result in morphological and metabolic alterations in the embryo/fetus during development. This condition is known as Fetal Programming (FP). The maternal protein malnutrition (MPM) during gestation and/or lactation is the most used model to study the FP. Recent studies have shown that MPM impairs the prostate development of male pups. It is also known the important role of vascular supply for prostate morphogenesis, maturation and function. In this sense, the aim of our study was to investigate the impact of MPM on rat ventral prostate, emphasizing the association between angiogenesis and glandular development. For this purpose, were used *Sprague Dawley* male rats (n= 15/group) whose mothers were fed with control diet (CTR group, 23% protein) or low protein diet (6% protein) during the gestational (gestational low protein group - GLP) or during gestational and lactation period (gestational and lactation low protein diet - GLLP). At post-natal day (PND) 10 and 21, the animals were weighed, euthanized and the urogenital complex (UGC) or ventral prostate lobes (PV) were collected. All UGC and VP were processed for histological and biochemical analysis. The body weight and ano-genital distance was reduced in GLP and GLLP in relation to CTR group. It was also observed a delay on prostate development and an important imbalance between proliferation/differentiation rates in the prostate of GLP and GLLP animals. The angiogenic process was impaired and the prostate of GLP and GLLP animals presented lower microvascular density in relation to CTR animals, especially in the subepithelial region. This result was associated with a decrease in the expression of AQP-1, VEGF signaling pathway. In conclusion, the reduction of prostate microvascularization impairs the bidirectional flow of molecules between blood and prostate tissue, and this reduction contributes to delay on prostate ventral development.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG= Angiogenina
AQP= Aquaporina
AR= Receptor de Andr6geno
AVC= Acidente Vascular Cerebral
BMPs= (Proteína Morfogenética Óssea
CO₂= Dióxido de carbono
COUPTFII= Fator de transcriç3o COUP II
CTR= Grupo Controle
CUG= Complexo Urogenital
DHT= Dihidrotestosterona
DPN= Dia Pós-Natal
FAO= Organizaç3o das Naç3es Unidas da Alimentaç3o e Agricultura
FGF- α = Fator de Crescimento Fibroblástico Alfa
FGF- β = Fator de Crescimento Fibroblástico Beta
G-CSF= Fator de Estimulaç3o de Col3nia de Granulócito
HGF= Fator de Crescimento de Hepatócitos
HIF- 1 α - Fator de Induç3o de Hip3xia 1 Alfa
IGF= Fator de Crescimento de Insulina
IL-8= Interleucina-8
MUG= Mesênquima Urogenital
OMS= Organizaç3o Mundial da Saúde
ON= Óxido nítrico
PF= Programaç3o fetal
PLGF= Fator de Crescimento Placentário
PV= Próstata Ventral
RPG= Grupo Restriç3o Proteica Gestacional
RPGL= Grupo Restriç3o Proteica Gestacional e Lactacional
RPI= Restriç3o Proteica Intrauterina
Shh= Sonic Hedgehog
SM= Síndromes Metabólicas
SUG= Seio Urogenital
TGF- α = Fator de Crescimento Transformante Alfa
TGF- β = Fator de Crescimento Transformante Beta
TNF- β = Fator de Necrose Tumoral beta

TNF- α = Fator de Necrose Tumoral-alfa

UNICEF= Fundo das Nações Unidas para a Infância

VEGF- Fator de Crescimento do endotélio vascular

VEGF-R= Receptor do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

ABBREVIATIONS LIST

AGD= Ano-Genital Distance

AQP= Aquaporin

AR= Androgen Receptor

CHIP 28= Channel-like Integral Protein of 28 kDa

CTR= Control Group

DOHaD= Developmental Origin of Health and Disease

ECM= Extracellular Matrix

FGF-2= Fibroblast Growth Factor 2

GD= Gestational day

GLLP= Gestational and Lactational Low Protein Group (GLLP)

GLP= Gestational Low Protein Group

HE= Hematoxylin-Eosin

MMP= Matrix Metalloproteinases

MPM= Maternal Protein Malnutrition

MVD= Determination of Microvascular Density

PDGFR= Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PLGF = Placental Growth Factor

PND= Post-Natal Day

UGC= Urogenital Complex

VEGF= Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR= Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VP= Ventral Prostate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 PROGRAMAÇÃO FETAL E RESTRIÇÃO PROTEICA	16
1.2 PRÓSTATA: ESTRUTURA E FISIOLOGIA	18
1.3 PRÓSTATA: MORFOGÊNESE.....	22
1.4 DESENVOLVIMENTO VASCULAR.....	24
1.4.1 Desenvolvimento vascular e restrição proteica	30
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	31
3 OBJETIVOS.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ARTIGO.....	41

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição é um problema mundial que afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva, recém-nascidos e crianças (Morgane et al., 2002). Embora seja apontada como a causa da mortalidade de mais da metade de crianças menores de 5 anos de idade (UNICEF, 2016), atualmente estima-se que 793 milhões de pessoas no mundo sejam afetadas pela desnutrição (FAO, 2015). Entre a década de 90 e o ano de 2016, houve redução de 21,4% no número de pessoas desnutridas no mundo, o que corresponde a aproximadamente 200 milhões de pessoas (FAO, 2015). Esta diminuição foi mais acentuada em países em desenvolvimento, com renda média ou baixa que apresentam crescimento econômico lento e instabilidade política (Wu et al., 2012; FAO, 2015). As principais regiões afetadas correspondem à parte da África, sudeste da Ásia, América Latina, América do Sul e Caribe (FAO, 2015) (Figura 01).

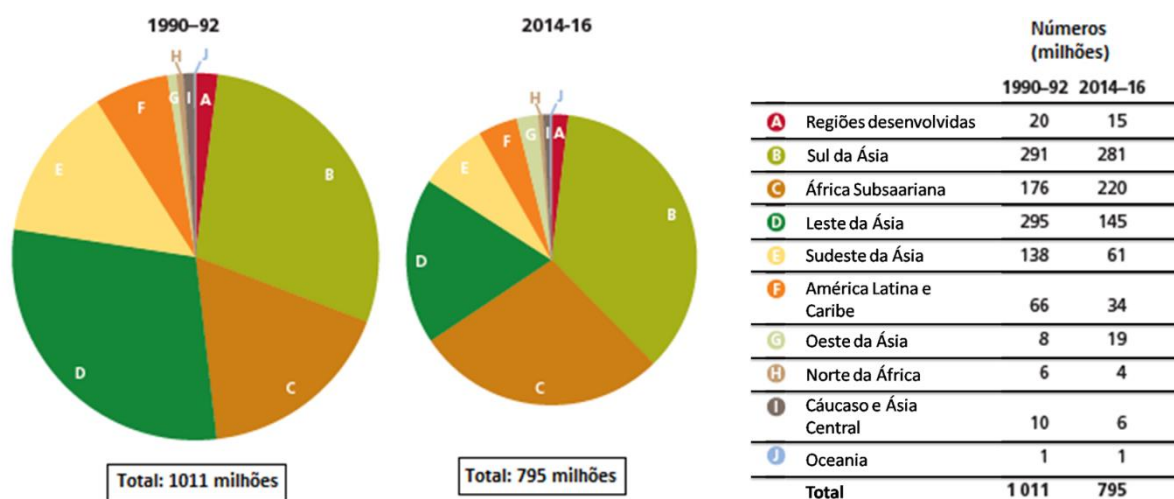


Figura 01- Gráficos representativos da diminuição da desnutrição em diferentes locais do mundo (Fonte: FAO, 2015).

Contudo, a desnutrição monitorada pela Organização das Nações Unidas da Alimentação e Agricultura (FAO) e a prevalência de baixo peso em crianças de até 5 anos de idade, monitoradas pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) nem sempre demonstram os motivos reais deste problema mundial, uma vez que a falta de saneamento básico e doenças associadas também estão relacionadas à perda de peso, especialmente em crianças (FAO, 2015).

1.1 PROGRAMAÇÃO FETAL E RESTRIÇÃO PROTEICA

Durante o período de desenvolvimento intrauterino e neonatal, as necessidades nutricionais materno-fetal e do recém-nascido são maiores, pois o embrião/feto em desenvolvimento é vulnerável às alterações nesta fase (Lucas, 1991; Gluckman, Hanson, 2004; Lopes et al., 2016). Portanto, a adoção de uma dieta inadequada nos períodos da gestação e de lactação podem acarretar prejuízos tanto para a gestante como para o desenvolvimento da prole (Papathakis et al., 2016).

Dentre os principais fatores que são alterados devido a uma dieta não balanceada estão a deficiências de glicose, ácidos graxos, micronutrientes (vitaminas e minerais) e aminoácidos (Wu et al., 2012), que podem induzir a diferentes respostas morfofuncionais adaptativas, tais como: redução do crescimento da placenta e da vascularização, aumento do estresse oxidativo, alteração da sinalização celular, regulação da síntese proteica, restrição do crescimento do feto, nascimento prematuro e defeitos ao nascimento (Wu et al., 2012; Jahan-Mihan et al., 2015). Além desses efeitos iniciais os indivíduos que foram submetidos à desnutrição intrauterina podem desenvolver doenças crônicas na vida adulta (Lucas, 1991; Gluckman, Hanson, 2004). Na literatura estas alterações em períodos críticos do desenvolvimento intrauterino que induzem prejuízo para a prole é denominada de Hipótese de Barker (Barker et al., 1989).

David Barker foi um grande epidemiologista do seu tempo e o proponente desta hipótese (Olsen, 2014). Seus estudos começaram no início do século XX na Inglaterra, cujo objetivo foi entender o porquê das altas taxas de mortalidade infantil por doenças cardíacas. Coincidentemente a principal causa de morte nos primórdios do século XX era o baixo peso ao nascimento, assim formulou-se a hipótese de que bebês com baixo peso ao nascimento e que sobrevivem à infância, podem apresentar maior risco de terem doenças cardíacas na vida adulta (De Boo, Harding, 2006).

Mais tarde em 1991, Lucas concedeu o termo que é mais utilizado até hoje, que é “*Fetal Programming*” ou **Programação Fetal (PF)**. Inicialmente controversa, sua teoria deu origem a um grande número de estudos sobre as relações entre insultos ocorridos durante o período gestacional e doenças da vida adulta (Cooper, 2013). A programação fetal, posteriormente denominada “*Developmental Origin of Health and Disease*” (DOHaD), estabelece que eventos ocorridos em períodos de rápido crescimento, como o desenvolvimento intrauterino são “memorizados” pelo organismo em desenvolvimento

levando à formação de um indivíduo com “fenótipo adaptado” (Langley-Evans, Mc Mullen, 2010).

Assim o ambiente encontrado no início do desenvolvimento pode determinar a função metabólica e fisiológica ao longo da vida pela remodelação de órgãos e tecidos, podendo levar o surgimento de síndromes metabólicas (SM) na vida adulta (Langley-evans, 2014). A SM é um conjunto de doenças que incluem obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, hipertensão e resistência à insulina (Jobgen et al., 2006). Algumas já foram descritas em trabalhos com filhotes nascidos de ratas alimentadas com dieta hipoproteica durante a gestação. Estes apresentaram menor peso ao nascer, porém obtiveram rápido ganho de peso associado a menor expectativa de vida (Barker, 2004; Mc Millen, Robinson, 2005), e alguns que desenvolveram crescimento pós-natal acelerado (*catch-up growth*) apresentando maior propensão a desenvolver resistência à insulina e diabetes tipo II na idade adulta (Petry et al., 2001; Hales, Barker, 2013).

Muitas teorias vêm sendo propostas para explicar como estes eventos influenciam no desenvolvimento e na relação da programação com as SM (Jahan-Mihan et al., 2015). O fator chave destas hipóteses se baseia na plasticidade celular, pois é esta característica que permite o embrião e o feto de responder ao ambiente ao seu redor (Langley-evans, 2014). Outro fator importante no desenvolvimento e diferenciação em resposta a situações anormais é a regulação epigenética (Jahan-Mihan, 2012; Ji et al., 2015), caracterizada por mudanças na expressão gênica sem alterações sequenciais no DNA (De Boo, Harding, 2006). Além disso pesquisas recentes indicam que características simples como o peso ao nascimento tem relações com polimorfismo de gene específico e doenças (Langley-evans, 2014).

Coincidentemente uma das principais características da PF é o baixo peso ao nascimento da prole. Isto já foi demonstrado em estudos epidemiológicos e experimentais com dieta deficiente em proteínas oferecidas as mães durante a gestação (Glazier et al., 1997; Rinaldi et al., 2013). As proteínas são macromoléculas formadas por uma ou várias cadeias de aminoácidos que atuam em muitas funções biológicas e nutricionais (Jahan-Mihan et al., 2015), são precursores essenciais na síntese de hormônios, neurotransmissores, óxido nítrico e importantes reguladores em vias metabólicas essenciais para o crescimento, desenvolvimento e reprodução (Hou et al., 2015). Portanto os períodos mais vulneráveis a deficiência materna de proteínas são as fases de periimplantação do embrião até a o completo desenvolvimento do indivíduo.

Já existem na literatura diversos estudos epidemiológicos com restrição proteica no período gestacional que mostram os diferentes efeitos em diferentes órgãos, como: menor número de néfrons no rim (Habib et al., 2011), menor quantidade de células beta e de ilhotas de Langerhans no pâncreas (Dahri et al., 1991), proporção alterada entre os tipos celulares do fígado (Burns et al., 1997), menor número de neurônios que controlam o apetite no hipotálamo (Plagemann et al., 2001) e menor número de alvéolos pulmonares e atraso no seu desenvolvimento (Zana-Taieb et al., 2013; Farid et al., 2015).

Entretanto a restrição a um período prolongado potencializa os efeitos da PF e afeta um maior número de órgãos e sistemas (Langley-evans, 2014). Assim a restrição proteica gestacional e lactacional leva a alterações no timo, com o retardo do envelhecimento do sistema imunológico central e periférico (Heppollete et al., 2016), neurogênese adulta alterada levando a deficiências cognitivas (Pérez- Garcia et al., 2016), alteração do número de folículos ovarianos (Guzmán et al., 2014) e atraso da maturação sexual em machos (Zambrano et al., 2005). Em conjunto, estes dados demonstram que a saúde nutricional nas fases de gestação e lactação podem ocasionar mudanças permanentes na estrutura e/ou função de diferentes órgãos, sendo as consequências observadas em longo prazo.

Além de cada órgão ter o seu período crítico de desenvolvimento, alguns completam a sua formação somente após o nascimento (Plageman et al., 2000; Langley-Evans, 2014). Em roedores um órgão que completa sua formação somente após o nascimento é a próstata, com a sua morfogênese completa somente com 30 dias de idade (Hayashi et al., 1991). Portanto as alterações verificadas nos diferentes órgãos afetados estão também relacionadas ao tempo de exposição e o período o qual a restrição ocorreu (Langley- Evans, 2014).

1.2 PRÓSTATA: ESTRUTURA E FISIOLOGIA

A restrição proteica materna afeta negativamente o funcionamento do sistema genital masculino da prole. Estudos avaliando o desenvolvimento/ função dos órgãos reprodutivos na prole de ratos machos de mães submetidas à desnutrição proteica relatam alteração do tempo de instalação da puberdade (Van et al., 2005; Noriega et al., 2009); menor taxa de fertilidade (Santos et al., 2004; Zambrano et al., 2005); redução da distância ano-genital (Rinaldi et al., 2013); alteração na concentração sérica de testosterona e estradiol (Teixeira et al., 2007; Rinaldi et al., 2013), menor expressão de receptores de andrógenos no testículo (Rodriguez-

Gonzalez et al., 2012) e menor peso do testículo, epidídimo e próstata (Santos et al., 2004; Rinaldi et al. 2013).

Dentre os órgãos que compõem o sistema genital masculino, pouco são os estudos analisando os efeitos da restrição proteica perinatal (período gestacional e lactacional) sobre a próstata. Essa é uma glândula acessória essencial para a biologia reprodutiva, cuja função é produzir o fluido prostático, que constitui aproximadamente um quarto do fluido seminal (Verze et al., 2016). Um dos constituintes deste fluido é um complexo proteolítico composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolizina, enzimas específicas e agentes imunossupressores. Todos são essenciais para o sucesso reprodutivo, pois garantem a liquefação do sêmen, motilidade espermática e proteção dos espermatozoides contra danos imunológicos causados pelo sistema genital feminino (Aumüller, Seitz, 1990; Maccioni et al., 2003; Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005; Verze et al., 2016).

A próstata de roedores e humanos são anatomicamente diferentes. Em humanos, a próstata tem morfologia compacta e sem lobos distintos, pesa entre 30g e 50g e situa-se inferiormente à bexiga urinária, envolvendo a parte prostática da uretra. Apresenta-se dividida em três zonas: central, de transição e periférica (Mc Neal, 1983; Roy-Burman et al., 2004; De Marzo et al., 2007). Estas zonas apresentam origem embrionária diferente e podem ser diferenciadas pelo seu aspecto morfológico. A zona central tem origem pelo ducto de Wolffian, e as zonas periféricas e de transição do seio urogenital (Lee et al., 2011). Em roedores, a glândula é composta por quatro lobos distintos: anterior ou glândula de coagulação, dorsal, lateral e ventral (Shirai et al., 2000; Marker et al., 2003). Os lobos apresentam particularidades quanto à ramificação de ductos, produção de secreções proteicas, características morfológicas, resposta androgênica e incidência de lesões (Sugimura et al., 1986; Lee et al., 2011) (Figuras 2a e b). Na literatura encontra-se descrito a homologia entre as zonas e os lobos prostáticos. O lobo anterior é análogo a zona central da próstata humana, e a próstata dorsolateral corresponde à zona periférica (Xue et al., 1997; Roy-Burman et al., 2004).

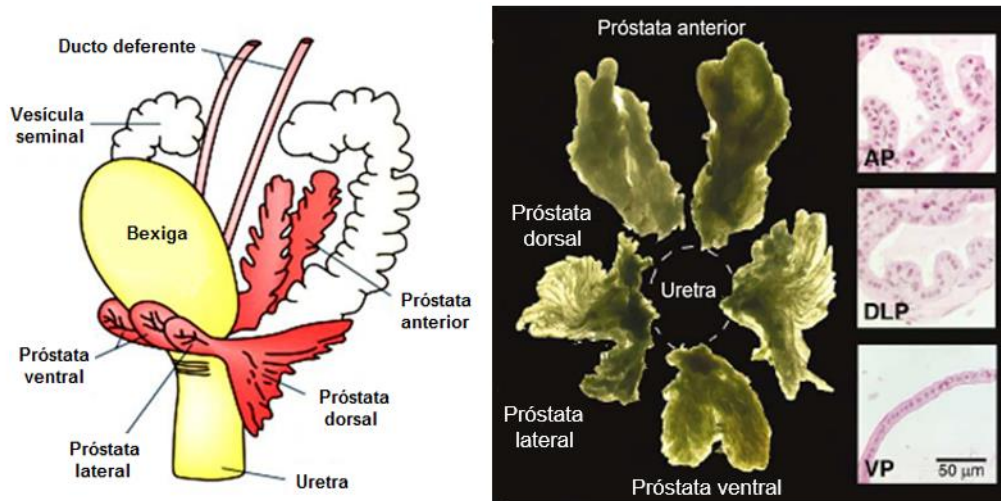


Figura 02 a e b- Aparência macroscópica e organização microscópica (Coloração H.E.) dos pares de lobos prostáticos do rato adulto (Adaptado de Marker et al., 2003). AP- Próstata anterior; DLP- próstata dorsolateral; VP- próstata ventral.

O epitélio prostático é composto basicamente por cinco tipos celulares (Peehl, 2005). As células epiteliais luminais secretoras, que revestem o lúmen dos ácinos prostáticos, responsáveis pela secreção de proteínas prostáticas e fluídos; as células epiteliais basais, que formam uma monocamada descontínua sobre a membrana basal, sendo as principais células proliferativas do epitélio da próstata; células neuroendócrinas, em menor quantidade que secretam uma variedade de fatores de crescimento, que possivelmente atuam no desenvolvimento e manutenção da glândula prostática; as “*stem cells*”, embora escassas estão normalmente localizadas na camada de células basais; e as *transit-amplifying cells*, são células intermediárias com características de células basais ou secretoras (Collins et al., 2001; Marker et al., 2003; Peehl, 2005) (Figura 03).

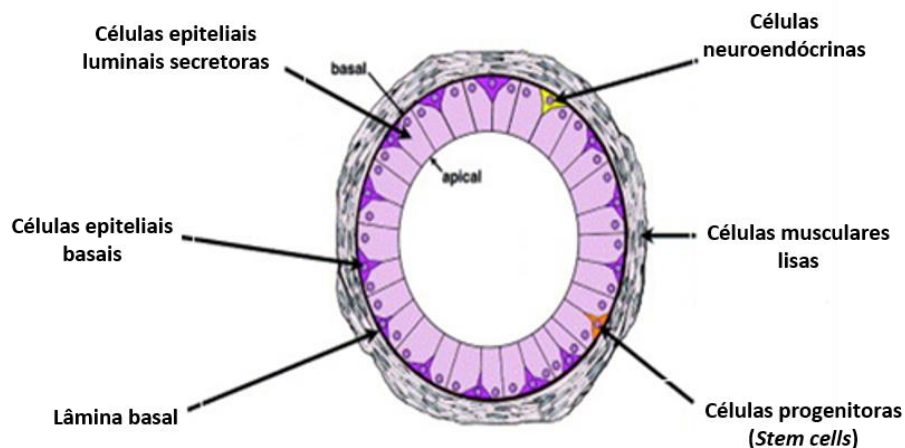


Figura 03- Esquema representativo da composição dos tipos celulares encontrados na glândula prostática. (Adaptado de Marker et al., 2003).

A glândula prostática além de seu epitélio característico apresenta uma camada de estroma com diferentes funcionalidades. O estroma é densamente vascularizado e innervado, composto por grande parte de células musculares lisas, dispostas concentricamente em torno dos ácinos (Marker et al., 2003), com função contrátil na ejaculação (Vilamaior et al., 2005). Outros tipos celulares também são encontrados: fibroblastos, miofibroblastos e matriz extracelular (laminina, fibras elásticas e colágeno) (Nieto et al., 2014). Estes componentes do estroma fibromuscular atuam principalmente na manutenção da homeostasia celular, ou seja, direcionando o desenvolvimento, crescimento, manutenção e diferenciação das células epiteliais, além de auxiliar na integridade estrutural da glândula prostática (Berry et al., 2008; Lai et al., 2012).

Dentre os fatores necessários para as células do compartimento epitelial e estromal desenvolverem suas funções (Vilamaior et al., 2000; Berry et al., 2008) estão os andrógenos. Estes hormônios são responsáveis pela masculinização dos tecidos, atuam diretamente no desenvolvimento de características sexuais secundárias e promovem a manutenção dos órgãos dependentes de andrógenos por toda a vida adulta (Brinkmann, 2011). Na próstata estes hormônios têm papéis essenciais no desenvolvimento, diferenciação dos tipos celulares, maturação e manutenção do tecido prostático, agindo de maneira direta ou indireta no estroma (Berry et al., 2008).

Um dos principais andrógenos é a testosterona, que atua como pro-hormônio na formação de importantes metabólitos, como o estrógeno e a diidrotestosterona (DHT) (Wilson, 2011). O DHT na próstata é formado a partir da conversão da testosterona livre pela enzima 5 α -redutase do tipo II (Marker et al., 2003; Cunha et al., 1992).

Estes andrógenos atuam via receptor, o receptor de andrógenos (AR), que estão presentes no mesênquima urogenital e na presença do ligante, são responsáveis por induzir a proliferação epitelial, a formação de ductos e a diferenciação das células epiteliais que ocorrem em paralelo ao desenvolvimento do estroma; no estroma, nas células musculares lisas e nas células epiteliais secretoras, que após atuarem também no processo de desenvolvimento da próstata, continuam atuando na sobrevivência das células epiteliais prostáticas (Heinlein; Chang, 2004; Marker et al., 2003; Cunha et al., 1992). E tanto a testosterona, quanto a DHT podem se ligar ao AR e migrar para o núcleo das células epiteliais e então modular vários genes influenciando no desenvolvimento e na manutenção prostática (Wen et al., 2014; Taplin; Ho, 2001).

1.3 PRÓSTATA: MORFOGÊNESE

A glândula prostática inicia o seu desenvolvimento e crescimento ainda no período fetal estando completamente formada somente quando o roedor atingir a maturidade sexual. Esta glândula se origina a partir do seio urogenital (SUG), que apresenta uma camada de células epiteliais derivadas da endoderme envolta por uma camada mesenquimal de origem da mesoderme. O SUG localiza-se na base da bexiga urinária em desenvolvimento, estando presente em ambos os sexos desde do 13° dia de gestação de roedores e da 7° semana em humanos. A estrutura permanece morfológicamente igual até 17.5° gestação e 10-12° semana de gestação para humanos, a partir deste período começa o processo de morfogênese prostática dependente do andrógeno circulante produzido pelos testículos fetais (Welsh et al., 2008; Marker et al., 2003; Cunha et al., 1987).

Além do andrógeno, o processo de morfogênese da próstata também é dependente de outros fatores de crescimento que são expressos em uma sequência espacial e temporal precisamente coordenada (Cunha et al., 1995; Huang et al., 2009). Os andrógenos atuam em AR no mesênquima urogenital (MUG) para induzir a proliferação epitelial, formação de ductos e diferenciação das células epiteliais (Marker et al., 2003; Cunha et al., 1992). Os outros componentes pertencem a diferentes famílias gênicas: como Sonic Hedgehog (Shh), Proteína Morfogenética Óssea (BMPs), Wingless-Related MMTV Integration site (Wnt) (Wilhelm, Koopman, 2006), proteínas da via de sinalização da insulina/IGFs (Reynolds; Kyprianou, 2006).

Basicamente a morfogênese é dividida em 5 estágios distintos: determinação, brotamento, ramificação, diferenciação e maturação (Prins; Putz, 2008) (Figura 04). A característica do evento inicial é a presença de brotos epiteliais sólidos provenientes do epitélio do SUG no MUG circundante, nas diferentes direções: ventral, dorsal e lateral. Ainda durante o período perinatal estes brotos apresentam a característica maciça, com a canalização destas estruturas ocorrendo somente após o nascimento do indivíduo. Conforme estes brotos vão se desenvolvendo, eles vão formando cordões de células epiteliais, e estes começam a se ramificar dando um formato que posteriormente originará os lobos prostáticos. Tendo cada lobo um padrão de brotamento ductal característico.

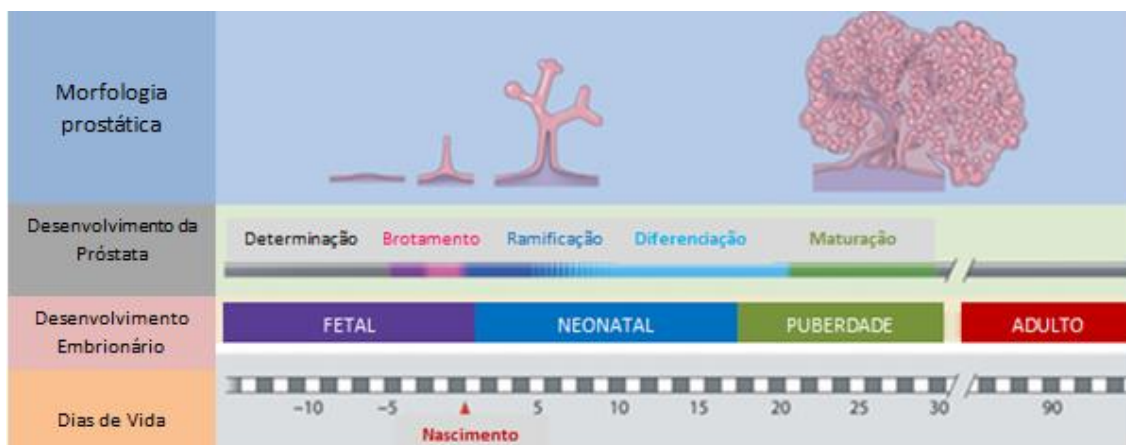


Figura 04- Estágios do desenvolvimento da próstata de rato. (Adaptado de Prins; Putz, 2008).

Além da estimulação androgênica, a próstata também necessita de um grande aporte nutricional e de oxigênio para seu desenvolvimento, crescimento e manutenção da atividade secretora (Lissbrant et al., 2001). Wong et al., (2014) analisaram o desenvolvimento da próstata de camundongos e descreveram uma íntima relação entre o desenvolvimento dos brotamentos epiteliais e de vasos abaixo do epitélio glandular. Estes autores demonstraram a formação de uma rede microvascular que envolvia os brotamentos epiteliais e que acompanhavam a orientação proximal-distal dos ductos em animais de 20 dias de idade pós-natal. Sugerindo que a ramificação vascular acompanha o padrão de ramificação do epitélio glandular em desenvolvimento. Esta íntima associação entre brotamento epitelial e vascularização, também foi demonstrada durante o recrescimento glandular induzido por testosterona em ratos castrados (Justulin et al., 2010).

Devido ao alto índice de proliferação endotelial observado na próstata (Lissbrant et al., 2001) mudanças tanto na organização vascular como no fluxo sanguíneo estão associados às alterações glandulares. Apesar das células endoteliais não expressarem AR, estudos demonstraram a participação indireta dos andrógenos na manutenção da estrutura vascular, e no aumento da expressão de fatores angiogênicos, tais como VEGF, VEGF-B, PLGF, e FGF-2, que atuam de forma parácrina, induzindo a proliferação endotelial. As células musculares lisas da parede dos vasos expressam AR e respondem a variações hormonais de forma direta (Prins et al., 1991). Neste sentido, vários estudos demonstraram que a apoptose das células epiteliais prostáticas após a castração é precedida pela diminuição do fluxo sanguíneo, apoptose de células endoteliais e regressão vascular (Shabsigh et al., 1999; Johansson et al., 2005). Da mesma forma, o recrescimento glandular induzido por testosterona em animais castrados é precedido por um aumento de proliferação das células endoteliais, recomposição vascular e aumento do fluxo sanguíneo.

O recrescimento vascular em animais castrados acompanha a reorganização tanto do epitélio glandular como do estroma, compartimentos responsáveis pela produção de fatores angiogênicos que atuam de forma parácrina nas células endoteliais. Esta cooperação entre os constituintes glandulares pode ser demonstrada pela inibição do VEGF por anticorpos específicos que impedem o recrescimento glandular em animais castrados (Lissbrant et al., 2004).

Estudos enfocando o papel da restrição proteica materna sobre os níveis hormonais séricos demonstram aumento das taxas de estradiol, corticosterona e testosterona maternos ao final da gestação (Zambrano et al., 2005). Além disso, já foi evidenciado que a desnutrição proteica materna promove diminuição dos níveis de andrógenos na prole de machos (Ramos et al., 2010; Rinaldi et al., 2013), atraso no desenvolvimento da próstata (Rinaldi et al., 2013) e baixa expressão de AR (Zambrano et al., 2005). Em conjunto, estes resultados demonstram que a desnutrição proteica altera a sinalização androgênica, resultando em prejuízo para a morfogênese, diferenciação, crescimento e maturação prostática (Marker et al., 2003).

1.4 DESENVOLVIMENTO VASCULAR

Estudos comprovam que o suprimento de nutrientes e oxigênio são essenciais para o desenvolvimento intrauterino e que alterações nestes parâmetros limitam o crescimento fetal (Barker, 1997). O processo inicial do desenvolvimento vascular, denominado vasculogênese, se inicia antes do batimento do coração (Hrouda et al., 2003). Este processo começa a partir da diferenciação de células progenitoras mesodermiais, os hemangioblastos/angioblastos em células endoteliais. Estas se associam e formam redes de estruturas capilares vasculares primitivas revestidas por endotélio (Figura 05- a). Nesta fase, principalmente por regulação gênica, os capilares já são predestinados a serem venosos ou arteriais. Nas artérias ocorre a atuação dos genes Notch e Epinefrina B2, e nas veias dos genes Ephb4 e o Fator de transcrição COUP II (COUPTFII) (Figura 05- d). Além dos fatores locais, pressão arterial e fluxo sanguíneo atuam neste processo mais tardiamente (Pardali et al., 2010).

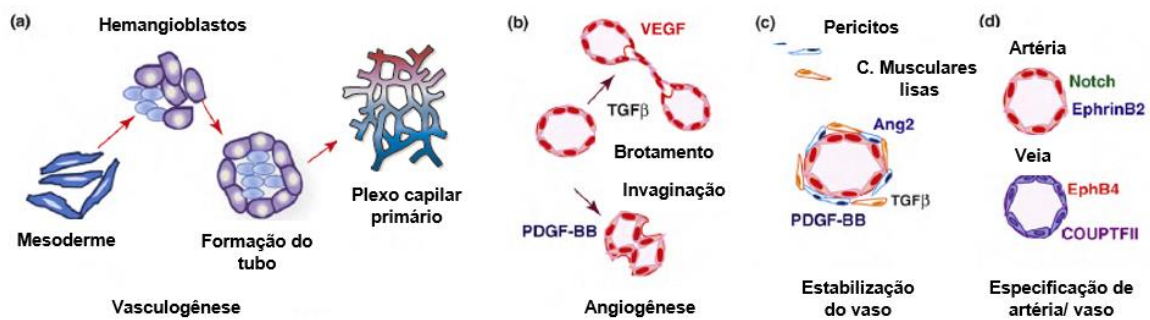


Figura 05- Processo de vasculogênese e angiogênese. a- Vasculogênese, células precursoras mesodermiais (hemangioblasto) se diferenciam em células endoteliais e formam a rede capilar vascular primário. b- Angiogênese, a partir da rede capilar ocorre o brotamento para formação de novos vasos a partir de vasos pre existentes c- Fase de maturação do vaso, através da atuação de células musculares lisas e os pericitos. d- Remodelamento final dos vasos, com a sinalização de fatores genéticos na especificação de artéria e veia. (Adaptado de Pardali, et al., 2012).

Uma vez que tenha o plexo capilar formado, o processo de angiogênese é responsável pelo crescimento, ramificação e maturação destas estruturas (Hrouda et al., 2003; Ruhrberg, 2003). A angiogênese é fundamental no desenvolvimento do embrião, pois são os vasos que permitem o transporte do sangue para fornecer o oxigênio para as células, e as moléculas de sinalização para a morfogênese, o desenvolvimento e crescimento dos órgãos (Carmeliet, 2005). Este processo é altamente complexo e é regulado por fatores de crescimento e moléculas de adesão celular, que atuam nas células endoteliais e nas células murais (células musculares lisas e pericitos) (Ferrara; Kerbel, 2005; Pardali et al., 2010).

Novos vasos sanguíneos são formados, primeiramente, através da expansão do plexo vascular e pelo brotamento angiogênico (Carmeliete, 2005). Para ter os grandes vasos, com ramificações ou não, o processo pode ocorrer de duas maneiras: pela fusão ponta-ponta dos brotos epiteliais ou pela invaginação do endotélio vascular (Figura 05-b) (Pardali et al., 2010). O processo final ocorre pela maturação dos vasos sanguíneos, através dos pericitos, que recobrem os capilares, oferecendo suporte estrutural e proteção das células endoteliais; células musculares lisas, que conferem propriedade vasomotora para os vasos; e deposição de matriz extracelular, que contribui para a estabilização do vaso (Figura 05- c).

O estabelecimento de um suprimento sanguíneo adequado é essencial tanto para o desenvolvimento embrionário como também para a homeostasia tecidual (Folkman, 1995). Várias famílias gênicas participam da regulação do processo de angiogênese, entre elas o fator de crescimento fibroblástico-alfa e beta (FGF- α , FGF- β), fator de crescimento transformante-alfa (TGF- α , TGF- β), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de necrose tumoral-alfa e beta (TNF- α e TNF- β), angiogenina (ANG) e interleucina-8 (IL-8), fator de

estimulação de colônia de granulócito (G-CSF) além da família do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Risau, 1997; Hroudá et al., 2003).

A superfamília gênica dos VEGFs inclui VEGF-A ou simplesmente VEGF, o VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário (PLGF) (Goel, Mercurio, 2013). Dentre estes, o VEGF-A é reconhecido como indutor específico de proliferação de células endoteliais (Ferrara, Henzel, 2012; Leung et al, 1989), funcionalmente atua na diferenciação e expansão dos angioblastos, expansão angiogênica do plexo capilar primitivo, sobrevivência, polarização e luminização das células endoteliais, e por fim atua na formação e na função dos vasos sanguíneos (Bautch, 2012; Bry et al., 2014).

O VEGF-A tem peso molecular de 34 a 42 kDa, é um homodímero, com dois monômeros idênticos ligados por uma ponte dissulfeto, ela pode ser encontrada em pelo menos 5 isoformas (Taiméh et al., 2013), que são originadas através de *splices* alternativos dos exons 6 e 7. Tendo os exons 1, 5 e 8 conservados em sua estrutura (Figura 06) (Hoeben et al., 2004; Bautch, 2012). Por exemplo, a isoforma do VEGF 121 é uma das mais encontrados, o VEGF 165 e o VEGF 189 (associado à matriz extracelular) já é mais escasso (Figura 06). Portanto, a sinalização do VEGF é regulada a partir da identificação das isoformas dos diferentes *splices* (Bautch, 2012).

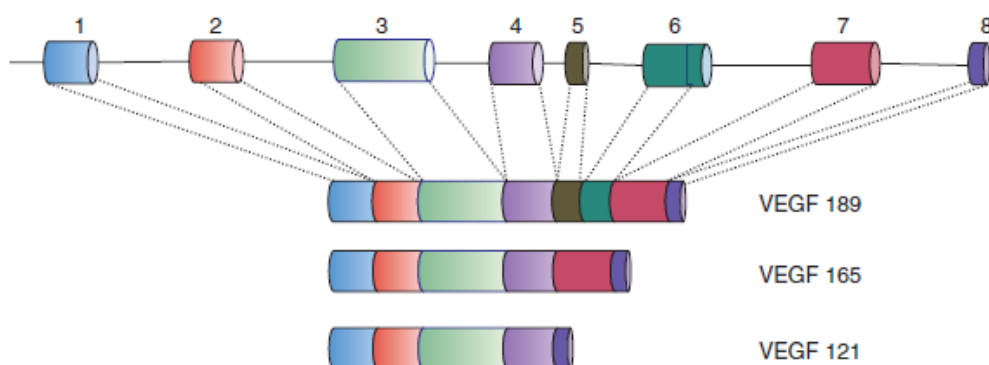


Figura 06- Ilustração do *Splicing* alternativo do VEGF-A. Mostrando a parte estrutural da molécula, com os seus exons, o qual os exons 1, 5 e 8 são conservados e os 6 e 7 são os que diferem de uma isoforma para outra na molécula de VEGF-A (Adaptado de Bautch, 2012).

Os VEGFs podem se associar a três diferentes receptores para VEGF (VEGFR1, 2 e 3) com diferentes graus de afinidade. Especificamente, o VEGF-A possui maior afinidade de ligação ao VEGFR-2 (conhecido como KDR em humanos ou Flk-1 em camundongos). A ativação desta via, que está demonstrada na Figura 07, induz o aumento da migração e

proliferação de células endoteliais e permeabilidade vascular (Shibuya, 2013), sendo de fundamental importância tanto para as fases iniciais de desenvolvimento embrionário, como para o crescimento pós-natal (Ferrara et al., 2003). Estudos clínicos e experimentais demonstraram a terapia anti-angiogênica como uma forma promissora de tratamento para pacientes com câncer (Takahashi, Nishioka, 2011).

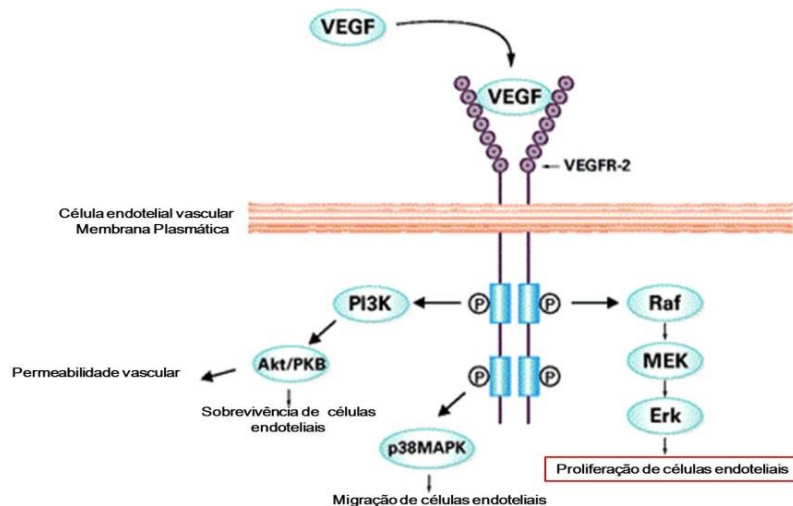


Figura 07- A ligação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ao seu receptor (VEGF-R) desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, levando a fosforilação da Kinase reguladora de sinal extracelular (ERK) e proliferação de células endoteliais. (Adaptado de Rini; Small, 2005).

Os processos de síntese e secreção do VEGF, em diferentes órgãos, são eventos complexos e altamente regulados. Entre os fatores que influenciam esta via, um dos mais relevantes é o Fator Indutor de Hipóxia-1 alfa (HIF-1 α), que é considerado o maior indutor da expressão de VEGF-A (Dor et al., 2001; Semenza, 2003). Em condição de hipóxia, ocorre aumento da expressão do HIF-1 α , que migra para o núcleo e leva a indução da transcrição de VEGF-A. Por outro lado, em condições de normoxia, o HIF-1 α é hidroxilado e posteriormente degradado no proteassomo. Além do HIF-1 α , o VEGF é ainda regulado por alguns outros fatores como PDGF-BB, TGF- β , FGF-2 e interleucinas 1 e 6, alguns dos quais podem agir sinergicamente pela regulação da hipóxia (Ferrara et al., 2003).

Outra proteína que é afetada pela concentração de oxigênio e atua de maneira indireta na angiogênese é a aquaporina do tipo 1 (Kaneko, 2008). Esta proteína de canal aquoso pertence a uma classe de proteínas de canal de membrana integral, as aquaporinas. Estas foram descritas no início dos anos 90 por Peter Agre na membrana de eritrócitos, primeiramente chamada de “*channel-like integral protein of 28 kDa*” (CHIP28) (Carbrey, Agre, 2009; Agre, 2006).

Após a descoberta nos eritrócitos algumas pesquisas foram realizadas no anfíbio *Xenopus laevis*. Neste estudo os pesquisadores testaram a expressão de CHIP 28 nos oócitos de *Xenopus*, devido à baixa permeabilidade da água. Quando estas estruturas expressaram a proteína, os oócitos sofreram osmose excessiva e ficaram túrgidos, enquanto que as amostras controle não tiveram nenhuma alteração significativa. Portanto, a partir deste experimento ficou estabelecido que CHIP 28 é uma proteína de canal aquoso. E assim com este estudo Peter Agre e colaboradores ganharam o Prêmio Nobel de Química de 2003 (Carbrey, Agre, 2009; Agre, 2006).

As pesquisas continuaram e devido à grande quantidade de homólogos descobertos ainda na década de 90, Agre alterou o nome de CHIP 28 para Aquaporina (AQP). Portanto as AQPs são uma superfamília presente de forma escassa nas plantas e anfíbios e com pelo menos 10 isoformas em mamíferos (Verkman, 2002). Estas isoformas apresentam diferentes funções fisiológicas, não transportando somente água, mas também diversos tipos de moléculas. Por exemplo, as AQPs 1, 2, 4, 5 e 8 são mais seletivas a água, enquanto que as AQPs 3, 7, 9 e 10 são as chamadas aquagliceroporinas, que transportam glicerol, ureia e outros pequenos solutos. Já as AQPs 7 e 9 além de fazerem o transporte de glicerol e ureia fazem também de metabólitos tóxicos. Algumas apresentam característica exclusivas, como a AQP 6, única a transportar ânions e nitrato e a AQP 1, que transporta moléculas gasosas, o dióxido de carbono (CO₂) e o óxido nítrico (ON) (Carbrey, Agre, 2009).

Embora tenha uma grande variedade de AQPs estas possuem uma estrutura padrão. São poros neutros, com transporte bidirecional, de acordo com o gradiente osmótico, sem gasto de energia (Huebert et al., 2011; Agre 2006; Verkman, 2002). É uma proteína tetrâmera de membrana, de 30 kDa, formada por 4 subunidades monoméricas, com ambas as extremidades N e C terminais no lado citoplasmático (Figura 08- a e b). As características estruturais internas também influenciam na funcionalidade das AQPs, a presença do poro aquoso facilita o transporte de água, que preveni a condução de prótons agindo diretamente na manutenção do gradiente osmótico (Verkman et al., 2014).

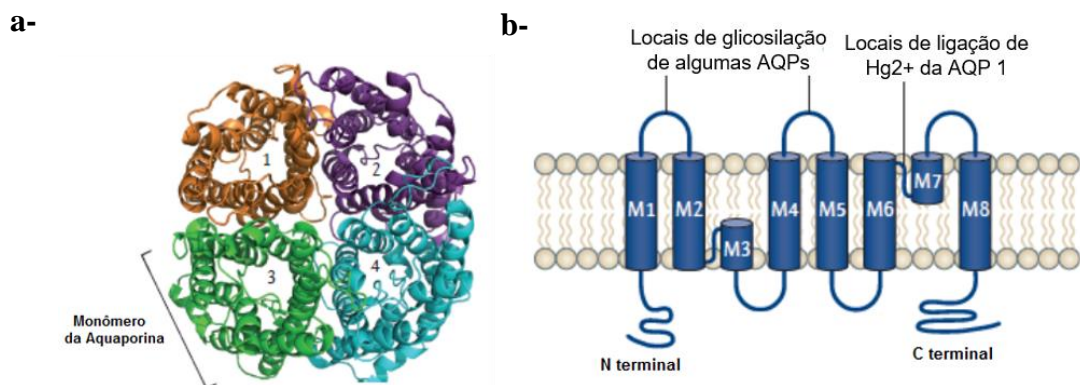


Figura 08- Esquema representativo da estrutura da Aquaporina (AQP1). Em a- tem a estrutura tetrâmera formada por 4 subunidades monoméricas. Em b ilustração estrutural da AQP1 na membrana. (Adaptado de Verkman et al., 2014).

Por apresentarem várias isoformas as AQP's são amplamente expressas no corpo, principalmente por tipos celulares que estão envolvidos em algum transporte de fluido, assim encontram-se essas moléculas em tipos celulares dos mais comuns, como as células epiteliais e endoteliais, até nas células do tecido adiposo (Verkman et al., 2014). Como esta superfamília de proteínas de canais aquosos estão expressas em muitos órgãos são descritas várias funções. As AQP's atuam na secreção de fluidos epiteliais, como da saliva e do humor aquoso (Zhang et al., 2002; Song, Verkamn; 2001; Ma et al. 1999); no transporte de água com ação direta na absorção, por exemplo, na absorção de água pelos glomérulos renais (Ma et al., 1998). No sistema nervoso central, em especial a AQP4, que atua no transporte de água no cérebro, mais especificamente na permeação de água na barreira hematoencefálica, na neuroexcitação, pela captura de potássio, e na migração dos astrócitos após injúria (Verkman et al., 2014).

Já as aquagliceroproteínas, suas funções ainda não são totalmente conhecidas. Porém sabe-se que a AQP 3 é expressa na camada basal de proliferação de queratinócitos, sendo responsáveis pela hidratação e elasticidade (Verkamn et al., 2014). E as AQP7 e AQP9 que estão expressas respectivamente nos adipócitos e nos hepatócitos, estão relacionadas ao metabolismo adiposo, podendo atuar na regulação metabólica da diabetes e da obesidade (Maeda et al., 2009).

Outra função das AQP's é a migração celular, principalmente a AQP1, que estimula a entrada de água para a formação dos lamelipódios na direção dos movimentos celulares (Verkman et al., 2014). Esta funcionalidade está associada com o processo de angiogênese. Em pesquisas com cultura celular de tumores em crescimento de células provenientes de ratos *Knockout* para AQP1, cresceram mais devagar e apresentaram menor quantidade de vasos, além da migração mais lenta nas células endoteliais, mostrando que estas alterações estão

relacionadas com a falta de vasos e de angiogênese nestes tumores (Saadoun et al., 2005). Interessantemente, a AQP1 encontra-se fortemente expressa em microvasos de tumores que estão proliferando em seres humanos (Saadoun et al., 2002), em tumores cerebrais malignos de ratos (Endo et al., 1999), em microvasos de medula óssea no mieloma múltiplo humano (Vacca et al., 2001), e em microvasos com proliferação nas membras corioalantoide dos embriões de galinha (Ribatti et al., 2002). Assim pode se dizer que a AQP1 estimula a migração das células endoteliais, que estas atraem os fatores de indução de angiogênese.

A AQP1 atua juntamente com o VEGF de maneira indireta na formação e função dos microvasos. Na próstata, a AQP1 localiza-se nos vasos e no músculo liso que circunda a glândula (Jung et al., 2012). Já o VEGF está na região apical das células epiteliais secretoras, nos capilares e nos vasos (Fávaro; Cagnon, 2010). Coincidentemente tanto as expressões do VEGF quanto da AQP1 são reguladas pelo mesmo fator, a baixa concentração de oxigênio, assim em condições de hipóxia ambos são estimulados (Tie et al., 2012). Contudo ainda não se sabe bem ao certo a ação do VEGF no estroma da próstata, porém em outros tecidos, o VEGF induz a expressão de proteases intersticiais e de collagenases, que degradam a matriz extracelular contribuindo na formação de novos vasos.

1.4.1 Desenvolvimento vascular e restrição proteica

Nos últimos anos, diversos trabalhos relacionaram a incidência de doenças cardiovasculares ao comprometimento no padrão de desenvolvimento cardiovascular e de fluxo sanguíneo em indivíduos adultos que foram submetidos à restrição proteica durante a gestação (Szosta-Wegierek, 2014).

Neste contexto, modelos experimentais de restrição proteica gestacional e/ou lactacional demonstraram, em ratos, redução no número de vasos do cérebro, duodeno (Bennis-Taleb et al., 1999) e pâncreas (Snoeck et al., 1990); redução no número de vasos e suas ramificações no mesentério e medula renal (Khorram et al., 2007). Estes últimos autores descreveram que células endoteliais isoladas de aorta de ratos submetidos à desnutrição intrauterina, quando mantidas em cultura, apresentaram menor capacidade proliferativa e geraram vasos menores quando comparadas a animais controle. Estes resultados foram associados à diminuição na expressão de fatores angiogênicos.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Vários efeitos da restrição proteica perinatal já foram descritos. Como a redução dos níveis séricos androgênicos e atraso do desenvolvimento e maturação prostática (Pinho et al., 2013; Rinaldi et al., 2013; Ibrahim et al., 2014). Contudo além da estimulação androgênica, a formação de uma rede vascular, capaz de suprir de nutrientes e oxigênio, é fundamental para o desenvolvimento normal, crescimento e fisiologia glandular.

Estudos experimentais demonstraram que as proles de animais cujas mães foram submetidas à restrição proteica gestacional apresentaram redução no número de vasos do cérebro, duodeno (Bennis-Taleb et al., 1999) e pâncreas (Snoeck et al., 1990); redução no número de vasos e suas ramificações no mesentério e medula renal (Khorram et al., 2007), resultados associados à redução da capacidade funcional destes órgãos. Considerando que, em ratos, o desenvolvimento prostático se inicia tardiamente no período fetal e se continua após o nascimento, é importante caracterizar o processo de angiogênese na próstata ventral da prole de ratos e associar mudanças no padrão de distribuição vascular a alterações da morfogênese e maturação prostáticas decorrentes da restrição proteica perinatal.

3 OBJETIVOS

Investigar os impactos da restrição proteica materna durante o período gestacional e lactacional sobre o processo de angiogênese na próstata ventral de ratos, associando possíveis alterações vasculares às mudanças na morfogênese e maturação glandular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRE, P. The Aquaporin Water Channels. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 3, n. 1, p. 5–13, 2006.
- ANTIWI, S. Malnutrition: Missed Opportunities for Diagnosis. *Ghana Med J.*, v. 42, p. 101- 104, 2008.
- AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory process in male accessory Sex gland. *Int Rev Citol.*, v. 121, p. 127-231, 1990.
- BARKER, D.J. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.*, v. 2661, p. 412- 417, 2007.
- BARKER, D.J. The developmental origins of well-being. *B Biol Sci.*, v. 359, p. 1359-1366, 2004.
- BARKER, D.J. The long-term outcome of retarded fetal growth. *ClinObstet Gynecol.*, v. 40, p. 853-863, 1997.
- BARKER, D.J.; HALES, C.N.; FALL, C.H.D.; OSMOND, C.; PHIPPS, K.; CLARCK, P.M.S. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidemia (syndrome X): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, v. 36, p. 62- 67, 1993.
- BARKER, D.J.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, M.E.J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.*, v. 298, p. 564- 567, 1989.
- BAUTCH, V.L. VEGF-Directed Blood Vessel Patterning: From Cells to Organism. *Harb Perspect Med*, v.2, p. 6452, 2012.
- BENNIS-TALEB, N.; REMACLE, C.; HOET, J.J.; REUSENS, B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr.*, v. 129, p.1613-9, 1999.
- BERRY, P. A.; MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 288, n. 1-2, p. 30–37, 2008.
- BLACK, R. E.; Victora, C.G.; Walker, S.P.W.; Bhutta, Z.A.; Christian, P.; Onis, M.; Ezzati, M. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, v. 382, n. 9890, p. 427–451, 2013.
- BRINKMANN, A.O. Molecular mechanisms of androgen action- a historical perspective. *Methods Mol Biol.*, v. 776, p. 3-24, 2011.
- BRY, M.; KIVELÄ, R.; LEPPÄNEN, V.M.; ALITALO, K. Vascular Endothelial Growth Factor-B. *Physiol Rev*, v. 94, p. 779–794, 2014.
- BURNS, S.P.; DESAI, M.; COHEN, R.D.; HALES, C.N.; ILES, R.A.; GERMAIN, J.P.; GOING, T.C.; BAILEY, R.A. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest.*, v. 100, p. 1768-1774, 1997.

CARBREY, J. M.; AGRE, P. Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 190, p. 3–28, 2009.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *NATURE*, v. 438, p. 932- 936, 2005.

COLLINS, A. T.; Fouad, k.h.; Maitaland, N.J.; Neal, D.E. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci*, v. 114, n. Pt 21, p. 3865–3872, 2001.

COOPER, C.; BARKER, D. (1938-2013). *Nature.*, v. 502, p. 304, 2013.

CUNHA, G.R.; ALARID, E.T.; TURNER, T.; DANJACOUR, A.A.; BOUTIN, E.L.; FOSTER, B.A. Normal and abnormal development of the urogenital tract: role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J Androl.*, v. 13, p. 465-475, 1992.

CUNHA, G.R.; ALARID, E.T.; TURNER, T.; DONJACOUR, A.; BOUTIN, E.L.; FOSTER, B.A. Normal and abnormal development of the male urogenital tract: Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *Journal of Andrology*. 13, 465-75, 1995.

CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A.; COOKE, P.S.; MEE, S.; BIGSBY, R.M.; HIGGINS, S.J.; SUGIMURA, Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev.*, v. 8, p. 338- 362, 1987.

DAHRI, S.; SNOECK, A.; REUSENS-BILLEN, B.; REMACLE, C.; HOET, J.J. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes.*, v. 40, p. 115-20, 1991.

DE BOO, H.A.; HARDING J.E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.*, v. 46, p. 4-14, 2006.

DE MARZO, A.M.; NAKAI, Y.; NELSON, W.G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol.*, v. 25, p. 398-400, 2007.

DOR, Y.; PROAT, R.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, v.280, p.1367–1374, 2001.

The State of Food Insecurity in the World 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/hunger/key-messages/en/>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

FAO; IFAD; WFP. The State of Food Insecurity in the World: Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. [s.l: s.n.].

FARID, S.A.; MAHMOUD, O.M.; SALEM, N.A.; ABDEL-ALRAHMAN, G.; HAFEZ, G.A. Long term effects of maternal protein restriction on postnatal lung alveoli development of rat offspring. *Folia Morphol (Warsz)*., v.74, p.479-85, 2015.

FÁVARO, W.J.; CAGNON, V.H., Effect of combined hormonal and insulin therapy on the steroid hormone receptors and growth factors signalling in diabetic mice prostate, *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 91, p. 537–545, 2010.

FERRARA, N.; HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.25, p. 540-7, 2012.

- FERRARA N.; KERBEL, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. v. 15, p. 967-74, 2005.
- FERRARA, N.; GERBER, H.P.; COUTER, L.E.J. The biology of VEGF and its receptors. *J. Nat Med*, v.9, p.669- 676, 2003.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.*, v.1, p. 27-31, 1995.
- GLAZIER, J.D.; CETIN, I; PERUGINO, G; RONZONI, S.; GREY, A.M.; MAHENDRAN, D.; MARCONI, A.M.; PARDI, G.; SIBLEY, C.P. Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.*, v. 42, p.514–519, 1997.
- GOEL, H.L.; MERCURIO, A.M. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer*, v. 13, p. 871-882, 2013.
- GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*, v. 305, p.1733–1736, 2004.
- GUZMÁN, C.; GARCÍA-BECERRA, R.; AGUILAR-MEDINA, M.A.; MÉNDEZ, I.; MERCHANT-LARIOS, H.; ZAMBRANO, E. Maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation negatively affects follicular ovarian development and steroidogenesis in the prepubertal rat offspring. *Arch Med Res.*, v.45, 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, p. 157-165, 2011.
- HALES, C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Int J Epidemiol.*, v. 42, p. 1215-1222, 2013.
- HAYASHI, N.; SUGIMURA, Y.; KAWAMURA, J.; DONJACOUR, A.A.; CUNHA, G.R. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod.*, v. 45, p. 308-21,1991.
- HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*, v. 25, n. 2, p. 276–308, 2004.
- HEPPOLETTE, C. A.A.; CHEN, J.H.; CARR, S.K.; PALMER, D.B.; OZANNE, S.E. The effects of aging and maternal protein restriction during lactation on thymic involution and peripheral immunosenescence in adult mice. *Oncotarget*, v. 7; p. 6398- 6409, 2016.
- HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; OOSTEROM, A. T. V.; DE BRUIJN, E. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev.*, v. 56, p.549–580, 2004.
- HOU, Y.; YIN, Y.; WU, G. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. *Experimental Biology and Medicine*; v.0, p.1–11, 2015.
- HROUDA, N.; NICOL, D.L.. GARDINER, R.A. The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer. *Urol Res*, v.30, p.347, 2003.

HUANG, L.; PU, Y.; HU, W.Y.; BIRCH, L.; LUCCIO-CAMELO, D.; YAMAGUCHI, T.; PRINS, G.S. The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol.* 328:188-99, 2009.

HUEBERT, R. C.; JAGAVELU, K.; HENDRICKSON, H.I.; VASDEV, M.M.; ARAB, J.P.; SPLINTER, P.L.; TRUSSONI, C.E.; LARUSSO, N.F.; SHAH, V.H. Aquaporin-1 promotes angiogenesis, fibrosis, and portal hypertension through mechanisms dependent on osmotically sensitive MicroRNAs. *American Journal of Pathology*, v. 179, n. 4, p. 1851–1860, 2011.

IBRAHIM, M.I.; AMMAR, E.M.; RAMY, A.; ELLAITHY, M.I.; ABDELRAHMAN, R.M.; ELKABARITY, R. The association between pentraxin 3 in maternal circulation and pathological intrauterine fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, v.185, p.1-8, 2014.

IMAMOV, O.; MORANI, A.; SHIN, G.J.; OMOTO, Y.; THULIN-ANDERSSON, C.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 101, p. 9375-9380, 2004.

JAHAN-MIHAN, RODRIGUES, J.; CHRISTIE, C.; SADEGHI, M.; ZERBE, T. A. et al. The role of maternal dietary proteins in development of metabolic syndrome in offspring. *Nutrients*, v. 7, n. 11, p. 9185–9217, 2015.

JI, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; SUN, K.; WANG, J. WU, G. Nutritional epigenetics with a focus on amino acids: implications for the development and treatment of metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 27, p. 1–8, 2015.

JOBGEN, W. S.; FRIED, S.K.; FU, W.J.; MEININGER, C.J.; WU, G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 17, n. 9, p. 571–588, 2006.

JOHANSSON, A.; RUDOLFSSON, S.H.; WIKSTRÖM, P.; BERGH, A. Altered levels of angiopoietin 1 and tie 2 are associated with androgen-regulated vascular regression and growth in the ventral prostate in adult mice and rats. *Endocrinology.*, v. 146, p. 3463-3470, 2005.

JUNG, S.I. H.S.; LEE, H.S.; KIM, K.; AHN, K.; PARK, Effects of castration on the expression of aquaporins and apoptosis in the ventral prostate, *J. Mens Health*, v.9, p. 238–244, 2012.

JUSTULIN, L.A.Jr.; DELELLA, F.K.; TABOGA, S.R.; FELISBINO, S.L. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int J Androl.*, v. 33, p. 696-708, 2010.

KANEKO, K.; YAGUI, K.; TANAKA, A.; YOSHIHARA, K.; ISHIKAWA, K.; TAKAHASSHI, K.; BUJO, H.; SAKURAI, K. SAITO, Y. Aquaporin 1 is required for hypoxia-inducible angiogenesis in human retinal vascular endothelial cells. *Microvascular Research*, v. 75, n. 3, p. 297–301, 2008.

KARR, J.F.; KANTOR, J.A.; HAND, P.H.; EGGENSPERGER, D.L.; SCHOLM, J. The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate-specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Res.*, v. 55, p. 2455-2462, 1995.

KHORRAM, O.; KHORRAM, N.; MOMENI, M.; HAN, G.; HALEM, J.; DESSAI, M.; ROSS, M.G. Maternal undernutrition inhibits angiogenesis in the offspring: a potential mechanism of programmed hypertension. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 293, p.745–753, 2007.

LAI, K.-P.; YAMASHITA, S.; VITKUS, S.; SHYR, C-R; YEH, S.; CHANG, C. Suppressed prostate epithelial development with impaired branching morphogenesis in mice lacking stromal fibromuscular

- androgen receptor. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), v. 26, n. January 2012, p. 52–66, 2012.
- LANGLEY-EVANS, S.C.; MC MULLEN, S. Developmental origins of adult disease. *Med PrincPract.*, v. 19, p. 87- 98, 2010.
- LANGLEY-EVANS, S.C. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet.*, v. 28, p. 1–14, 2014.
- LANGLEY-EVANS, S. C. Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, v. 28, n. s1, p. 1–14, 2015.
- LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 40, n. 3, p. 565–575, 2011.
- LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W.J.; GOEDDEL, D.V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, v. 246, p. 1306-1309, 1989.
- LISSBRANT, I.F.; HAMMARSTEN, P.; LISSBRANT, E.; FERRARA, N.; RUDOLFSSON, S.H.; BERGH, A. Neutralizing VEGF bioactivity with a soluble chimeric VEGF-receptor protein flt (1-3) IgG inhibits testosterone- stimulated prostate growth in castrated mice. *Prostate*, v. 58, p. 57-65, 2004.
- LISSBRANT, I.F.; LISSBRANT, E.; DAMBER, J.E.; BERGH, A. Blood vessels are regulators of growth, diagnostic markers and therapeutic targets in prostate cancer. *Scand J UrolNephrol.*, v. 35, p. 437- 452. 2001.
- LOPES, G. A. D.; RIBEIRO, V.L.B.; BARBISAN, L.F.; RODRIGUES, M.A.M. Fetal developmental programming: insights from human studies and experimental models. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 7058, n. May, p. 1–7, 2016.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.*, v.156, p. 38–50, 1991.
- MA, T.; SONG, Y.; GILLESPIE, A.; CARLSON, E.J.;VERKMAN, A.S. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 20071–20074, 1999.
- MA, T.; YANG, B.; GILLESPIE, A.; EPSTEIN, C.J.; VERKMAN, A.S. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 4296–4299, 1998.
- MACCIONI, M.; CABEZAS, L.E.; RIVERO, V.E. Effect of prostatein, the major protein produced by the rat ventral prostate, on phagocytic cell functions. *Am J Reprod Immunol*, v. 50, p. 473-480, 2003.
- MAEDA, N., HIBUSE, T.; FUNAHASHI, T. Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity. *Handb. Exp. Pharmacol.*, p.233–249, 2009.
- MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.*, v. 253, p. 165-174, 2003.
- MC MILLEN, I.C.; ROBINSON, J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.*, v. 85, p. 571-633, 2005.
- MC NEAL. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr.Urol.*, v. 4, p. 1-37, 1983.

- MIHAN, A.J.; RODRIGUEZ, J.; CHRISTIE, C.; SADEGHI, M.; ZERBE, T. The Role of Maternal Dietary Proteins in Development of Metabolic Syndrome in Offspring. *Nutrients*, vol, 7, p.9185–9217; 2015.
- MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects prenatal protein malnutrition on the hippocampo formation. *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 26, p. 471-483, 2002.
- NEGRATO, C.A.; GOMES, M.B. Low birth weight: causes and consequences. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v. 5, p.49, 2013.
- NIETO, C. M.; RIDER, L. C.; CRAMER, S. D. Influence of stromal-epithelial interactions on androgen action. *Endocrine-Related Cancer*, v. 21, n. 4, 2014.
- NORIEGA, N.C.; HOWDESHELL K.L.; FURR, J.; LAMBRIGHT, C.R.; WILSON, V.S.; GRAY, L.E, Jr. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicol Sci.*, v. 111, p. 163-178, 2009.
- OLSEN, J. David Barker (1938-2013) - A giant in reproductive epidemiology. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 93, n. 11, p. 1077–1080, 2014.
- PAPATHAKIS, P. C.; SINGH, L. N.; MANARY, M. J. How maternal malnutrition affects linear growth and development in the offspring. *Molecular and Cellular Endocrinology*, p. 1–8, 2016.
- PARDALI, E.; GOUMANS, M.J.; DIJKE, P. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology*, v. 20, p. 556-567, 2010.
- PEEHL, D. M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-Related Cancer*, v. 12, n. 1, p. 19–47, 2005
- PÉREZ-GARCÍA, G.; GUZMÁN-QUEVEDO, O.; DA SILVA ARAGÃO, R.; BOLAÑOS-JIMÉNEZ, F. Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. *Sci Rep.*, v. 17, p. 6:2, 2016.
- PETRY, C.J.; DORLING, M.W.; PAWLAK, D.B.; OZANNE, S.E.; HALES, C.N. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res.*, v. 2, p.139-143, 2001.
- PINHO, C.F.; RIBEIRO, M.A.; RINALDI, J.C.; FELISBINO, S.L.; PINHEIRO, P.F.; DOMENICONI, R.F.; FOCHI, R.A.; BOER, P.A.; SCARANO, W.R. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reprod Fertil Dev.*, v. 26, p. 967-73, 2013.
- PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; MELCHIOR, K.; ROHDE, W.; DÖRNER G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutrition.*, v. 130, p. 2582-2589, 2000.
- PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v. 12, p. 1–27, 1963.
- PRINS, G.S.; BIRCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology.*, v. 129, p. 3187-3199, 1991.
- PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, v. 76, n. 6, p. 641–659, 2008.

RAMOS, C.D.A.F.; BABINSKI, M.A.; COSTA, W.S.; SAMPAIO, F.J. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl.*, v. 12, p. 180- 185, 2010.

REYNOLDS, A.R.; KYPRIANOU, N. Growth factor signaling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol*, v. 147, p.144-52, 2006.

RIBATTI, D.; FRIGERI, A.; NICO, B.; NICCHIA, G.P.; DE GIORGIS, M.; RONCALI, L.; SVELTO, M. Aquaporin-1 expression in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Anat Rec.*, v. 268, p. 85-9, 2002.

RINALDI, J.C.; JUSTULIN, L.A. Jr; LACORTE, L.M.; SAROBO, C.; BOER, P.A.; SCARANO, W.R.; FELISBINO, S.L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Science.*, v. 92, p. 763-764, 2013.

RINI, B. I.; SMALL, E. J. Biology and Clinical Development of Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Therapy in Renal Cell Carcinoma. *J ClinOncol.*, v.23, p.1028-1043, 2005.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, v. 386, p. 671-674, 1997.

RODRIGUEZ- GONZÁLEZ, G.L.; VIGUERAS-VILLA SEÑOR, R.M.; MILLÁN, S.; MORAN, N.; TREJO, R.; NATHANIELSZ, F.; ZAMBRANO, E. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v. 3, p. 321-326, 2012.

ROY-BURMAN, P.; WU, H.; POWELL, W.C.; HAGENKORD, J.; COHEN M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocrinol. Relat. Cancer*, v. 11, p. 225-254, 2004.

RUHRBERG C. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. *Bioessays.*, v. 25, p.1052-60, 2003.

SAADOUN, S.; PAPADOPOULOS, M.C.; DAVIES, D.C.; BELL, B.A.; KRISHNA, S. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br J Cancer.*, v. 87, p. 621-3, 2002.

SAADOUN, S.; PAPADOPOULOS, M.C.; HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A.S. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption *Nature*, v. 434, p.789-792, 2005.

SANTOS, A.M.; FERRAZ, M.R; TEIXEIRA, C.V.; SAMPAIO, F.J. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. *HormMetab Res.*, v. 36, p. 27-33, 2004.

SAWAYA, A.L. Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estudos Avançados.*, v. 1, p. 20- 58, 2008.

SEMENZA, G.L. Targeting HIF-1 for cancertherapy. *Nature Reviews.Cancer*, v. 3, p. 721–732, 2003.

SHABSIGH, A.; TANJI, N.; D'AGATI, V.; BURCHARDT, M.; RUBIN, M.; GOLUBOFF, E.T.; HEITJAN, D.; KISS, A.; BUTTYAN, R. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology.*, v. 140, p. 1920- 1926, 1999.

- SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem.*, v.153, p.13- 19, 2013.
- SHIRAI, T.; TAKAHASHI, S.; CUI, L.; FUTAKUCHI, M.; KATO, K.; TAMANO, S.; IMAIDA, K. Experimental prostate carcinogenesis - rodent models. *Mutat Res.*, v. 462, p. 219-226, 2000.
- SONG, Y.; VERKMAN, A. S. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands. *J. Biol. Chem.*, v. 276, 41288–41292, 2001.
- SNOECK, A.; REMACLE, C.; REUSENS, B.; HOET, J.J. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *J. Biol Neonate*, v.57, p.107- 118, 1990.
- SUGIMURA, Y.; CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod.*, v. 34, p. 961-971, 1986.
- SZOSTAK-WEGIEREK D. Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health. *Int J Womens Health.*, v. 6, p. 647-656, 2014.
- TAIMEH, Z.; LOUGHRAN, J.; BIRKS, E. J.; BOLLI, P. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.*, v.10, p. 519–530, 2013.
- TAKAHASHI, Y.; NISHIOKA, K. Therapeutic approaches targeting tumor vasculature in gastrointestinal cancers. *Front Biosci.*, v. 1, p.541-8, 2011.
- TAPLIN, M.E.; HO, S.M. Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 86, p.3467-77, 2001.
- TEIXEIRA, C.V.; SILANDRE, D.; SOUZA, S.A.M.; DELALANDE, C.; SAMPAIO, F.J.; CARREAU, S.; FONTER.C. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol.*, v. 92, p. 301-311, 2007.
- TIE, L.; LU, N.; PAN, X.Y.; PAN, Y.; ANJ, Y.; GAO, W., Hypoxia-induced up-regulation of aquaporin-1 protein in prostate cancer cells in a p38-dependent manner, *Cell. Physiol. Biochem.*, v. 29, p. 269–280, 2012.
- TIMMS, T.L.; TRUONG, L.D.; MERZ, V.W.; KREBS, T.; KADMON, D.; FLANDERS, K.C.; PARK, S.H.; THOMPSON, T.C. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*, v. 134, p. 1039-1045, 1994.
- UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol.*, v. 40, p. 121-128, 2005.
- VAN, W.M.M.; ENGELBREGT, M.J.; VEENING, M.A.; VAN, W.H.A. Fetal nutrition and timing of puberty. *Endocr Dev.*, v. 8, p. 15-33, 2005.
- VERKMAN, A. Aquaporin water channels and endothelial cell function. *Journal of anatomy*, v. 200, n. 6, p. 617–627, 2002.
- VERKMAN, A. S.; ANDERSON, M. O.; PAPADOPOULOS, M. C. Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 13, n. 4, p. 259–77, 2014.
- VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology*, 2016.

VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell Biology International*, v. 29, n. 9, p. 809–816, 2005.

VILAMAIOR, P. S. L.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: A possible role for smooth muscle cells. *Prostate*, v. 45, n. 3, p. 253–258, 2000.

WELSH, M.; SAUNDERS, P.T.; FISKEN, M.; SCOTT, H.M.; HUTCHISON, G.R.; SMITH, L.B. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *Clin Invest.*, v. 118, p. 1479-1490, 2008.

WEN, S.; CHANG, H-C; TIAN, J.; SHANG Z.; NIU, Y.; CHANG, C. Stromal androgen receptor roles in the development of normal prostate, benign prostate hyperplasia, and prostate cancer. *American Journal of Pathology*, v. 185, n. 2, p. 293–301, 2014.

WILHELM, D.; KOOPMAN, P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nature Review Genetics*, v. 7, p.620-31, 2006.

WILSON, J. D. The Critical Role of Androgens in Prostate Development. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 40, n. 3, p. 577–590, 2011.

WONG, L.; GIPP, J.; CARR, J.; LOFTUS, C.J.; BENCK, M.; LEE, S.; MEHTA, V.; VEZINA, C.M.; BUSHMAN, W. Prostate Angiogenesis in Development and Inflammation. *The Prostate*, v. 74, p. 346-358, 2014.

WU, G.; IMHOFF-KUNSCH, B.; GIRARD, A.W. Biological Mechanisms for Nutritional Regulation of Maternal Health and Fetal Development *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, v. 26, p. 4–26, 2012.

WU, G. Dietary protein intake and human health. *Food & Function*, v. 7, n. 3, p. 1251–1265, 2016.

XUE, L.; YANG, K.; NEWMARK, H.; LIPKIN M. Induced hyperproliferation in epithelial cells of mouse prostate by a Western-style diet. *Carcinogenesis*, v. 18, n. 5, p. 995–999, 1997.

ZAMBRANO, E.; RODRÍGUEZ-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.

ZANA-TAIEB, E.; BUTRUILLE, L.; FRANCO-MONTOYA, M.L.; LOPEZ, E.; VERNIER, F.; GRANDVUILLEMIN, I.; EVAIN-BRION, D.; DERUELLE, P.; BAUD, O.; DELACOURT, C.; JARREAU, P.H. Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs: morphometric and gene expression analysis., *PLoS One*, v. 21, p. 1-11, 2013.

ZHANG, D., VETRIVEL, L.; VERKMAN, A. S. Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production. *J. Gen. Physiol.*, v. 119; p. 561–569, 2002.

ARTIGO

**Maternal protein restriction impairs angiogenesis through downregulation of
AQP1 and VEGF signaling in rat prostate offspring**

Ketlin T Colombelli¹; Sérgio AA Santos¹; Ana CL Camargo¹; Flávia B Constantino¹;

Caroline N Barquilha¹; Jaqueline C Rinaldi¹; Luis A Justulin¹

¹. Department of Morphology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

Corresponding author: Luis A Justulin, Sao Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, SP, Brazil. Phone number: +551438800481. email: justulin@ibb.unesp.br

Running Title: **AQP1 and VEGFA signaling during prostatic angiogenesis**

ABSTRACT

The impairment of offspring prostate development and growth has been demonstrated in model of maternal protein malnutrition (MPM). Moreover, some studies have shown reduction of angiogenesis in brain and lung in offspring of protein restricted dams. The aim of our study is to verify whether MPM (gestational and lactational periods) alters angiogenesis in the ventral prostate (VP) of males offspring. Male *Sprague Dawley* rats born of mothers that received normal diet (23% of protein) (Control Group-CTR) or low protein diet (6% of protein) during the gestational (GLP group), or during the gestational and lactational (GLLP group) were weighted and euthanized at post natal day (PND) 10 and 21. The urogenital complex (UGC) or VP lobes were harvested and processed for morphological, immunohistochemical and western blot analyses. The body weight, UGC and VP weights were reduced in restricted groups compared to age-matched CTR. Luminal and epithelial compartments of VP were smaller in restricted groups compared to CTR. It was observed a reduction of cell proliferation (Ki67), androgen receptor (AR), basal cell (p63) and smooth muscle α -actin expression at PDN10 in both restricted groups. The microvascular density decreased in restricted groups, especially in the subepithelial localization. This result was associated with reduction in the VP expression of aquaporin-1 (AQP-1), VEGF and its receptor (VEGF-R). In summary, the MPM induced impairment in VP microvascular angiogenesis through downregulation of AQP-1 and VEGF signaling. This reduction impaired bidirectional exchanges between blood vessels and prostate tissues contributing to a delay in cellular differentiation and prostate growth in male offspring.

INTRODUCTION

Malnutrition is a worldwide problem, affecting especially developing countries. Among population, pregnant and newborns are the most affected by undernutrition, leading to important risks for increased morbidity and mortality in newborn infants (Gao et al., 2012). Maternal undernutrition, which results in increased risk for offspring developing chronic diseases, has been defined as developmental origins of adult disease, also called “Barker hypothesis” (Barker et al., 1989). It states that insults during intrauterine life can result in permanent changes in physiology and metabolism (Barker 1995; 1998; Godfrey & Barker, 2000; Charles et al., 2016). However, the molecular mechanisms underlying increase in diseases late in life are still unclear (Davis et al., 2016). Thus, animal models of early growth restriction have been developed in an attempt to elucidate the relationship between intrauterine malnutrition and adult diseases. Among the experimental models, dams fed with low protein diet is one of the most studied (Ozane & Hales, 1999; Ozane, 2001; Rinaldi et al., 2013; Sene et al., 2013; Pinho et al., 2014; Oliveira et al., 2016; Vega et al., 2016). The protein malnutrition model is characterized by an imbalance between the supply of nutrients and body demand responsible for ensuring the proper functioning of the body (Antiwi, 2008).

Although the effects of maternal protein malnutrition (MPM) have been first described in cardiorespiratory system, in the last decade, experimental models have demonstrated that MPM also affects offspring reproductive parameters, such as decrease reproductive capacity in adult rat female offspring (Guzman et al. 2006; 2014) or reduction in testosterone levels (Ramos et al., 2010; Rinaldi et al., 2013; Pinho et al., 2014) and reproductive capacity in rat male offspring (Rodríguez-González et al., 2014).

Considering that prostate gland produces part of seminal fluid, essential for reproductive biology, it has been hypothesized that prostatic development and secretory function could be affected by MPM. Ramos et al. (2010) demonstrated delay in dorsal prostate development in rat offspring of dams fed low protein diet during lactation. Afterward, other authors demonstrated delay in prostate morphogenesis at PND1 (Pinho et al., 2014) or maturation at PND30 and 120 in offspring from dams fed low protein diet during gestation (Rinaldi et al., 2013).

In spite of prostatic dependence of androgen for development and maintenance (Cunha et al., 1987), other factors such as cytokines, adhesion molecules and growth factors are important for development, maturation and maintenance of glandular function (Timms et al.

1994; Prins & Putz, 2008). Another key factor is the nutritional support and oxygen supplied by blood vessels (Wong et al., 2014). They are also responsible to delivery signaling molecules for the prostate morphogenesis (Carmeliet, 2005). The development of microvessel network and the growth/elongation of the prostatic buds during glandular morphogenesis are intimately associated (Wong et al., 2014). Among the regulatory genes involved in angiogenesis and vasculogenesis process is the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR (Ferrara et al., 2003).

Although endothelial cells do not express AR, studies have demonstrated the indirect involvement of androgens in the maintenance of vascular structure, and increased expression of angiogenic factors such as VEGF, VEGF-B, PLGF, and FGF-2 which act in a paracrine, inducing direct endothelial proliferation (Prins et al., 1991). In this context, experimental models of MPM during gestational and/or lactational periods demonstrated reduction in the number of vessels in the brain, duodenum (Bennis-Taleb et al., 1999) and pancreas (Snoeck et al., 1990) in rats. It is also reported reduction in the number of vessels and their branches in the mesentery and kidney medulla (Khorram et al., 2007).

Considering the importance of nutritional support and oxygen supplied by blood vessels for prostate morphogenesis, maturation and maintenance, in this study, we assessed whether a reduction of maternal protein intake impacts the process of angiogenesis in the ventral prostate of male rat offspring. We also related the changes in vascular morphogenesis to the prostate development.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

In our experiment we used an established low protein diet (Rinaldi et al., 2013, Sene et al., 2013, Pinho et al., 2014), provided by PragSoluções (PragSoluções, SP, Brazil). All procedures described in this study were approved by the Biosciences Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Experimentation (Protocol number 670). Briefly, adult female (90 days of age, n=30) and male (90 days of age, n=10) Sprague Dawley rats were obtained from the Central Stock breeder at the State University of Campinas-UNICAMP (Campinas, SP, Brazil). The animals were maintained under controlled temperature conditions (22 to 25°C), relative humidity (55 %), and a 12 hr photo period with free access to water and chow.

Virgin female rats were mated overnight with established male breeders and after confirmation of mating, pregnant rats were housed individually in standard rat cages and were given *ad libitum* access to an isocaloric and normosodic normal diet (23% protein) or low protein diet (6% protein) during gestation or during gestation and lactation. To maximize lactation performance, litters were reduced to eight pups at PND1: four males and four females (Fischbeck & Rasmussen; 1987, Rinaldi et al., 2013). Thus, the dams were divided into three experimental groups: Control (CTR) fed normal protein diet; Gestational low protein (GLP) fed low protein diet during gestation; and Gestational and Lactational protein (GLLP) fed low protein diet during gestation and lactation.

Maternal body weight was determined at the beginning of gestation (GD1) and at the end of gestational period (GD21). The difference between body weight at GD21 and GD1 was used to demonstrate the maternal body weight variation. Food intake of the dams and pups were measured throughout the experimental period. To calculate the relative food intake, the value of ingested food was divided by the rat body weight. The male offspring anogenital distance (AGD) was determined using a digital caliper (Digimess®, Brazil) on PND1, 10 and 21. On PND 10 and 21, male rats from CTR, GLP and GLLP groups (n = 15/group) were weighed, euthanized using sodium pentobarbital anesthesia (60 mg/kg, i.p.) followed by decapitation. Blood samples were collected from ruptured cervical vessels. At PND10, the urogenital complex (UGC, urethra, seminal vesicles and prostatic lobes) were dissected out and weighed. In the groups of 21 days old, the ventral prostatic lobes (VP) were removed, weighed and processed as described below. As the rodent prostate development initiates at the end of gestational period and persists after delivery, the ingestion of low protein diet during pregnancy and lactation impacts the period of intense prostate development (Prins & Putz, 2008).

Histological procedure

Samples of the UGC of PND10 and VP of PND21 from different experimental groups (n =5/group) were fixed in metacarn (70% methanol + 20% chloroform + 10% acetic acid) and after 4 hours, the samples were dehydrated in ascendant series of ethanol, diaphanized in xylene and embedded in Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO). Sections of 5µm were produced in rotary microtome, collected in silanized slides and stored until the time of use. The slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) for morphological and stereological analyses. The sections were analyzed in a Leica DMLB 80 microscope connected to a Leica

DC300FX camera. The digitalized images were analyzed using Leica Q-win software Version 3 for Windows.

The relative proportion of the prostate components (epithelium, stroma and lumen) was determined by stereological analysis (Weibel et al. 1966). Random measurements were performed in 5 different fields (40X) and from five different individual prostatic lobe sections. The relative values were determined by counting the coincident points of the test grid and dividing them by the total number of points. The results were expressed as a percentage of each component as a proportion of total area analyzed.

Determination of ki67, AR, and p63 indexes at PND10

In order to determine whether MPM interferes with molecular markers of cellular differentiation, we developed immunohistochemical analysis of Ki67, AR, p63 and α -actin in VP lobes at PND10 (n=5/group). Histological sections were subjected to antigen retrieval in pressure cooker with 10 mM sodium citrate buffer pH 6.0 for 30 minutes. The slides were immersed in a solution containing 3% hydrogen peroxide diluted in methanol to block endogen peroxidase for 10 min. Then, the sections were washed in PBS followed by 3% milk diluted in PBS to block unspecific protein-protein interactions. The slides were incubated overnight at 4°C with the follow primary antibodies: monoclonal anti-Ki-67 (diluted 1:150; ab16667-Abcam); polyclonal anti-androgen receptor (AR, 1:100; sc816-Santa Cruz®); rabbit monoclonal anti-p63 (1:200; 5849 Bio SB), and mouse monoclonal α -actin (1:100, sc32251-Santa Cruz®), all diluted in 1% BSA in PBS. The sections were washed 3X in PBS for 5 minutes and incubated with the specific secondary antibodies marked with peroxidase at room temperature. The reactions were developed using diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin. Ki67, AR and p63 indexes were expressed as percentage positive cells of the total cells counted. The results were expressed as mean \pm SD.

Determination of microvascular density (MVD) and VEGF signaling molecules

The MVD was determined in five histological sections of five VP lobes (40x) at PND10 and PND21 immunostained for monoclonal anti-aquaporin 1 (AQP-1, 1:100, AB 2219-Millipore), a water channel protein strongly expressed in most microvascular endothelial cells (Verkman, 2002). The MVD was determined by stereological analysis (Weibel et al. 1966). Data are expressed as percentage of microvessel per total area analyzed. The prostatic localization of VEGF and VEGFR, a central molecular signaling involved in the

angiogenic process was also investigated. The slides of VP from all experimental groups at PND10 and PND21 were processed for immunohistochemistry (as described above) by using the primary antibody anti-VEGF (1:100; sc152-Santa Cruz®) and VEGFR (1:100; sc6251-Santa Cruz®).

Western blotting

Frozen samples of VP lobes (n=5/group) from all experimental groups at DPN10 and PND21 were homogenized in extraction buffer (50 mM Tris-HCl, 0.25 % Triton-X 100), centrifuged and the total protein was determined as proposed by Bradford (1976). A total of 35µg were analyzed by electrophoresis using SDS-PAGE gel. Protein was trans-blot onto the nitrocellulose membrane (Millipore, USA). Blots were blocked in 5% nonfat milk diluted in PBS, incubated with the follow primary antibodies: anti-VEGF (1:1000; sc152-Santa Cruz®); anti-VEGFR (1:1000; sc6251-Santa Cruz®) anti-aquaporin-1 (1:1000; AB 2219-Millipore). The blots were washed in PBS and incubated with specific secondary antibody for 1 hour. After washing with PBS again, the reactions were detected using ECL kit (Amersham, USA). The substrate was removed from the membranes, and ECL signals were captured using a CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®; GE Healthcare™). The integrated optical densities (IODs) of the targeted protein bands were measured using Image J, which was downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The expression levels were normalized to the β-actin (1:800; sc1615-Santa Cruz®) and the normalized results were expressed as the mean±SD.

Gelatin zymography

The gelatinolytic activity of MMP-2 was determined by gelatin-zymography as proposed by Justulin et al. (2010). Briefly, a total of 28 µg of protein from different experimental groups (n=5/group) were load in 8% polyacrylamide gels co-polymerized with 0.1% gelatin (Merck). After electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5% Triton X-100. Then, the gels were washed in 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Gels were incubated overnight in the activation buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂). After that, the gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 and de-stained with 20% methanol and 10% acetic acid. The clear bands of MMP-2 were quantified by densitometric analysis using Image J downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).The values were expressed as the mean±SD.

Statistical analysis

The statistical analyzes were performed using GraphPad Prism® software (version 5.00, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). To compare the CTR and GLP dams groups, we used the "t" test with Welch correction. The other results were submitted to analysis of variance - ANOVA, followed by "Tukey-Kramer." The results were expressed as mean±SD and statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

Reproductive parameters of dams and pups at PND0

There is no difference between dams body weight at the GD1. At the end of gestational period, both maternal body weight and weight gain were lower in restricted group compared to CTR. The absolute and relative food consumption did not differ between experimental groups (Table 1). These parameters were also evaluated at the end of lactation. The maternal body weight and weight gain were lower in GLLP compared to the CTR and GLP groups. The maternal absolute food consumption was reduced in both restricted groups, with significant differences detected between all groups (CTR>GLP>GLLP). The relative food consumption was lower only in GLLP group than the other age-matched groups (Table 2). The litter size, gestational length and male/female ratio did not differ between experimental groups (data not shown). The male pups born to undernourished dams showed low birth weight, as well as DAG compared to the CTR (Table 3).

Biometric parameters of male pups at PND10 and 21

The absolute measures of body weight, DAG, UGC and VP weights were significantly lower in GLP and GLLP groups compared to the age-matched CTR groups in both age (Table 4). These differences were more evident in the GLLP compared to the other groups (CTR>GLP>GLLP). Only the VP relative weight remained significantly lower in both restricted groups compared to age-matched CTR group (Table 4).

Morphology and morphometric analyzes of the ventral prostate at PND10 and PDN21

In both ages, the prostatic lobes from restricted groups demonstrated an evident delay in glandular development and growth compared to the age-matched CTR groups. The VP lobes from restricted groups at PND10 showed impairment in cellular polarization and acinar

luminization. This aspect was more evident at the distal region of ductal tips in the GLLP group (Figure 1). Although the glandular growth progressed throughout the experimental period, the delay in glandular maturation persisted until PND21 in restricted groups. It was also observed an decrease in luminal area and an increase in stromal compartment (Figure 1). These results were confirmed by morphometric-stereological analyzes (Table 4).

Determination of Ki67, AR, p63 and α -actin expression

The ki67 positive cells were detected in both epithelial and stromal compartments. However, the number of ki67 positive cells was reduced in the restricted groups compared to CTR group (Figure 2). The AR expression was detected in both epithelial and stromal cells. In the CTR group, the positive cells were detected mainly in the nucleus of epithelial cells, but stromal cells also demonstrated positive reaction of AR. On the other hand, in restricted groups, the number of positive epithelial cells was markedly reduced and a great number of positive nuclei were seen in the stromal compartment (Figure 2). The immunostaining for protein p63, a molecular marker of basal cells, demonstrated an increase of basal cells number in the restricted groups compared to the CTR group (Figure 2). The intensity of α -actin immunoreaction was visually reduced in GLP and GLLP groups. This result suggests a delay in the differentiation of muscle cells in the VP of restricted offspring (Figure 2). The determination of Ki67, AR and p63 indexes confirmed the results observed in the immunohistochemistry reaction (Figure 2).

Determination of AQP-1, VEGF, VEGFR expression and microvascular density (MVD)

The MPM reduced the expression of VEGF in VP of offspring in both age (PND10 and PND21), with significant differences observed in the GLLP groups compared to the age-matched groups (Figure 3). The VEGF-R expression also decreased in the restricted groups, with statically difference between all experimental groups (GLLP<GLP<CTR) (Figure 4). The immunoreaction for AQP-1, used to visualize the VP microvasculature, demonstrated an evident reduction in blood supply, mainly in the subepithelial capillaries in restricted group compared to CTR at PND 10 (Figure 5). This reduction persisted until PND21, although without statically differences in relation to the CTR. The determination of MVD confirmed the results of immunohistochemistry (Table 4).

Gelatin Zymography

The endothelial cell migration requires a coordinate remodeling of the vascular basement membrane and the extracellular matrix (ECM) to allow microvascular sprouting (Rundhaug, 2005). Thus, the gelatinolytic activity of MMPs was quantified by gelatin-zymography in the VP to correlate the extracellular matrix (ECM) remodeling to the growth of vascular network. At PND10, the activity of inter and active bands of MMP-2 was reduced compared to the CTR, whereas at PND21, only the active form remained decreased that age-matched CTR (Figure 6). There is no detectable activity of MMP-9 in the VP in both ages.

DISCUSSION

The novelty of our study is to demonstrate the impairment of subepithelial angiogenesis in the offspring rat ventral prostate from protein malnourished dams through downregulation of VEGFA signaling pathway, AQP1 and MMP2. We believed that decrease in microvascular density is related to the impairment of cellular differentiation and impairment of prostate morphogenesis and growth.

A large number of clinical and experimental studies demonstrated the negative impact of intrauterine malnutrition on the offspring metabolomic, leading to the development of metabolic syndrome, type 2 diabetes and cardiovascular diseases with aging (Barker et al., 1989; Langley-Evans & Sculley, 2006; Barker & Thornburg, 2013; Dearden & Ozanne, 2014; Tarry-Adkins & Ozanne 2014; Hivert et al., 2015; Thornburg et al., 2015; Charles et al., 2016). Among experimental model of fetal programming, a protein restricted diet offered to pregnant rats has been the most used (Ozanne 2001, Zambranno et al., 2014). According Benevenga et al. (1995) the amount of protein required to maintain the normal reproductive performance in Sprague-Dawley pregnant rats is 12% in diet. We used a normosodic and isocaloric low protein diet composed of 6% protein in restricted groups compared to 16% protein in control group. The efficacy of this diet in inducing offspring low birth weight, a clinical evidence of fetal programming, was confirmed early by Rinaldi et al. (2013) and Pinho et al. (2014). In our experiment, we also found a decreased body weight at birth and reduced AGD in male offspring. The maternal body weight gain during gestational or gestational and lactational periods was lower in undernourished dams compared to CTR dams. Other authors already demonstrated the nutritional status of the mother during gestation and lactation is essential to the normal growth and development in humans and experimental

animals (Barker, 1998; Ozanne 2001; Zambrano et al., 2005; Rinaldi et al., 2013; Pinheiro et al., 2013; Pinho et al., 2014).

With regard to reproductive parameters, it has been demonstrated that MPM delays sexual maturation and decreases reproductive capacity in adult rat female offspring (Guzman et al. 2006; 2014). In male, it was observed reduction in ano-genital distance, testosterone levels (Ramos et al., 2010; Rinaldi et al., 2013; Pinho et al., 2014) and in reproductive capacity (Rodríguez-González et al., 2014). Although the negative effects of MPM on offspring reproduction has been described, the impact of maternal protein restriction on the pups prostate has gained attention only in the last five or six years. The first authors to highlighted the result of maternal protein restriction on prostate was Ramos et al. (2010), which demonstrated reduction in glandular compartment of dorsal prostate lobe in offspring rat of dams fed low protein diet during lactation. Afterward, other authors demonstrated delay in prostate morphogenesis at PND1 (Pinho et al., 2014) or maturation at PND30 and 120 in offspring from dams fed low protein diet during gestation (Rinaldi et al., 2013). These results have been associated with a reduction in cellular proliferation and differentiation influenced by decreased in testosterone and DHT serum levels in the male offspring (Rinaldi et al., 2013; Pinho et al., 2014). Here, we also demonstrated reduction in AGD, serum testosterone levels, cellular proliferation and differentiation and highlighted the reduction of microvascular anigogenesis as a new event involved with impairment of prostate morphogenesis and growth in restricted offspring.

Although prostate development and secretory function depend on androgen stimulation, a plethora of cytokines, adhesion molecules, growth factors and nutrients and oxygen (supplied by blood vessels) are also essential for maintenance of prostatic growth and function. Wong et al. (2014) suggested there is coordinate spatial and temporal distribution of vascular network and branch tips of prostatic ducts since the early phase of development in mice. In our study, we demonstrated the distribution of a great network of subepithelial capillaries in CTR and a significant reduction of microvascular density, mainly at the subepithelial region in offspring from restricted dams. This result was also confirmed by the calculation of MVD/Stromal ratio, which demonstrated that even the stromal compartment had increased in VP of restricted animals and the stromal vasculature was reduced. We associated these changes to the impairment of glandular morphogenesis in these animals. Our proposal is supported by other studies which demonstrated reduction in angiogenic process in

pups born to low protein fed dams, such as in the brain, duodenum (Bennis-Taleb et al., 1999), pancreas (Snoeck et al., 1990) and kidney medulla (Khorram et al., 2007).

In order to elucidate a possible pathway involved in the reduction of microvascular density in restricted pups, we investigated the VEGFA and VEGFR2 protein expression in the VP offspring. Both VEGFA and VEGFR2 were downregulated in VP from restricted offspring, especially in GLLP group. The VEGFA belongs to the Platelet-derived growth factor receptor (PDGF) supergene family, which also includes VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF and Placenta Growth Factor (PlGF) (Ferrara et al., 2003). Among that, VEGFA is found to be the most important member of proangiogenic factor that induces endothelial cell proliferation, sprouting, migration and tube formation (Tammela et al., 2005). The VEGFA signaling is mediated by the specific receptors, VEGFR1 and 2. The VEGFR2 regulates the endothelial mitogenic activity of VEGFA, whereas VEGFR1 acts as a negative regulator of VEGFR2 (Cebe-Suarez et al., 2006). Thus, the reduction of VEGFA and VEGFR2 in protein restricted offspring can be associated with decrease in microvascular density and delay in VP development. Similar results were observed by Liu et al., (2014) which described that downregulation of VEGF signaling plays a central role in the impairment of lung development in offspring of maternal protein restricted dams.

Although the recognized importance of VEGF for angiogenic process, it has been demonstrated that VEGF also exerts a central role in mammary gland differentiation and milk production, since inactivation of VEGF impairs mammary gland alveologenesis and epithelial differentiation during lactation and administration of recombinant VEGF reversed this effect (Rossiter et al., 2007). Here, we also observed impairment in cellular differentiation and proliferation in restricted groups, as demonstrated increase in p63 positive basal cells, reduction in AR positive luminal cells and for the immunostaining of stromal α -actin. The reduction of cellular differentiation markers was also demonstrated for Pinho et al, (2014) in restricted offspring at PND1. Taken together, our results demonstrated that reduction in microvascular density, mainly in the subepithelial region can lead to an ineffective diffusion of hormones, growth factors and oxygen, resulting in decreased stimulatory molecules related to cellular differentiation and glandular morphogenesis.

In addition to VEGF signaling, it has been demonstrated the central role of AQP1 as the inductor of angiogenesis in both normal and pathologic condition (Saadoun et al., 2005). AQP1 belongs to a family of proteins expressed on the plasma membrane of cells involved in fluid transport (Sha et al., 2011). AQP1 expressed in various organs and cells (microvascular

endothelial cells, kidney, central nervous system, eye, lacrimal and salivary glands, respiratory apparatus, gastrointestinal tract, hepatobiliary compartments, female and male reproductive system). The increase in AQP1 expression has been associated with stimulation of endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis (Clapp & de la Escalera, 2006). AQP1 is strongly expressed in most microvasculature endothelial cells (Au et al., 2008; Kim & Jung, 2011) and it can be used as a molecular marker for vascular microstructure. We believe that decrease of AQP1 in restricted groups may be associated with reduction in microvascular density through downregulation of endothelial cell proliferation and migration in the ventral prostate.

The angiogenic progression requires a coordinate remodeling of the vascular basement membrane and the extracellular matrix (ECM) to allow endothelial cells migration and sprouting (Rundhaug, 2005). The matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-dependent endopeptidases that degrade virtually all components of the ECM. The MMPs are synthesized as inactive zymogens that need to be proteolytically cleaved to be active. Among the MMPs members, a number of studies have pointed to the essential role of MMP2 and 9 (also named as gelatinases A and B, respectively) in the onset of angiogenesis (Gioia et al., 2009). Although Bruni-Cardoso et al., (2010) demonstrated that MMP-2 contributes to the prostate development by inducing epithelial growth and morphogenesis, it has been demonstrated that MMP-2 activation is stimulated by VEGFA in the endothelial cells of in vivo (Wary et al., 2003) and in vitro model of vessel formation (Burbridge et al., 2002). Thus, the reduced gelatinolytic activity of MMP2, mainly observed in the active form in restricted offspring groups can be related to the downregulation of VEGFA expression. We believe these results contributed to the impairment of prostate morphogenesis and reduction of microvascular sprouting in the ventral prostate of the restricted animals.

In summary, our results have shown a delay in prostate development and an important unbalance between proliferation/differentiation rates in the prostate of GLP and GLLP animals. The angiogenesis process was impaired and the prostate of GLP and GLLP animals presented lower microvascular density in relation to CTR animals, especially in subepithelial region. This might be responsible to alter bidirectional flow of molecules between blood and prostate tissue, contributing to delay of the prostate development (Figure 7).

CONCLUSION

In conclusion, to our knowledge, this is the first study demonstrating that MPM impairs prostatic microvascular angiogenesis in male offspring. We propose that reduction in microvasculature is associated with delay in cellular proliferation and differentiation, contributing to the impairment of prostate morphogenesis and growth. Whether these changes persist during aging need to be investigated, but it is possible that impairment of prostatic angiogenesis can be responsible, at least in part, for unbalance in prostate homeostasis in the adulthood.

ACKNOWLEDGEMENT

We are very grateful to Suelen Franco, Bianca Martins and Luiz Marcos Frediani Portela for their technical assistance and César Claro Trevelin for the illustration. This study was supported by São Paulo Research Foundation, grant no. 2013/24230-5.

REFERENCES

- ANTIWI, S. Malnutrition: Missed Opportunities for Diagnosis. *Ghana Med J.*, v. 42, p. 101-104, 2008.
- AU, C.G.; BUTLER, T.L.; EGAN, J.R.; COOPER, S.T.; LO, H.P.; COMPTON, A.G.; NORTH, K.N.; WINLAW, D.S. Changes in skeletal muscle expression of AQP1 and AQP4 in dystrophinopathy and dysferlinopathy patients. *Acta Neuropathol.*, v. 116, p. 235-46, 2008.
- BARKER DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*. v. 95, p. 115-28, 1998.
- BARKER DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today*. v.1, p. 418-23, 1995.
- BARKER, D.J.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, M.E.J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.*, v. 298, p. 564- 567, 1989.
- BARKER, D.J.; THORNBURG, K.L. The obstetric origins of health for a lifetime. *Clin Obstet Gynecol*, v. 56, p. 511-9, 2013.
- BENEVENGA, N.J.; CALVERT, C.; ECKHERT, C.D.; FAHEY, G.C.; GREGER, J.L.; KEEN, C.L. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: Benevenga NJ, Calvert C, Eckhart CD, Fahey GC, Greger JL, Keen CL, et al, editors. *Nutrient requirements of laboratory animals*. 4th ed. Washington: National Academy Press; p. 11–79, 1995.
- BENNIS-TALEB, N.; REMACLE, C.; HOET, J.J.; REUSENS, B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr.*, v. 129, p.1613-9, 1999.
- BRUNI-CARDOSO, A.; LYNCH, C.C.; ROSA-RIBEIRO, R.; MATRISIAN, L.M.; CARVALHO, H.F. MMP-2 contributes to the development of the mouse ventral prostate by impacting epithelial growth and morphogenesis. *Dev Dyn.*, v. 239, p. 2386-92, 2010.
- BURBRIDGE, M.F.; COGÉ, F.; GALIZZI, J.P.; BOUTIN, J.A.; WEST, D.C.; TUCKER, G.C.. The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogenesis.*, v. 5, p. 215-26, 2002.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *NATURE*, v. 438, p. 932- 936, 2005.
- CEBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJALLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life. Sci.*, v. 63, p. 601-615, 2006.
- CHARLES, M.A; DELPIERRE, C.; BRÉANT, B. Developmental origin of health and adult diseases (DOHaD): evolution of a concept over three decades. *Med Sci (Paris)*., v. 32, p. 15-20, 2016.

CLAPP, C.; ESCALERA, G.M. Aquaporin-1: a novel promoter of tumor angiogenesis Trends Endocrinol. Metab. v. 17, p. 1-2, 2006.

CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A.; COOKE, P.S.; MEE, S.; BIGSBY, R.M.; HIGGINS, S.J.; SUGIMURA, Y. The endocrinology and developmental biology of the prostate. Endocr Rev., v. 8, p. 338- 362, 1987.

DAVIS, K.; CHAMSEDDINE, D.; HARPER, J.M. Nutritional limitation in early postnatal life and its effect on aging and longevity in rodents. Exp Gerontol., v. S0531-5565(16)30128-0, 2016.

DEARDEN, L.; OZANNE, S.E. The road between early growth and obesity: new twists and turns Am J Clin Nutr. v. 100, p. 6-7, 2014.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; COUTER, L.E.J. The biology of VEGF and its receptors. J. Nat Med, v.9, p.669- 676, 2003.

FISCHBECK, K.L.; RASMUSSEN, K.M. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food restricted rats. J Nutr,v. 117, p. 1967–1975, 1987.

GAO, H.; SATHISHKUMAR, K.R.; YALLAMPALLI, U.; BALAKRISHNAN, M.; LI, X.; WU, G.; YALLAMPALLI, C. Maternal protein restriction regulates IGF2 system in placental labyrinth. Front Biosci, v. 4, 1434-50, 2012.

GIOIA, M.; MONACO, S.; VAN DEN STEEN, P.E.; SBARDELLA, D.; GRASSO, G.; MARINI, S.; OVERALL, C.M.; OPDENAKKER, G.; COLETTA, M. The collagen binding domain of gelatinase A modulates degradation of collagen IV by gelatinase B. J Mol Biol., v. 386, p. 419-34, 2009.

GODFREY, K.M.; BARKER, D.J. Fetal nutrition and adult disease. Am J Clin Nutr., v. 71, p. 1344-52, 2000.

GUZMAN, C.; CABRERA, R.; CARDENAS, 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.

GUZMÁN,C.; GARCÍA-BECERRA, R.; AGUILAR-MEDINA, M.A.; MÉNDEZ, I.; MERCHANT-LARIOS, H.; ZAMBRANO, E. Maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation negatively affects follicular ovarian development and steroidogenesis in the prepubertal rat offspring. Arch Med Res., v.45, p. 294-300, 2014.

HIVERT, M.F.; PERNG, W.; WATKINS, S.M.; NEWGARD, C.S.; KENNY, L.C.; KRISTAL, B.S.; PATTI, M.E.; ISGANAITIS, E.; DEMEO, D.L.; OKEN, E.; GILLMAN M.W. Metabolomics in the developmental origins of obesity and its cardiometabolic consequences. J Dev Orig Health Dis., v. 6, p. 65-78, 2015.

KHORRAM, O.; KHORRAM, N.; MOMENI, M.; HAN, G.; HALEM, J.; DESSAI, M.; ROSS, M.G. Maternal undernutrition inhibits angiogenesis in the offspring: a potential mechanism of programmed hypertension. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 293, p.745–753, 2007.

KIM, J.; JUNG, Y. Different expressions of AQP1, AQP4, eNOS, and VEGF proteins in ischemic versus non-ischemic cerebropathy in rats: potential roles of AQP1 and eNOS in hydrocephalic and vasogenic edema formation. *Anat Cell Biol.*, v. 44, p. 295- 303, 2011.

LANGLEY-EVANS, S.C.; SCULLEY, D.V. The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. *FEBS Lett*, v. 580, p. 4150–4153, 2006.

LIU, X.; LIN, Y.; TIAN, B.; MIAO, J.; XI, C.; LIU, C. Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats. *Int J Clin Exp Pathol.*, v.7, p. 3101-11, 2014.

OLIVEIRA, J.C.; GOMES, R.M.; MIRANDA, R.A.; BARELLA, L.F.; MALTA, A.; MARTINS, I.P.; FRANCO, C.C.; PAVANELLO, A.; TORREZAN, R.; NATALI, M.R.; LISBOA, P.C.; MATHIAS, P.C.; MOURA, E.G, Protein Restriction During the Last Third of Pregnancy Malprograms the Neuroendocrine Axes to Induce Metabolic Syndrome in Adult Male Rat Offspring. *Endocrinology.*, v. 15, p. 1799- 812, 2016.

OZANNE, S.E.; HALES, C.N. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism., *Nutr Soc.*, v. 58, p. 615-9, 1999.

OZANNE S.E. Metabolic programming in animals. *Br Med Bull*, v. 60, p. 143-52, 2001.

PINHEIRO, D.F.; PINHEIRO, P.F.; BURATINI, J.JR; CASTILHO, A.C.; LIMA, P.F.; TRINCA, L.A.; VICENTINI-PAULINO, M.D.E.L. Maternal protein restriction during pregnancy affects gene expression and immunolocalization of intestinal nutrient transporters in rats. *Clin Sci (Lond)*. v. 125, p. 281-9, 2013.

PINHO, C.F.; RIBEIRO, M.A.; RINALDI, J.C.; FELISBINO, S.L.; PINHEIRO, P.F.; DOMENICONI, R.F.; FOCHI, R.A.; BOER, P.A.; SCARANO, W.R. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reprod Fertil Dev.*, v. 26, p. 967-73, 2014.

PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, v. 76, n. 6, p. 641–659, 2008.

PRINS, G.S.; BIRCH, L.; GREENE, G.L. Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology.*, v. 129, p. 3187-3199, 1991.

RAMOS, C.D.A.F.; BABINSKI, M.A.; COSTA, W.S.; SAMPAIO, F.J. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl.*, v. 12, p. 180- 185, 2010.

RINALDI, J.C.; JUSTULIN, L.A. Jr; LACORTE, L.M.; SAROBO, C.; BOER, P.A.; SCARANO, W.R.; FELISBINO, S.L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Science.*, v. 92, p. 763-764, 2013.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G.L.; REYES-CASTRO, L.A.; VEGA, C.C.; BOECK, L.; IBÁÑEZ, C.; NATHANIELSZ, P.W.; LARREA, F.; ZAMBRANO, E. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr.)*, v. 36, p. 9721, 2014.

ROSSITER, H. BARRESI, C.; GHANNADAN, M; GRUBER, F.; MILDNER, M.; FODINGER,D.; TSCHACHLER,E.;
Inactivation of VEGF in mammary gland epithelium severely compromises mammary gland development and function. *FASEB J.*, v. 21, p. 3994-4004, 2007.

RUNDHAUG, J.E Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.*, v. 9, p. 267-85. 2005.

SAADOUN, S.; PAPADOPOULOS, M.C.; HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A.S. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption *Nature*, v. 434, p.789-792, 2005.

SENE, L.B.; MESQUITA, F.F.; MORAES, L.N.; SANTOS, D.C.; CARVALHO, R.; GONTIJO, J.A.; BOER, P.A. Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. *PLoS One*.v. 19, p.71310 2013.

SHA, X-Y.; XIONG, Z.F.; LIU, H.S.; DI, X.D.; MA, T.H. Maternal-fetal fluid balance and aquaporins: from molecule to physiology. *Acta Pharmacol Sin.* v. 32, p. 716- 720, 2011.

SNOECK, A.; REMACLE, C.; REUSENS, B.; HOET, J.J. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *J. Biol Neonate*, v.57, p.107- 118, 1990.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K.; PAAVONEN, K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.*, v. 65, p. 550-63, 2005.

TARRY-ADKINS, J.L.; OZANNE, S.E. The impact of early nutrition on the ageing trajectory. *Proc Nutr Soc.*, v. 73, p. 289-301, 2014.

THORNBURG, K.L. The programming of cardiovascular disease. *Dev Orig Health Dis*.v.6, p. 366-76, 2015.

TIMMS, T.L.; TRUONG, L.D.; MERZ, V.W.; KREBS, T.; KADMON, D.; FLANDERS, K.C.; PARK, S.H.; THOMPSON, T.C. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology*, v. 134, p. 1039-1045, 1994.

VEGA, C.C.; REYES-CASTRO, L.A.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G.L.; BAUTISTA, C.J.; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, M.; LARREA, F.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.A.; NATHANIELSZ, P.W.; ZAMBRANO, E. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a lowprotein diet and their offspring. *J Physiol.*, v. 594, p.1483- 9, 2016.

VERKMAN, A. Aquaporin water channels and endothelial cell function. *Journal of anatomy*, v. 200, n. 6, p. 617–627, 2002.

WARY, K.K. Signaling through Raf-1 in the neovasculature and target validation by nanoparticles. *Mol Cancer.*, v. 30; p. 2-27, 2003.

WEIBEL, E.R.; KISTLER, G.S.; SCHERLE, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology., *J Cell Biol.*, v.30, p.23-38, 1966.

WONG, L.; GIPP, J.; CARR, J.; LOFTUS, C.J.; BENCK, M.; LEE, S.; MEHTA, V.; VEZINA, C.M.; BUSHMAN, W. Prostate Angiogenesis in Development and Inflammation. *The Prostate*, v. 74, p. 346-358, 2014.

WONG, L.; GIPP, J.; CARR, J.; LOFTUS, C.J.; BENCK, M.; LEE, S.; MEHTA, V.; VEZINA, C.M.; BUSHMAN, W. Prostate Angiogenesis in Development and Inflammation. *The Prostate*, v. 74, p. 346-358, 2014.

ZAMBRANO, E.; RODRÍGUEZ-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.

Legends of Figures:

Figure 1. Representative sections of the ventral prostate lobes (VP) stained with hematoxylin–eosin. (CTR) control rats; rats whose mother were submitted to gestational low protein diet (GLP) or gestational plus lactational low protein diet (GLLP); PND: post-natal day; ep: epithelium; s: stroma; i: lumen.

Figure 2. Immunohistochemistry reaction against Ki67, AR, p63 and smooth muscle actin in VP from CTR, GLP and GLLP groups at PND10. Filled arrow: positive epithelial nuclei; dashed arrow: negative epithelial nuclei; Arrowhead: positive stromal nuclei; dashed circle: mitosis. Graphics represent percentage of positive cells for each marker in the VP from all experimental groups (n=5/group). Data were expressed as mean±SD. Different letters mean statically differences, with $p<0.05$.

Figure 3. Immunohistochemistry reaction against VEGFA in the VP from CTR, GLP and GLLP groups at PND10 and PND21. Graphics represent western blotting quantification of VEGFA expression (n=5/group). Data were expressed as mean±SD. Different letters mean statically differences, with $p<0.05$.

Figure 4. Immunohistochemistry reaction against VEGFR in the VP from CTR, GLP and GLLP groups at PND10 and PND21. Graphics represent western blotting quantification of VEGFR expression (n=5/group). Data were expressed as mean±SD. Different letters mean statically differences, with $p<0.05$.

Figure 5. Immunohistochemistry reaction against AQP-1 in the VP from CTR, GLP and GLLP groups at PND10 and PND21. Graphics represent western blotting quantification of AQP-1 expression (n=5/group). Data were expressed as mean±SD. Different letters mean statically differences, with $p<0.05$.

Figure 6. Representative gelatin-zymography in the VP (n=5/group) from CTR, GLP and GLLP groups at PN10 and PND21. Graphics represent the densitometric quantification of gelatinolytic activity all bands of MMP2. Data were expressed as mean±SD. Asterisks mean statically differences compared to CTR, with $p<0.05$.

Figure 7. Illustration of the ventral prostate acini from offspring rats whose mothers were fed with control or low protein diet during pregnancy. Observe the reduction of microvascularization in prostate of restricted animals, especially in subepithelial region. This might be responsible to alter bidirectional flow of molecules between blood and prostate tissue, contributing to delay the prostate development.

Table 1. Biometric parameters of pregnant rats

Dams Parameters	Gestational Period	
	CTR	GLP
Body weight GD 1 (g)	232.53 ± 25.28	237.84 ± 20.08
Body weight GD 21 (g)	368.04 ± 16.49 ^A	342.97 ± 17.42 ^B
Body weight variation (g)	135.50 ± 18.28 ^A	102.44 ± 28.75 ^B
Food consumption (g)	393.68 ± 27.92	429.00 ± 35.54
Food consumption/body weight	1.24 ± 0.40	1.29 ± 0.27

Data are expressed as mean±SD. Different letters demonstrate statistically difference between experimental groups. GD: Gestational Day; CTR: Control group; GLP: Gestational Low Protein group.

Table 2. Biometric parameters of lactational period of rats

Dams Parameters	Lactational Period		
	CTR	GLP	GLLP
Body weight PND 1 (g)	238.75 ± 26.50	235.78 ± 20.68	231.50 ± 24.56
Body weight PND 21 (g)	236.76 ± 17.93 ^A	224.03 ± 18.83 ^A	193.73 ± 13.00 ^B
Body weight variation (g)	1.99 ± 15.40 ^A	11.74 ± 12.37 ^A	36.14 ± 14.85 ^B
Food consumption (g)	677.80 ± 84.05 ^A	550.26 ± 93.91 ^B	372.54 ± 85.35 ^C
Food consumption/body weight	2.78 ± 0.54 ^A	2.55 ± 0.31 ^A	1.94 ± 0.50 ^B

Data are expressed as mean±SD. Different letters demonstrate statistically difference between experimental groups. CTR: Control group; GLP: Gestational Low Protein group; GLLP: Gestational and Lactational Low Protein group; PND: Post Natal Day.

Table 3. Male offspring biometric data at PND0

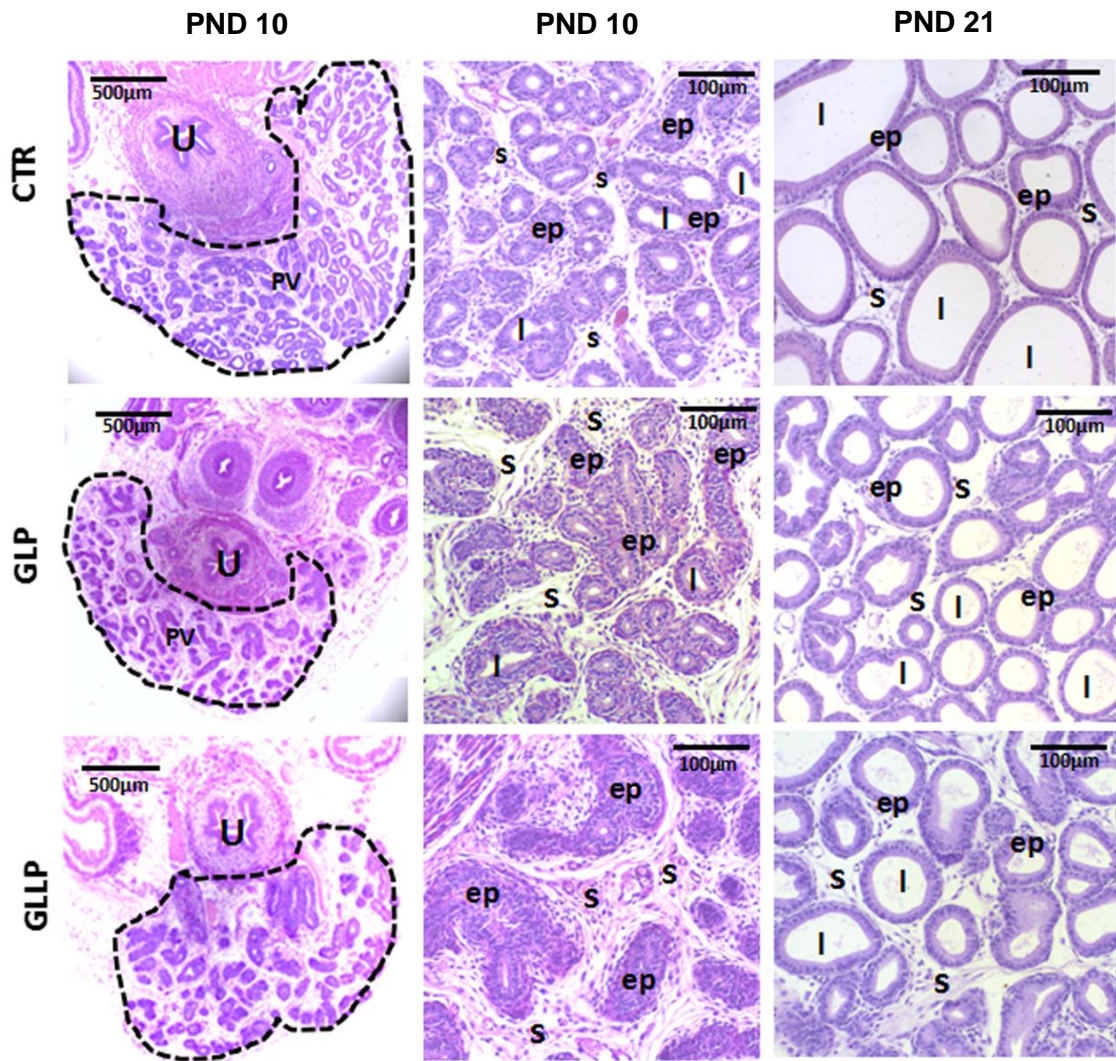
Parameters	Experimental Groups		
	CTR	GLP	GLLP
Biometric Data (n=12)			
Body weight (g)	7.23 ± 0.81 ^A	5.83 ± 0.96 ^B	5.79 ± 0.88 ^B
AGD (mm)	2.84 ± 0.42 ^A	2.62 ± 0.28 ^B	2.51 ± 0.33 ^B
AGD relative	0.39 ± 0.05 ^A	0.46 ± 0.11 ^B	0.45 ± 0.08 ^B

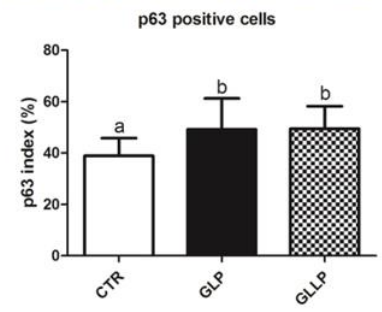
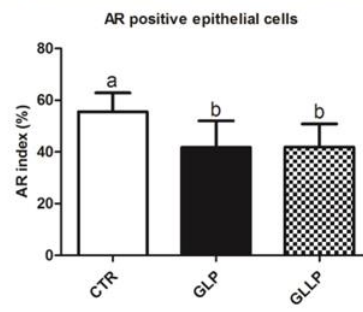
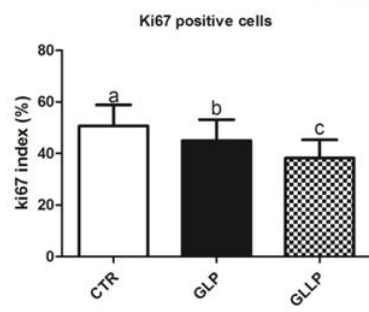
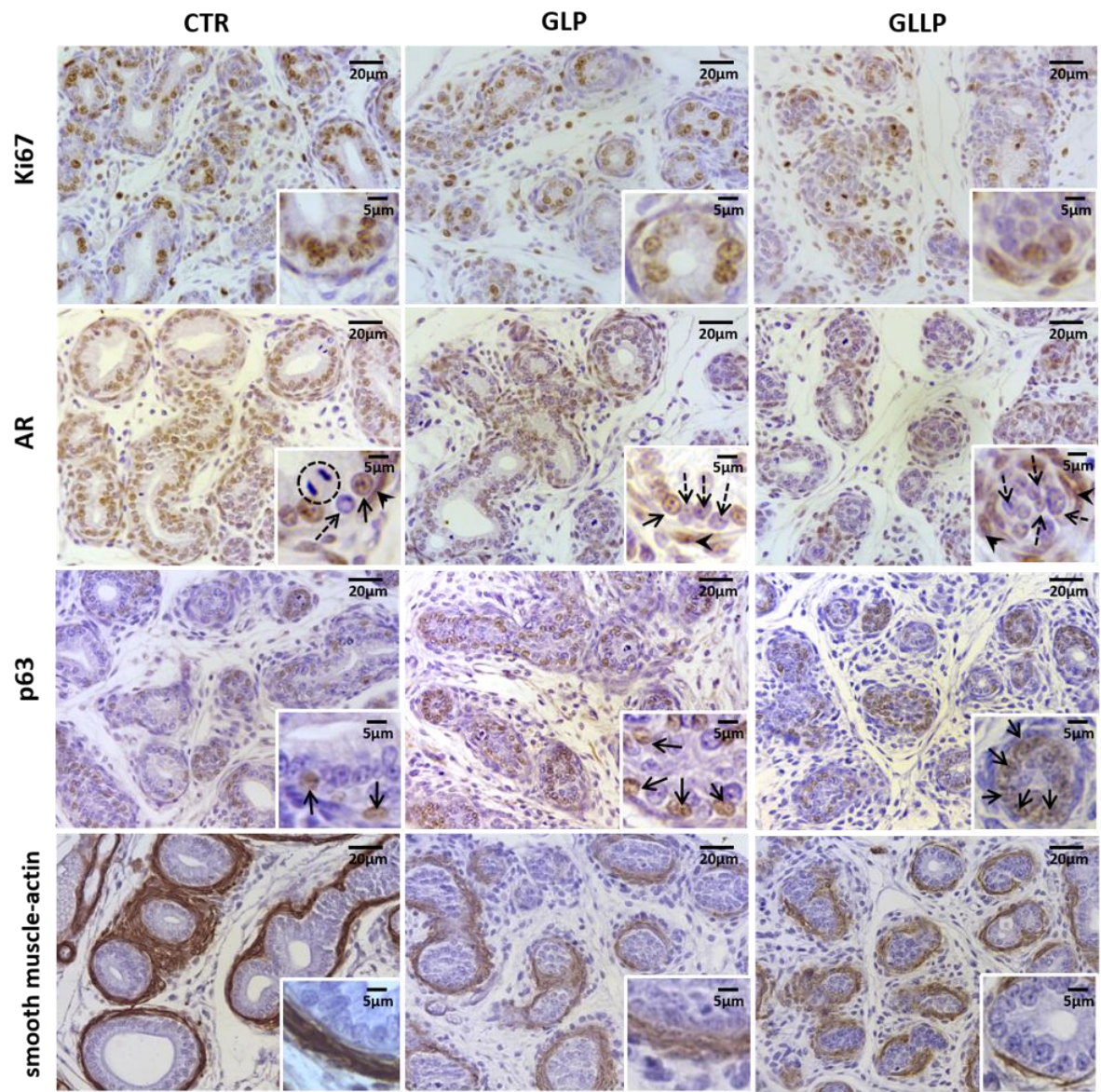
Values expressed as mean ± standard deviation. Different superscript letters indicate significant differences among experimental (p<0.05). AGD: Ano-Genital Distance; CTR: Control Group; GLP: Gestational Low Protein group; GLLP: Gestational and Lactational Low Protein group.

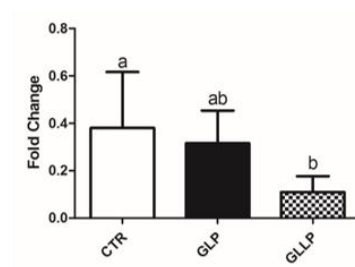
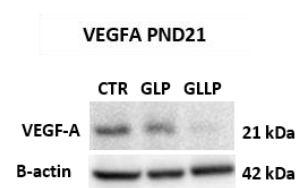
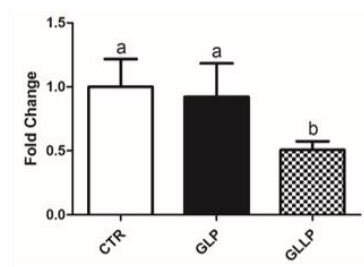
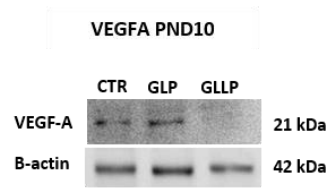
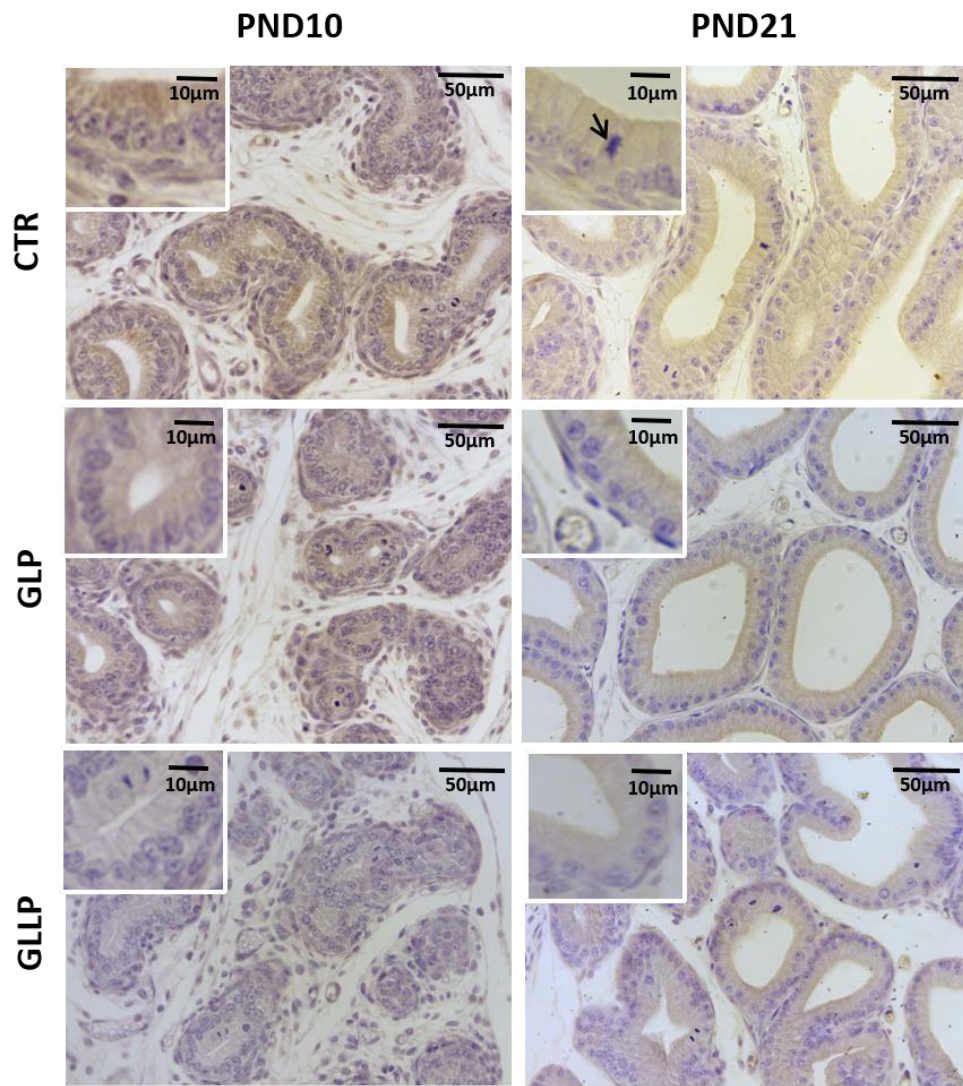
Table 4. Biometric and morphological-stereological parameters of ventral prostate of rat from different experimental groups.

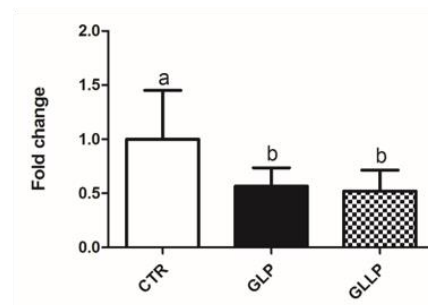
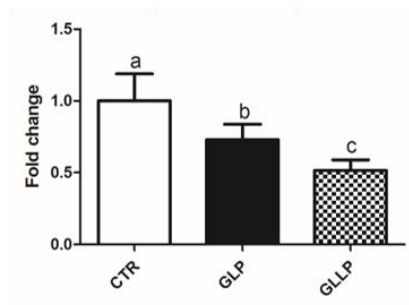
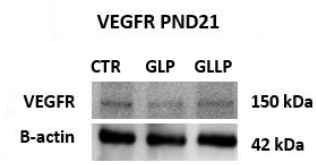
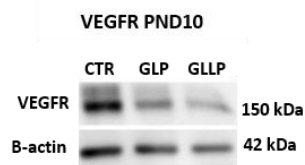
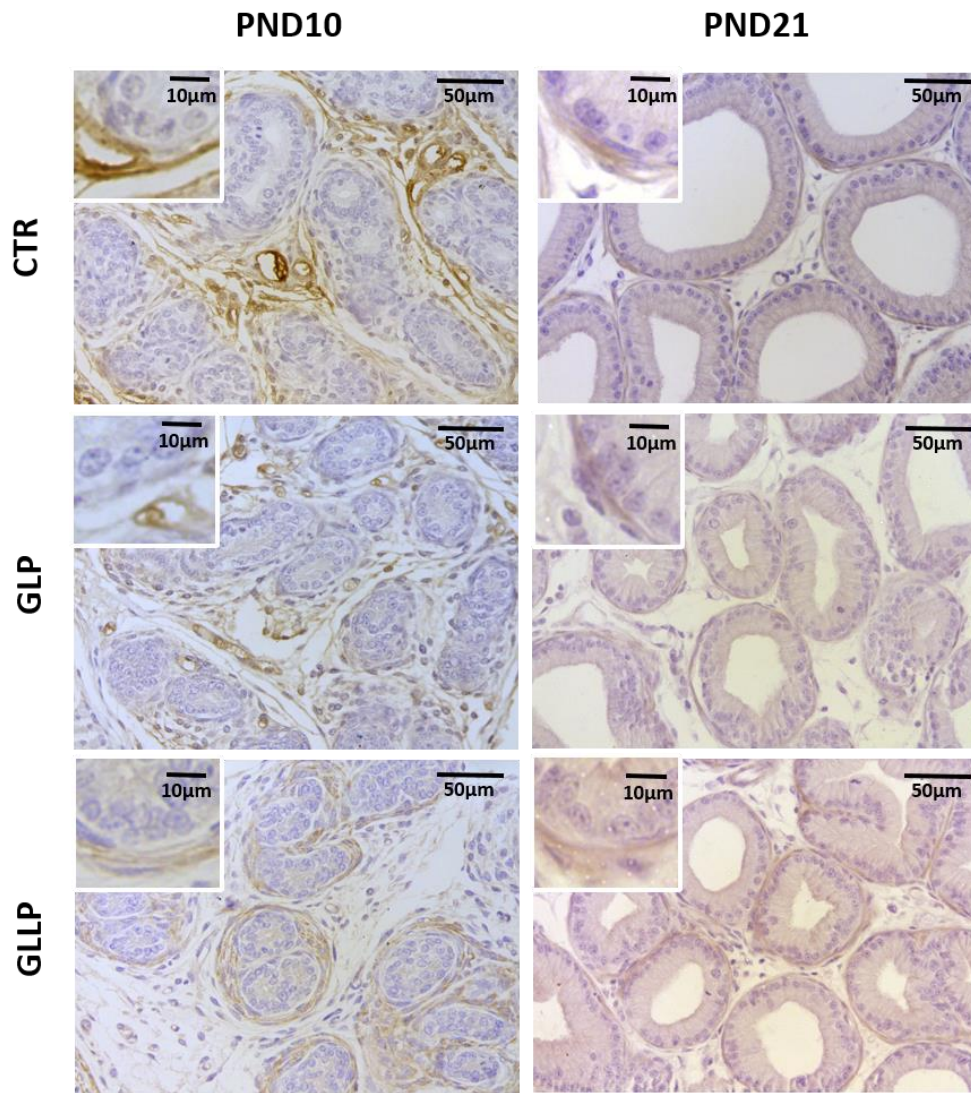
Parameters	Experimental Groups					
	CTR (PND10)	GLP	GLLP	CTR (PND21)	GLP	GLLP
Biometric Data (n=12)						
Body weight (g)	24.34 ± 2.23 ^A	18.85 ± 2.70 ^B	10.84 ± 1.98 ^C	39.25 ± 9.37 ^A	27.72 ± 6.82 ^B	20.03 ± 3.87 ^C
AGD (mm)	6.84 ± 0.64 ^A	6.37 ± 0.73 ^B	5.12 ± 0.57 ^C	10.69 ± 2.54 ^A	8.57 ± 1.55 ^B	7.25 ± 1.07 ^B
AGD relative	0.28 ± 0.035 ^A	0.33 ± 0.033 ^B	0.48 ± 0.08 ^C	0.27 ± 0.04 ^A	0.33 ± 0.06 ^{AB}	0.41 ± 0.06 ^C
VP absolute weight (n = 8) (mg)	4.13 ± 1.65 ^A	2.60 ± 0.83 ^B	1.68 ± 0.69 ^C	32.02 ± 7.95 ^A	26.51 ± 5.60 ^B	14.40 ± 3.87 ^C
VP relative weight	0.16 ± 0.06	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.06	1.16 ± 0.29 ^A	0.96 ± 0.18 ^B	0.79 ± 0.15 ^B
UGC absolute weight (mg)	65.84 ± 18.23 ^A	44.09 ± 7.01 ^B	23.27 ± 3.79 ^C	111.20 ± 14.83 ^A	84.65 ± 20.76 ^B	67.81 ± 15.47 ^B
UGC relative weight	2.16 ± 0.61	2.60 ± 0.31	2.25 ± 0.36	2.98 ± 0.52	3.08 ± 0.51	2.25 ± 0.34
Relative frequency of VP compartment						
Epithelium	52.53 ± 6.61 ^A	47.94 ± 8.57 ^B	46.17 ± 8.67 ^B	35.71 ± 7.45 ^A	45.45 ± 9.89 ^B	48.05 ± 7.53 ^B
Lumen	2.77 ± 2.30 ^A	1.44 ± 1.50 ^B	1.41 ± 1.42 ^B	45.46 ± 12.47 ^A	30.50 ± 6.16 ^B	25.40 ± 8.96 ^B
Stroma	44.69 ± 6.45 ^A	50.51 ± 8.89 ^B	52.32 ± 9.48 ^B	19.79 ± 6.35 ^A	26.82 ± 7.21 ^B	29.63 ± 7.29 ^B
MVD	14.76 ± 2.88 ^A	9.77 ± 2.76 ^B	9.54 ± 3.02 ^B	10.77 ± 4.19	8.70 ± 2.23	8.89 ± 1.58
MVD/ Stroma ratio	0.30 ± 0.07 ^A	0.15 ± 0.04 ^B	0.17 ± 0.06 ^B	0.82 ± 0.47 ^A	0.46 ± 0.23 ^B	0.42 ± 0.15 ^B

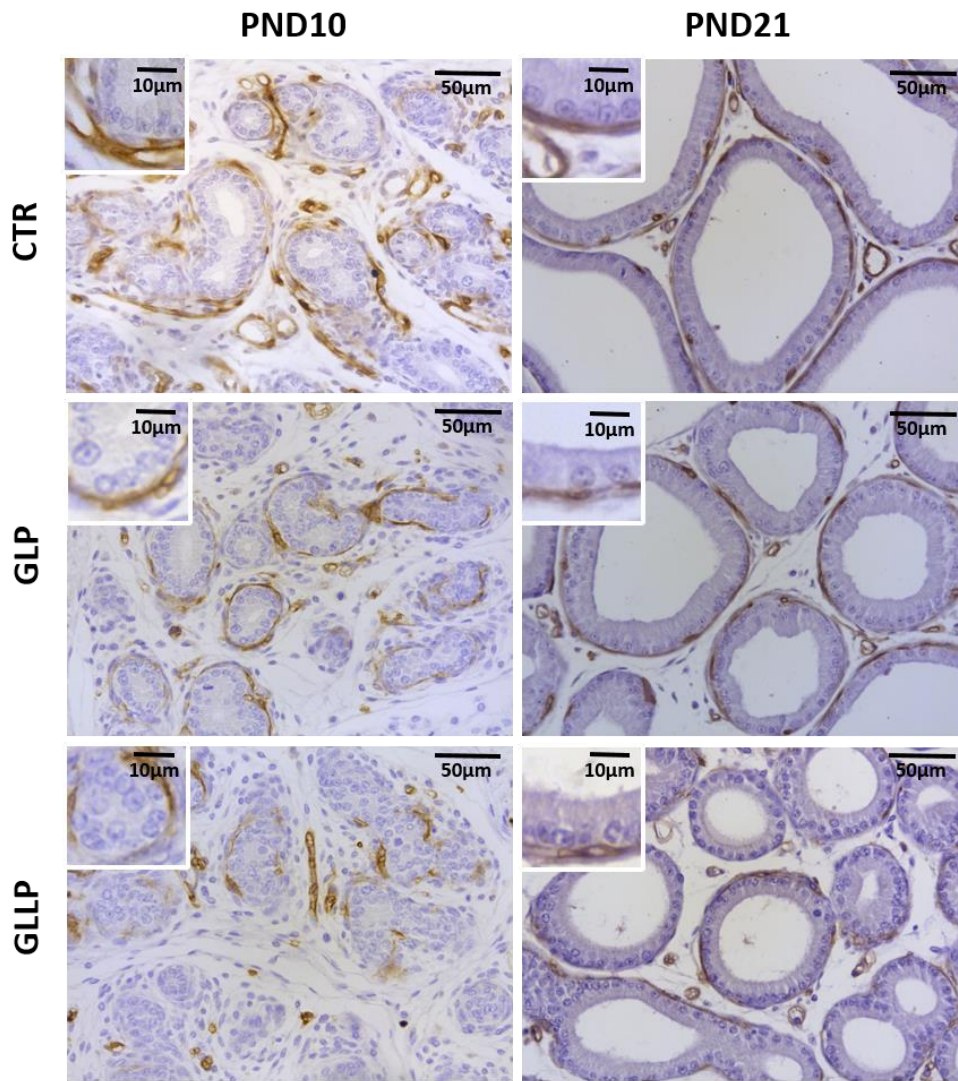
Values expressed as mean ± standard deviation. Different superscript letters indicate significant differences among experimental (p<0.05). AGD: Ano-Genital Distance; CTR: Control group; GLP: Gestational Low Protein group; GLLP: Gestational and Lactational Low Protein group; MVD: Microvascular Density; PND: post-natal day; VP: ventral prostate; UGC: Urogenital Complex.



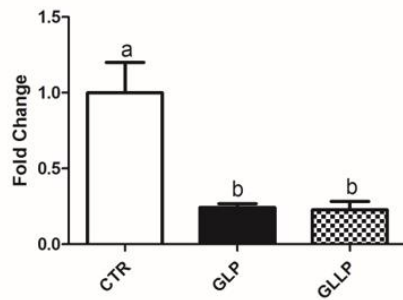
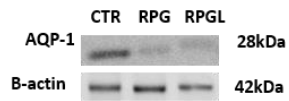




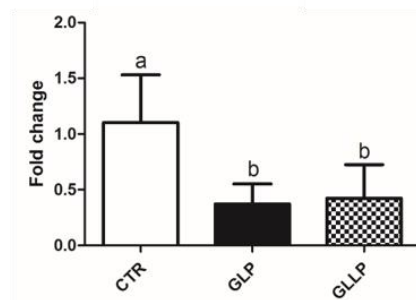
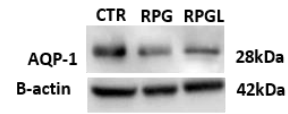


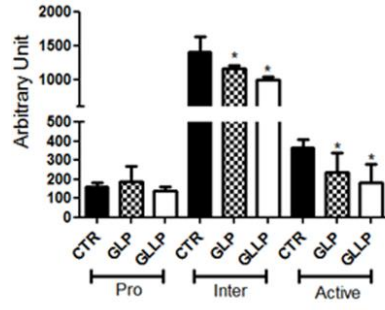
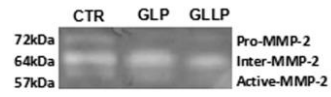
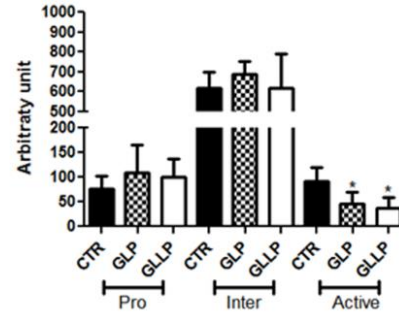
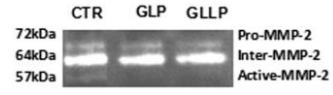


AQP-1 PND10



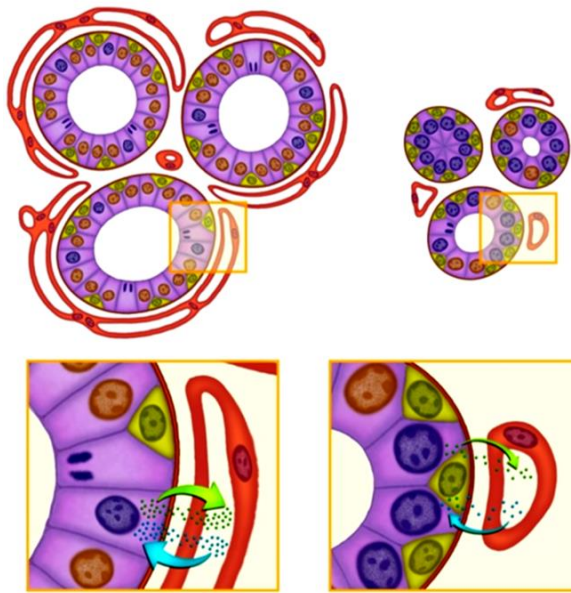
AQP-1 PND21



A**B**

Normal diet

Low protein diet



Nutrients, hormones, oxygen

VEGF and growth factors

Blood vessels

AR negative Luminal cells

AR positive Luminal cells

Proliferating cells

Basal cells

ANEXOS

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 670-CEUA, sobre "Impacto da Programação Fetal por Restrição Proteica Gestacional e Lactacional sobre o Desenvolvimento Vascular na Próstata Ventral de Ratos", sob a responsabilidade de **Luis Antônio Justulin Junior**, está de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Botucatu, 24 de novembro de 2014.



Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA