

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da restrição proteica materna associados ao consumo do açúcar
sobre o metabolismo, parâmetros reprodutivos e morfofisiologia
prostática na prole de ratos

Ketlin Thassiani Colombelli

Discente

Luis Antonio Justulin Junior

Orientador

Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Coorientador

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da restrição proteica materna associado ao consumo do açúcar
sobre o metabolismo, parâmetros reprodutivos e morfofisiologia
prostática na prole de ratos

Ketlin Thassiani Colombelli

Discente

Luis Antonio Justulin Junior

Orientador

Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Coorientador

Tese apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular e Estrutural*.

Nome do orientador: Luis Antonio Justulin Junior

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional- Morfologia,
IB- UNESP-Botucatu

BOTUCATU – SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Colombelli, Ketlin Thassiani.

Efeitos da restrição proteica materna associado ao consumo do açúcar sobre o metabolismo, parâmetros reprodutivos e morfofisiologia prostática na prole de ratos / Ketlin Thassiani Colombelli. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Antonio Justulin Junior

Coorientador: Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Capes: 20603002

1. Açúcar no organismo. 2. Desenvolvimento fetal.
3. Próstata. 4. Proteômica. 5. Deficiência de proteína - Efeitos colaterais.

Palavras-chave: Consumo de açúcar; Programação fetal; Próstata; Proteômica.

Amor e carinho,
Que dedico a minha Vó Maria (*In memoriam*)

aos meus Pais (Neni e Rose)

Agradecimentos especiais

Aos meus pais Neni e Rose,

Obrigado pelo apoio, incentivo e amor incondicional oferecido durante toda a minha vida. Obrigada por serem exemplos de esforço e dedicação, obrigado por me ensinarem a ser persistente nos desafios da vida!

Ao meu namorado Breno,

Obrigada por todo o apoio, por tornar essa longa jornada e a vida acadêmica mais leve.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Antônio Justulin,

Obrigada por aceitar uma pessoa que tinha zero experiência com ratos e assim ter me proporcionado entrar neste universo prostático. Muito obrigado por toda paciência, ensinamento, apoio e incentivo e por acreditar no meu potencial!

Ao meu coorientador Dr. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos,

Pei, muito obrigado por todos os ensinamentos desde do começo do mestrado até essa fase de finalização, você com certeza foi essencial nesta jornada.

Aos colegas de laboratório Ana Carolina Camargo, Flavia Bessi, Luiz Frediani e Matheus Fioretto,

Obrigado pela amizade, conselhos, ensinamentos, convívio, bate-papos e distrações. Vocês tornaram esses 6 anos de laboratório mais leve.

Aos meus alunos de Iniciação Científica Matheus Fioretto e Cecilia Luvizutti

Sem a ajuda de vocês não teria dado conta das infinitas diluições de açúcares. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto.

À banca examinadora da qualificação (Prof. Dr. Luis Barbisan, Prof. Dr. Manoel Biancardi e Prof. Dra. Adriana Franco)

Muito obrigada por todas sugestões que foram dadas no exame de qualificação, todas foram muito importante e contribuíram muito para que o trabalho melhorasse

À banca examinadora da defesa (Prof. Dr. Luis Justulin, Prof. Dr. Erick Ramo, Prof. Dr. Antonio Marcus, Prof. Dra. Raquel Domeniconi e Prof. Dr. Vitor Marcel)

Muito obrigado por terem aceitado o convite em colaborar com este trabalho e com esta importante fase da minha formação.

Agradecimentos

“A persistência é o melhor caminho do êxito” (Charles Chaplin)

Talvez essa seja uma das frases que definam a minha entrada para esse mundo da pós-graduação, foram necessários alguns não em alguns processos seletivos e frustrações em alguns estágios em algumas áreas para que eu me encontrasse nesse universo prostático lindo e maravilhoso, ou seja, a persistência prevaleceu desde do início superando os os desafios para que eu tivesse aqui encerrando mais um ciclo acadêmico! Por isso acho essencial agradecer em especial para todos os Professores/orientadores que sempre me incentivaram e me encorajaram, tenho vocês como um exemplo a ser seguido.

A toda equipe do Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC) Nilton, Caroline, Franciele, Isabela, Caio, Juliana, Mirian, Renato, Matheus Betta, Cecília, Elian Ribeiro, Ana Beathriz e Isabelle Tenori, Luisa e aos antigos integrantes Isabela Paiva, Maira, Teng, Helga que contribuíram no convívio no dia-dia para que ele fosse mais leve.

Aos colegas de laboratórios parceiros do laboratório do músculo estriado (LBME), laboratório de desreguladores endócrinos e carcinogênese (LABDECA) e laboratório de Carcinogênese Química e Experimental, Bruno Duran, Bruno Fantinatti, Paula, Jéssica, Alexandre, Ariana, Joyce, Vânia e Nelci vocês com certeza fizeram algum almoço, alguma tarde mais feliz.

Ao laboratório do Prof. Dr. Thomas Kislinger o qual me recebeu de braços abertos para a realização do meu estágio no exterior, toda a sua equipe foram essenciais para a realização das análises de proteômica, especialmente Salvador, Andrew e Vladimir.

Às parcerias deste projeto Prof. Dr. Erick, Alan Andrew, Prof. Dra. Clélia Akiko, Larissa Périco e Rie Ohara e Prof. Dra. Fernanda Mani muito obrigado pelas análises conduzidas com o apoio de vocês.

Ao meu amigo Anderson, muito obrigado pela nossa amizade e o nosso companheirismo desde almoço/jantares gastronômicos até sessões de terapias informais com direito a desabafos e gordices no final. É uma amizade que quero levar pro resto da vida!

Às amigas que o predinho “481” me proporcionou às minhas grandes amigas Patrícia, Priscila, Talita, Marina, Jéssica e Amanda. Muito obrigado por vocês terem me aturado todo esse tempo. Agradeço pelos infinitos segredos trocados, dicas, conselhos e conversas jogadas fora.

Às meninas Marina, Jéssica e Amanda pelos vários rolês, companhias, bate papos e por todo apoio nos momentos difíceis

Às minhas amigas, Priscila e Talita, vocês sempre me apoiaram e ajudaram muito. Sou infinitamente grata pelos vários conselhos trocados.

À minha amiga Talita, que me apoiou e era parte da minha família botucatuense. Muito obrigado por todo apoio.

À minha rede de apoio brasileira que tive no Canadá, Isabela, Mauricio, Breno, Renan, Bruna e Juliana vocês me deram um suporte, apoio e amizade essenciais e com certeza fizeram o meu Canadá muito diferente.

À minha amiga Isa, sem você o meu estágio no exterior jamais teria sido igual, não tenho palavras pra agradecer o apoio, a amizade, parceria, dicas e os inúmeros cafés short darks tomados discutindo os resultados.

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!

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.

À instituição Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências por toda estrutura oferecida para que este projeto fosse desenvolvido.

À coordenação e professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada pela excelência na formação de seus alunos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (2017- 146900 e 2019-00690).

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

**“Em algum lugar, algo incrível está esperando
para ser descoberto.”**

Carl Sagan

RESUMO

O aumento da incidência de síndromes metabólicas na população tem sido associado à fatores nutricionais maternos e da prole, como a restrição proteica materna (RPM) e o alto consumo de produtos com açúcares de adição da infância até a vida adulta. Estudos epidemiológicos e experimentais demonstram que ambos os tipos de fatores têm efeitos negativos sobre o sistema genital masculino. Além de efeitos negativos durante a fase adulta, também ocorrem alterações no envelhecimento, como a ocorrência de carcinoma *in situ*. Portanto, torna-se relevante investigar se a RPM modula parâmetros funcionais nos órgãos reprodutivos (próstata, testículo e epidídimo) da prole após ao consumo de açúcar pós-natal na idade adulta e no envelhecimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a RPM e consumo pós-natal do açúcar afetam os órgãos reprodutivos (próstata ventral, testículo e epidídimo) e se o consumo de açúcar pós-natal afeta a morfofisiologia prostática nos animais adultos repercutindo em possíveis patologias no envelhecimento. Foram utilizados ratos *Sprague Dawley* machos nascidos de mães que receberam ração normoproteica (Controle- CTR, 17% proteína) ou hipoproteica (Restrição Proteica Gestacional e Lactacional- RPGL, 6% proteína) durante a gestação e a lactação, no dia pós-natal 21 (DPN- desmame) os machos foram divididos em 4 grupos e todos passaram a receber a ração normoproteica: Controle (CTR): nascidos de mães CTR que consumiram água normal *ad libitum*; Controle+açúcar (CTR+AÇÚ): consumiram solução de açúcar a 10% diluída em água do DPN 21 ao DPN 90; RPGL: nascidos de mães RPGL que consumiram água normal *ad libitum*; RPGL+AÇÚ: Nascidos de mães RPGL, que consumiram solução de açúcar do DPN 21 ao DPN 90. Após o DPN 90 todos os animais consumiram água normal. Os animais foram eutanasiados no DPN 90, onde foram coletadas as próstatas ventrais, testículos e epidídimos para análises morfofisiológicas e de contagens espermáticas; além disso para a próstata ventral de ambas as idades (DPN 90 e 540) foi analisado o perfil proteômico. Adicionalmente, foram realizados os testes de tolerância a glicose oral (TTGO) e análise do perfil metabólico e sérico dos animais no DPN 90 e 540. Nos testículos e nos epidídimos foram feitas as análises de contagem espermática e morfofisiológicas no DPN 90. As proteínas totais, triglicerídeos, glicose e colesterol total não mudaram em ambas as idades. No TTGO, o grupo CTR+AÇÚ apresentou glicemia maior no tempo de 120 minutos e na área sob a curva (ASC), um aumento significativo em relação ao grupo CTR, o que caracteriza intolerância à glicose. Para os parâmetros de peso corpóreo e distância ano-genital em ambas as idades foram reduzidas nos grupos RPGL, sendo que a PV não apresentou diferença no peso. Nas análises de componente principal do perfil proteômico, no DPN 90 os grupos não tiveram distribuição distinta, já no DPN 540 tiveram distribuição mais distinta entre os grupos, em especial para o grupo RPGL+AÇÚ. Os grupos que consumiram o açúcar enriqueceram vias relacionadas à autofagia, metabolismo de glicose desde o DPN 90, persistindo até o envelhecimento, enquanto a RPM alterou vias relacionadas à proliferação celular, ciclo celular e vias de estrógenos. Os termos enriquecidos em cada idade pelas proteínas diferencialmente expressas podem ter refletido nas alterações morfofisiológicas visualizadas nos grupos tratados (CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) nos DPNs 90 e 540. Além disso, no DPN 540 observou-se diferentes lesões como atrofia inflamatória, atrofia epitelial, displasia, além do carcinoma *in situ* nos animais dos grupos CTR+AÇÚ e RPGL. Para as análises dos parâmetros reprodutivos os animais dos grupos RPGL e RPGL+AÇÚ tiveram uma diminuição da contagem espermática além da diminuição do tempo de trânsito no epidídimo. Portanto, estas análises nos mostram que a RPM associada ao consumo de açúcar pós-natal pode potencializar os efeitos na função reprodutiva e que em especial na próstata ventral estes podem contribuir para o desenvolvimento de lesões prostáticas.

ABSTRACT

The increase of metabolic syndromes in our society has been associated with maternal and offspring nutritional factors, such as the maternal low protein diet (MLP) and the increase of sugar-products consumption from infancy to adult life. Epidemiologic and experimental researches showed both conditions have negative effects on the male reproductive system. In addition to affecting adult life, also occurring alterations in the aging, such as the development of prostate carcinoma in situ. The aim was to evaluate if the MLP and postnatal sugar consumption impacted the reproductive organs (ventral prostate- VP, testis, and epididymis) on a postnatal day (PND) 90 and if they cause relevant alterations in the proteomic profile of VP that reflect in morphophysiological parameters on adult animals, impacting in possible prostatic pathologies during aging, on PND 540. Male Sprague Dawley rats born from dams fed a control diet (17% protein) or hypoprotein diet (6% protein) during gestation and lactation periods, on PND 21 were divided into 4 groups and all started to receive the control diet: Control (CTR): born from CTR dams who consumed normal water ad libitum; Control+sugar (CTR+SUG): consumed 10% sugar solution diluted in water from PND 21 to PND 90; GLLP: born from GLLP dams who consumed normal water ad libitum; GLLP+SUG: Born from GLLP dams, who consumed sugar solution from PND 21 to PND 90. After PND 90 all animals consumed normal water. The animals were euthanized on PND 90 and 540. On PND 90, the ventral prostates, testis, and epididymis were collected for morphophysiological, proteomic and sperm count analyses. The proteomic profile of VP was analysed in both ages (PND 90 and 540), additionally it was done the oral glucose tolerant test (OGTT) and the serum metabolic profile. The total proteins, triglycerides, glucose, and total cholesterol did not have any changes in both ages. The OGTT, the CTR+SUG group showed higher glycemia in 120 minutes and an increase of area under the curve (AUC) in relation to the CTR group, which characterize glucose intolerance. Both age the body weight and anogenital distance (AGD) were reduced in GLLP s groups. The VP weight did not have any change on PND 90, while in the aging this parameter was reduced in GLLP and GLLP+SUG groups. In the principal component analysis, on PND 90 the experimental groups had a similar distribution among the groups, in the aging the samples of each experimental group had a distinct distribution, especially the GLLP+SUG group. Proteins set enrichment analysis in the groups that consumed sugar showed terms related to the autophagy and glucose metabolism since PND 90, persisting until the aging, while the MLP diet altered pathways related to cell cycle, cellular proliferation, and estrogen pathways. The enriched terms in each age by differentially expressed proteins (DEP) are reflected in the morphophysiological alterations visualized on PND 90 and 540. Since both ages showed variations in the compartment frequency in the epithelium, lumen, and stroma in CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG groups and PND 540, the development of some lesions such as atrophy, dysplasia, and carcinoma in situ. The reproductive parameters analyzed showed morphometric alterations in the epididymis, a decrease in sperm count in testis and epididymis, and transit spermatid time. Therefore, these results have shown that the MLP diet associated with postnatal sugar consumption can enhance the effects in reproductive functions and, especially, in the VP can contribute to the development of prostatic lesions in aging animals.

Lista de Imagens

Capítulo I

Figura 1. Linha do tempo com as hipóteses propostas ao longo dos anos.....	23
Figura 2. Esquema representativo da importância dos primeiros 1000 dias de vida e suas possíveis modificações epigenéticas.....	25
Figura 3. Imagem ilustrativa da estrutura anatômica da glândula prostática humana com a divisão das zonas e regiões.	27
Figura 4. Imagem ilustrativa da estrutura macroscópica e organização microscópica (Coloração hematoxilina-eosina) dos pares de lobos prostáticos de rato adulto.	28
Figura 5. Esquema representativo dos tipos celulares encontrados na próstata adulta.	29
Figura 6. Esquema da morfogênese da próstata representando os estágios de desenvolvimento, linha do tempo e comparações entre ratos e adultos.	30
Figura 7. Imagem demonstrando a importância dos estudos de condições intrauterinas adversas associadas a um ambiente pós-natal desfavorável..	32

Capítulo II

Figure 1. Schematic representation of the experimental design, data analysis, and results.....	47
Figure 2. Experimental design.....	50
Figure 3. The body weight, food and water intake from different experimental groups evaluated since postnatal day 21 until 90.	56
Figure 4. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) from different experimental groups.....	59
Figure 5. The Volcano plots illustrate the upregulated proteins and downregulated proteins differentially expressed (Blue points) in each comparisons on postnatal day (PND) 90 (A- C) and 540 (D- F).....	60
Figure 6. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs CTR+SUG group on postnatal day 90.	64
Figure 7. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein group on postnatal day 90.....	65
Figure 8. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein+Sugar group on postnatal day 90.....	66

Figure 9. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Control+Sugar group on postnatal day 540.....	67
Figure 10. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein group on postnatal day 540.....	68
Figure 11. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein+Sugar group on postnatal day 540.....	69
Figure 12. Venn diagram and heatmap representing the commonly enriched terms on postnatal day 90.	70
Figure 13. Venn diagram, heatmap and protein-protein interaction (PPI) representing the commonly enriched terms on postnatal day 540.....	71
Figure 14. Representative histological sections of ventral prostate (VP) on postnatal day 90.	72
Figure 15. Proliferation cell analysis in ventral prostate on postnatal day 90.....	73
Figure 16. Representative immunohistochemistry against androgen receptor (AR) in ventral prostate on postnatal day 90.....	73
Figure 17. Representative histological sections of ventral prostate (VP) on postnatal day 540..	74
Figure 18. Graphics represent the protein expression of PCNA and prostatein on postnatal day 90 and 540..	75
Supplementary Figure 1. Representative figure of mass spectrometry analysis.....	87
Supplementary Figure 2. Biochemical parameters of male offspring at postnatal day 90 and 540.....	89
Supplementary Figure 3. Proteomic profile in adult animals on postnatal day- 90.	90
Supplementary Figure 4. Proteomic profile in aging animals on postnatal day-540.	91
Supplementary Figure 5. Representative histological sections of ventral prostate (VP) stained with hematoxylin and eosin (H.E.).....	92

Capítulo III

Figura 1. Delineamento experimental.....	97
Figura 2. Imagens representativas da próstata ventral (PV) dos diferentes grupos experimentais.	103
Figura 3. Imagens representativas de imunomarcagem para proliferação celular por Ki67 e análise de índice proliferativo da próstata ventral no dia pós-natal 90..	104

Figura- 4. Imagens representativas de imunomarcação para receptor de andrógeno (AR) e análise de expressão de prostatéina por <i>Western blotting</i> . na próstata ventral no dia pós-natal 90.	105
Figura- 5. Imagens representativa coradas em hematoxilina-eosina e análise morfométrica dos segmento inicial, cabeça, corpo e cauda dos epidídimos dos diferentes grupos experimentais.	106
Figura 6. Imagens representativas das análises de diâmetro de túbulo, diâmetro do lumen e altura do epitélio nos segmento inicial, cabeça, corpo e cauda dos diferentes grupos experimentais no dia pósnatal 90.....	107
Figura 7. Imagem representativa corada em hematoxilina-eosina dos testículos dos diferentes grupos experimentais.....	108
Figura 8. Imagens representativas dos parâmetros espermáticos dos testículos e epidídimos ..	109

Capítulo IV

Figura 1. Esquema representativo da relevância das condições adversas maternas e paternas no sucesso da prole ao longo da vida	118
--	-----

Lista de tabelas

Capítulo II

Table 1. Anthropometrical parameters of animals from different experimental groups on postnatal day 90.	57
Table 2. Biometrical parameters of animals from different experimental groups on postnatal day 90 and 540.	61
Table 3. Reproductive parameters of animals from different experimental groups on postnatal day 90 and 540.	62
Supplementary Table 1. Composition of the standard or Normoprotein (AIN-76A) and Hipoprotein diets (AIN-93).	86
Supplementary Table 2. Specification for antibodies used in immunohistochemistry (IH) and Western-blot (WB) experiments.	87
Supplementary Table 3. Anthropometrical parameters of dams during gestational and lactational periods.	88
Supplementary Table 4. Biometric parameters of dams in the end of lactation period.	88
Supplementary Table 5. Biometric parameters of male offspring at postnatal day 0 and 21....	89

Capítulo III

Tabela 1. Parâmetros biométricos dos animais no dia pós-natal (DPN) 90.	101
Tabela 2. Parâmetros estereológicos morfológicos da próstata ventral dos diferentes grupos experimentais.	102
Tabela Suplementar 1. Composição das dietas normoproteica (AIN-76A) e hipoproteica (AIN-93).	115
Tabela Suplementar 2. Anticorpos específicos usados para análises de imunohistoquímica e <i>Western blotting</i>	115

Lista de Abreviaturas

ACP Análise de Componente Principal

AR- Receptor de Andrógeno

ASC- Área Sob a Curva

AQP- Aquaporina

CaP- Câncer de Próstata

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu

CTR- Controle

CTR+AÇÚ – Controle + Açúcar

DAB- 3,3'- diaminobenzidina

DAG- Distância Ano-Genital

DG- Dia Gestacional

DPN - Dia Pós-Natal

EP- Epitélio

HE - Hematoxilina-Eosina

HPB- Hiperplasia Prostática Benigna

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

Lu- Lúmen

MLG- Modelos Lineares Generalizados

MUG- Mesênquima Urogenital

NaCl – Cloreto de sódio

OMS- Organização Mundial da Saúde

PED- Produção Espermática Diária

PF- Programação Fetal

PV- Próstata ventral

RP- Restrição Proteica

RPGL- Restrição Proteica Gestacional e Lactacional

RPGL+AÇÚ - Restrição Proteica Gestacional e Lactacional + Açúcar

RPM - Restrição Proteica Materna

S - Estroma

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SM- Síndromes Metabólicas

SUG- Seio Urogenital

TTGO- Teste de Tolerância a Glicose Oral

VEGF- Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

Abbreviations list

ABC- Ammonium bicarbonate

AcN- Acetonitrile

ACSS2- Acyl-CoA Synthetase Short-Chain Family Member 2

AGD- Ano-Genital Distance

AGT- Angiotensinogen

AKT- Serine/Threonine Kinase 2

AMPK- Activated Protein Kinase

ANOVA- One-way analysis of variance

AR- Androgen Receptor

ARRB1- Arrestin, Beta 1

ATG5- Autophagy Related 5

AUC- Area Under the Curve

BCA- Bicinchoninic Acid assay

BMI- Body Mass Index

BPH- Benign Prostatic Restriction

CTR- Control

CTR+SUG- Control + Sugar

DAB- 3,3'-Diaminobenzidine

DEP- Differentially Expressed Proteins

DTT - Dithiothreitol

DOHaD- Developmental Origins of Health and Disease

E2- Estrogen

FA- Formic Acid

FDR - False Discovery Rate

FP- Fetal Programming

GD- Gestational Day

GHSR- Ghrelin receptor

GLLP- Gestation and Lactation Low Protein

GLLP+SUG- Gestation and Lactation Low Protein diet + Sugar

GLM- Generalized Linear Models

GO- Gene Ontology

HE- Hematoxylin-Eosin

HFD - High-Fat Diet

H3K27- Histone 3 at Lysine 27
HIF- Hypoxia Inducible Factor
HPA- Human Protein Atlas
HSD- Honest Significant Difference
HSD- High Sugar Diet
HRP- Horseadish peroxidase
IAA- Iodoacetamide
IH- Immunohistochemistry
IODs- Integrated Optical Densities
KEGG- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LFQ- Label-Free Quantification
LPD- Low Protein Diet
MAPK- Mitogen-Activated Protein Kinase
MPR- Maternal Protein Restriction
MS- Metabolic Syndromes
MS/MS – Mass Spectrometry / Mass Spectrometry
Mtor - Mammalian Target of Rapamycin
NADH- Nicotinamide Adenine Diphosphate Hydride
OGTT- Oral Glucose Tolerance Test
PBS- Phosphate-Buffered Salin
PCA- Principal Component Analyses
PcG- Polycomb Group
PCNA- Proliferating Cell Nuclear Antigen
PPAR- Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PPI- Protein-Protein Interaction
PND- Postnatal Day
SEM- Standard Error of Mean
SBCAL- Brazilian Society of Science in Laboratory Animals
SCOC- Short Coiled-Coil Protein
SD- Standard Deviation
SIRT2- Sirtuitin 2
SIRT3- Sirtuitin 3
SUZ12- Suppressor of Zeste 12
TFA- Trifluoroacetic acid
TFE - Trifluoroethanol

TBS-T- Tris Buffered Saline with Tween

ULK1- Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

VEGFR- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VennDIS- Venn Diagram Interactive Software

VP- Ventral Prostate

ZBTB20- Zinc Finger and BTB Domain Containing 20

WB- Western-blotting

WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	21
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.1 Eventos e hipóteses desenvolvimentistas.....	22
1.2 DOHaD por restrição proteica materna	25
1.3 Consumo de açúcares de adição	31
1.4 Restrição proteica materna e o consumo de “açúcares de adição” associados aos impactos na idade reprodutiva e no envelhecimento.....	33
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivos Gerais.....	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. RESULTADOS.....	35
Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO II.....	44
The proteome landscape of adult and aging prostate rats subjected to maternal low protein diet associated with postnatal sugar consumption	45
CAPÍTULO III	93
Resultados dos órgãos reprodutivos de 90 dias	93
CAPÍTULO IV	116
Considerações finais.....	116
Anexos	119

CAPÍTULO I - Revisão bibliográfica

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Eventos e hipóteses desenvolvimentistas

Nos últimos anos tem sido observado um aumento exponencial da incidência de síndromes metabólicas (SM) cada vez mais cedo na população, o que tem sido considerado um problema global de saúde pública que acomete pelo menos 25% dos adultos no mundo (IDF, 2017). A SM é definida pela presença de três ou mais dos seguintes fatores: elevada obesidade abdominal, intolerância à glicose, hipertensão, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, triglicerídeos elevados e resistência à insulina. Sendo a obesidade e a resistência à insulina os fatores chaves (Alberti et al., 2009; Zhu et al., 2019). Estas anormalidades podem levar ao desenvolvimento de diabetes tipo II e doenças cardiovasculares na vida adulta, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Jobgen et al., 2006; Lam; Leroith, 2000; Zhu et al., 2019; Sigit et al., 2020). Além destes fatores que podem levar a SM, condições intrauterinas adversas como a exposição ao estresse, substâncias tóxicas e nutrição (desnutrição e supernutrição) podem afetar permanentemente o desenvolvimento, a estrutura e o metabolismo de diferentes órgãos do indivíduo (Ozanne, 2015; Marcianik et al., 2017).

Estudos vem associando a incidência de SM com condições adversas durante o período de gestação e lactação. Famosos eventos históricos como o inverno da fome holandesa (1944) ajudaram a compreender os efeitos dos insultos maternos ao longo da vida foi um período de escassez de alimentos em uma região da Holanda no final da 2ª Guerra Mundial devido ao cerco alemão (Chen et al., 2014; Carpinello et al., 2018) (Figura 1). Smith (1947) demonstrou que os bebês provenientes destas mães que sofreram restrição alimentar durante a gestação apresentaram menor peso ao nascimento. Dependendo da fase da gestação ao qual foram expostos à desnutrição, os indivíduos apresentavam padrões diferenciados de composição corporal. Caso a mãe tenha sofrido a restrição durante os últimos três meses da gestação, estes apresentavam baixa incidência de obesidade. No entanto, se a desnutrição tivesse ocorrido no início, primeiros três meses, a incidência de obesidade aumentava significativamente. Assim, pôde-se verificar que além do impacto negativo da desnutrição materna sobre a prole, os efeitos podem variar dependendo do tempo e do período gestacional em que o evento ocorre, uma vez que longos períodos de exposição causam alterações maiores e atingem números maiores de órgãos e sistemas (Ravelli et al., 1976; Langley-Evans, 2015).

David Barker e colaboradores, no final da década de 1980, foram os pioneiros a publicar estudos a partir de eventos epidemiológicos que correlacionaram o surgimento de doenças crônicas a insultos sofridos durante o período gestacional e na vida pós-natal. Os primeiros estudos

publicados por este pesquisador datam de 1986, e demonstraram correlação positiva entre má nutrição infantil, aumento da incidência de mortalidade neonatal e aumento de mortes por doenças cardíacas na idade adulta, em regiões mais pobres da Inglaterra e do País de Gales (Barler; Osmond, 1986). Já em 1989, foi proposta a Hipótese de Barker, a partir de dados de recém-nascidos de 1911 e 1930 na região de Hertforshire-Inglaterra e que apresentavam um baixo peso corpóreo para a idade, tinham até 2,7 mais chances de morrer em decorrência de doenças cardíacas quando comparados a recém-nascidos com peso considerado normal para a idade (Barker et al., 1989) (Figura 1).

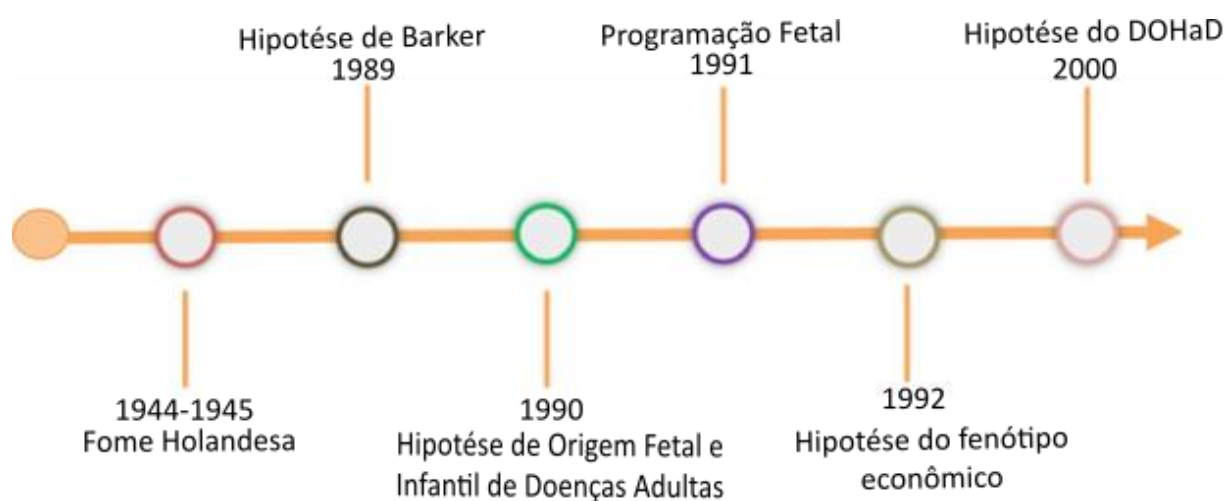


Figura 1. Linha do tempo com as hipóteses propostas ao longo dos anos.

Portanto, a partir destes dados de trágicos eventos históricos e de dados paramétricos coletados principalmente das regiões mais pobres da Inglaterra e dos países de Gales, pode-se constatar a vulnerabilidade do período da gestação e lactação, e delimitar que condições adversas nestes períodos podem predispor a prole ao desenvolvimento de doenças crônicas. Em 1990, um outro estudo de Barker e colaboradores intitulado “*The fetal and Infant Origins of Adult Disease*” (FOAD) mostrou uma relação entre o crescimento fetal e infantil com doenças cardiovasculares. A partir de dados de peso corpóreo ao nascimento, peso da placenta, peso na vida adulta e dados de doenças cardiovasculares e hipertensão, mostrou que indivíduos que tiveram um baixo peso ao nascimento associado com placenta maior, apresentaram maiores propensões de desenvolver hipertensão na vida adulta, assim começou se a mostrar uma relação da programação pelo ambiente não somente fetal como infantil. (Barker et al., 1990; Negrato; Gomes, 2013) (Figura 1).

Desde então, pesquisadores começaram a demonstrar que danos ocorridos durante o período perinatal (intrauterino e neonatal) podem “programar” respostas da prole ao longo da vida e influenciar na ocorrência de doenças quando adultos, condição que ficou conhecida posteriormente como Programação Fetal (PF) (Lucas, 1991). Outras hipóteses foram criadas para

entender estes efeitos da ‘programação’ para além da vida intrauterina, como a hipótese do fenótipo econômico proposta por Hales e Barker (1992), o qual sugere que a má nutrição fetal no início da vida pós-natal estimula mecanismos relacionados a economia nutricional do indivíduo que afeta o desenvolvimento do pâncreas, tornando o mais susceptível ao desenvolvimento de diabetes ao longo da vida (Hales; Barker, 2001; Hallows et al., 2012) (Figura 1).

Atualmente, há o conceito ***Development Origins of Health and Disease*** (DOHaD) que é definida por um ambiente deletério durante os períodos críticos de desenvolvimento, do qual se incluem os períodos de pré-concepção, concepção (formação do espermatozoide e do óvulo), gravidez (formação do zigoto até o recém-nascido), infância e adolescência que podem causar alterações nas estruturas, funções e fenótipos moleculares da prole durante toda a vida (Li et al., 2017) (Figura 1). Desde os anos 2000, formou-se uma sociedade internacional exclusiva para estudos com este fim, que conta com instituições de pesquisa e de políticas públicas na Europa, América do Norte e regiões do Pacífico, bem como em países em desenvolvimento (Wadhwa et al., 2009; Schulz, 2010).

Esta habilidade de um organismo se adaptar ao seu ambiente tem sido relacionada com a adaptabilidade e a plasticidade das células e dos tecidos (Hochberg et al., 2011; Langley-evans, 2015), estas características são mais susceptíveis a alterações nos períodos mais críticos de sensibilidade que seriam os primeiros mil dias do indivíduo, os momentos de pré-concepção, concepção, gestação e lactação até o segundo aniversário do indivíduo (McMillen; Robinson, 2005; Bhutta et al., 2013; Indrio et al., 2017; Beek et al., 2018). Assim, a exposição materna a insultos como estresse, nutricionais, consumo de drogas, exposição a agentes químicos e/ou hormônios, podem resultar em alterações que podem afetar o funcionamento de órgãos e sistemas da prole (Al-Gubory, 2014; Desai et al., 2015; Ramírez-López et al., 2015; Goldstein et al., 2016; England et al., 2018; He et al., 2017). Estudos relatam que estas condições podem impactar a longevidade e “programar” permanentemente estruturas e funções do organismo, causando baixa produtividade e disfunção metabólica ao longo da vida do indivíduo, além de poder acelerar o envelhecimento pelo encurtamento dos telômeros (Hallows et al., 2012; Tarry-Adkins; Ozanne, 2014; Vaiserman, 2014). Já foram evidenciadas também alterações epigenéticas, que são mudanças que não alteram a sequência de DNA, mas causam mudanças como a metilação de DNA, modificações de histonas e miRNAs na função dos genes que são mitoticamente ou meioticamente hereditárias (Beek et al., 2018) (Figura 2).



Figura 2. Esquema representativo da importância dos primeiros 1000 dias de vida e suas possíveis modificações epigenéticas. Adaptado de Beek et al., (2018) e Moholdt et al., (2020).

1.2 DOHaD por restrição proteica materna

Diversos modelos de DOHaD têm sido desenvolvidos nos últimos anos para se investigar os impactos das alterações no ambiente intrauterino sobre a prole. Assim, um dos modelos mais utilizados de DOHaD é a Restrição Proteica Materna (RPM), no qual as ratas são submetidas à uma dieta hipoproteica nos períodos de gestação e/ou lactação (Rinaldi et al., 2013; Sene et al., 2013; De Oliveira et al., 2016; Vega et al., 2016; Colombelli et al., 2017; Zheng et al., 2017; Santos et al., 2019). Em modelos de roedores, vem sendo demonstrado que a RPM afeta o cuidado parental materno com a prole, o que ocasiona um atraso no desenvolvimento neurológico e físico dos filhotes, além de estar associada ao baixo peso ao nascimento, redução de crescimento de diferentes órgãos, elevação da pressão sistólica, alteração no metabolismo de glicose e lipídeo e, consequentemente, podendo causar a dislipidemia e resistência à insulina (Ozanne; Hales, 2004; Costa-Silva et al., 2009; Falcão-Tebas et al., 2012; Fidalgo et al., 2013; Leandro et al., 2012; de Brito Alves et al., 2014, 2016; Ferreira et al., 2016; Paulino-Silva; Costa-Silva, 2016; Gienatiempo et al., 2020).

Através de diferentes análises em diferentes órgãos foi constatado que a RPM também está relacionada ao menor número de néfrons nos rins (Habib et al., 2011; Sene et al., 2013), menor quantidade de células beta e de ilhotas de Langerhans no pâncreas (Dahri et al., 1991; Calzada et al., 2016), proporção alterada entre os tipos celulares do fígado, aumento de estresse oxidativo e fibrose hepática (Burns et al., 1997; Tarry-Adkins et al., 2017; Vega et al., 2016), menor número de neurônios que controlam o apetite no hipotálamo (Plagemann et al., 2000) e menor número de alvéolos pulmonares e atraso no seu desenvolvimento (Zana-Taieb et al., 2013; Farid et al., 2015). Além disso, a RPM induz à uma diminuição de enzimas anti-oxidantes do coração, potencializando o surgimento de doenças cardíacas na vida adulta da prole (Nascimento et al., 2014), e ainda afeta

a atividade de fatores neurotróficos do cérebro, causando um déficit de aprendizado e de memória nos roedores neonatos (Marwarha et al., 2017).

Estudos experimentais demonstram que a RPM por um período prolongado além do período da gestação e lactação, o indivíduo se adapta devido a plasticidade celular e apresenta menor ganho de peso durante este período e vivem por mais tempo (Walker; Ho, 2012). Enquanto que a RPM somente no período de gestação e lactação, os efeitos são potencializados (Langley-evans, 2015, Colombelli et al., 2017), estes filhotes apresentam menor peso ao nascer, porém demonstram ganho de peso acelerado associado ao tempo de vida reduzido, constatando que a nutrição durante períodos críticos intrauterino e pós-natal têm forte impacto sobre a longevidade (Barker, 2004; Mcmillen; Robinson, 2005). Além disso, indivíduos com peso reduzido ao nascimento e que desenvolvem crescimento pós-natal acelerado (*catch-up growth*), apresentam maior predisposição a desenvolver resistência à insulina e diabetes tipo II na idade adulta (Petry et al., 2001; Hales; Barker, 2013). Em conjunto, todos estes dados demonstram que a RPM pode induzir respostas adaptativas que afetam negativamente diferentes órgãos da prole, podendo influenciar a morfofisiologia sistêmica ao longo da vida.

Impactos da restrição proteica materna no sistema genital masculino

Além de afetar diversos órgãos, sabe-se que o sistema genital masculino na prole de ratos machos submetidos à RPM tem seu desenvolvimento e funcionamento afetados. Este sistema é composto pelos testículos, ductos genitais e glândulas sexuais acessórias (Ribeiro et al., 2014; Picut; Parker, 2017). Os testículos têm função de produção dos espermatozoides pelo epitélio germinativo dos túbulos seminíferos e dos andrógenos pelas células de Leydig (Ribeiro et al, 2014; O'Donnell et al., 2017). Após a produção dos espermatozoides nos testículos, estes adquirem a motilidade e a capacidade de fertilização no epidídimo. Os epidídimos são órgãos pares, formados por um túbulo único, longo e enovelado, dividido em quatro segmentos principais: segmento inicial, cabeça, corpo e cauda (Bretom et al., 2016; Belleannée et al., 2012; Joseph et al., 2011). Cada região tem funcionalidades diferentes, que são recorrentes das diferenças estruturais e moleculares dos quatro tipos de células: principais, basais, claras e narrow (Breton et al., 2016). Além disso, estão entre essas células aquelas que formam as junções comunicantes, responsáveis por formar a barreira epididimária entre os vasos sanguíneos e o compartimento luminal do epidídimo, que oferece microambiente necessário para a concentração, maturação e estocagem dos espermatozoides (Robaire; Hinton, 2015; Mita et al., 2011).

As glândulas sexuais acessórias que incluem a vesícula seminal, glândula bulbouretral e a próstata são responsáveis pela secreção dos diferentes componentes do fluido seminal (Verze et

al., 2016). A glândula prostática é essencial para a fertilidade masculina que secreta aproximadamente 30% do líquido seminal, e tem como função liquefazer o sêmen, ativar a motilidade espermática e proteção dos espermatozoides contra danos imunológicos causados pelo sistema genital feminino (Zenzmaier, et al., 2008). Esta é altamente susceptível a transformações oncogênicas como a prostatite, hiperplasia prostática benigna (HPB) e câncer de próstata (CaP), apresentando significativamente mais chances de desenvolver alguma patologia do que as outras glândulas sexuais acessórias (Verze et al., 2016; Toivanen; Shen, 2017).

Em humanos a próstata está localizada abaixo da bexiga e ao redor da uretra, é composto por um sistema de ductos ramificados e ácinos, que histologicamente são formados por um epitélio pseudoestratificado apoiado sobre uma membrana basal envolto por um estroma fibromuscular (Verze et al., 2016; Toivanen; Shen, 2017; Rebello et al., 2021). Anatomicamente é um órgão compacto dividido em zonas central, de transição e periférica, e regiões fibromuscular e periuretral, sendo revestido externamente por uma cápsula fibrosa (Figura 3). A zona de transição circunda a uretra proximal e os ductos ejaculatórios, é a menor região, representando apenas 10% do volume total da próstata, e normalmente corresponde o lugar onde se desenvolve o HPB (McNeal 1978; Timms; Hofkamp, 2011). A zona central circunda os ductos ejaculatórios e se projeta sobre a base da bexiga urinária, constituindo aproximadamente 20% do volume da próstata. Finalmente a zona periférica representa 70% do tecido glandular prostático, sendo o lugar mais comum de desenvolvimento de neoplasmas (McNeal 1981).

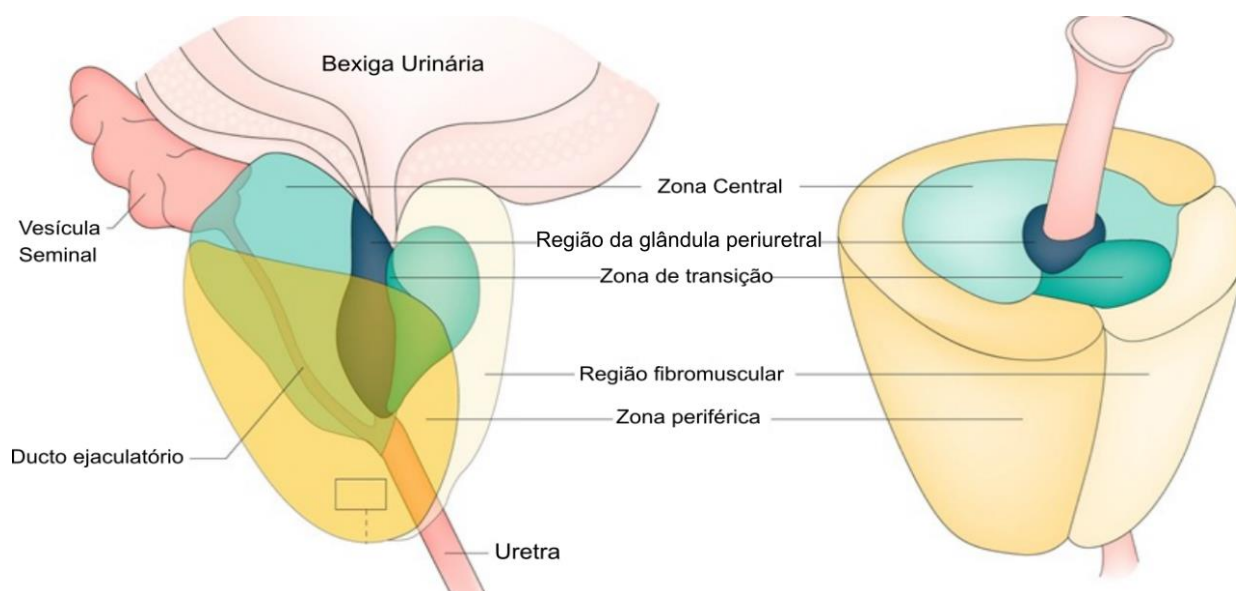


Figura 3. Imagem ilustrativa da estrutura anatômica da glândula prostática humana com a divisão das zonas e regiões. Adaptado de Rebello et al., (2021).

Diferentemente, a próstata de roedores é dividida em 4 lobos distintos: anterior ou glândula de coagulação, dorsal, lateral e ventral (Shirai et al., 2000; Marker et al., 2003), cada qual com

suas particularidades quanto à ramificação de ductos, produção de secreção proteica, resposta androgênica e incidência de lesões (Cunha et al., 1985; Lee et al., 2011) (Figura 4).

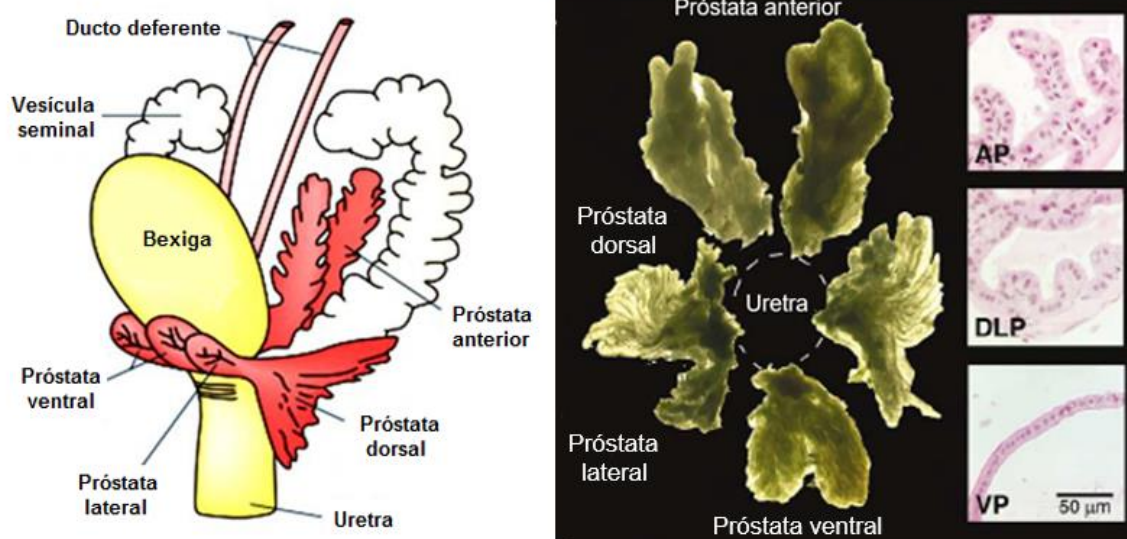


Figura 4. Imagem ilustrativa da estrutura macroscópica e organização microscópica (Coloração hematoxilina-eosina) dos pares de lobos prostáticos de rato adulto. AP- Próstata anterior; DLP- próstata dorsolateral; VP- próstata ventral. Adaptado de Marker et al., (2003).

Há também diferenças entre a próstata de humanos e roedores na histologia relacionada a arquitetura dos compartimentos estromais e epiteliais. Basicamente o epitélio prostático é constituído por 5 tipos celulares: células epiteliais luminiais secretoras revestem o lúmen dos ácinos prostáticos e são responsáveis pela secreção de proteínas prostáticas e fluídos; as células epiteliais basais formam uma monocamada descontínua sobre a membrana basal, sendo as principais células proliferativas do epitélio prostático; células neuroendócrinas, em menor quantidade 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 das células basais; e as células intermediárias com características de células basais ou secretoras (Marker et al., 2003; Peehl, 2005; Toivanen; Shen, 2017) (Figura 5). Apesar de apresentarem os mesmos tipos celulares e possivelmente terem a mesma função em ambas as espécies (humanos e roedores) estas apresentam variações na disposição e nas proporções. Em humanos, as células basais em cortes histológicos estão dispostas em camada contínua e única, mas em roedores estas células podem entrar em contato uma com as outras pelas projeções citoplasmáticas (Hayward et al., 1996). Assim, há uma proporção de 1:1 de células basais para células luminiais na próstata de humanos, enquanto que em roedores a proporção é de 1:7 (El-Alfy et al., 2000).

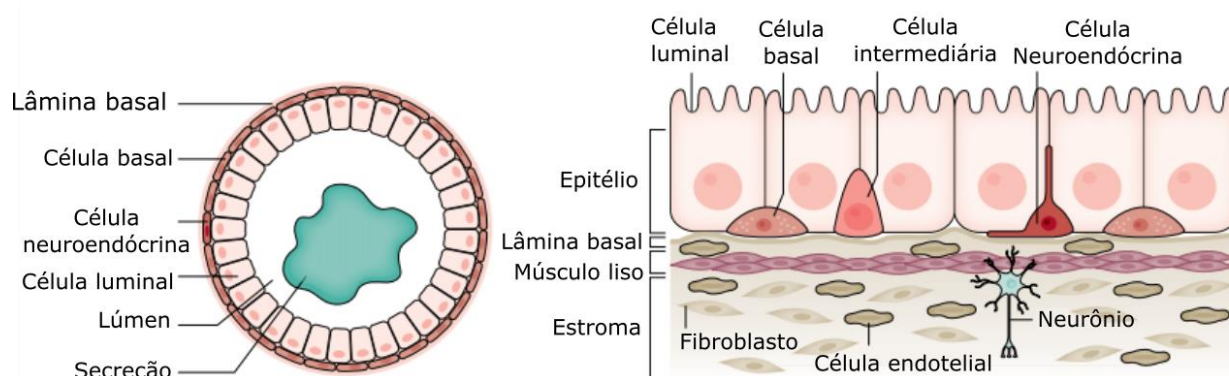


Figura 5. Esquema representativo dos tipos celulares encontrados na próstata adulta. Adaptado de Rebello et al., (2021).

A próstata, assim como o testículo e epidídimo, tem o início do processo de organogênese e crescimento ainda no período fetal, estando completamente formada somente quando indivíduo atingir a maturidade sexual. É essencial a presença de andrógenos tanto para a morfogênese quanto para a homeostasia do órgão adulto (Cunha et al., 1985; Aumüller, Seitz, 1990; Maccioni et al., 2003; Marker et al., 2003; Untergasser et al., 2005; Verze et al., 2016). Basicamente o processo de formação é dividida em 5 estágios: determinação, brotamento, ramificação, diferenciação e maturação (Prins; Putz, 2008) (Figura 6). Na primeira fase, no processo de organogênese a próstata se origina a partir do seio urogenital (SUG), que apresenta uma camada de células epiteliais derivadas da endoderme envolta por uma camada de mesênquima do seio urogenital (MUG). O SUG localiza-se na base da bexiga urinária em desenvolvimento, estando presente em ambos os sexos desde do 13º dia de gestação de roedores e da 7ª semana em humanos (Hynes; Fraher, 2004). A estrutura permanece morfológicamente igual até 17,5º dia de gestação e 10-12ª semana de gestação para humanos, a partir deste período começa o processo de morfogênese prostática dependente do andrógeno circulante produzido pelos testículos fetais (Kellokumpu-Lehtinen et al., 1980; Cunha et al., 1987; Marker et al., 2003; Welsh et al., 2008). Após ser determinada de fato a formação da próstata, os brotos epiteliais sólidos provenientes do epitélio do SUG no MUG circundante, crescem e se ramificam 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 distintos dos roedores ou as diferentes zonas prostáticas para os humanos. Tendo cada lobo um padrão de brotamento ductal característico (Cunha et al., 1987; Timms, 2008; Toivanen; Shen, 2017).

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., 1985). 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). Os outros componentes pertencem a diferentes famílias gênicas: como Sonic Hedgehog (Shh), Proteína Morfogenética Óssea (BMPs), Wingless-Related MMTV Integration site (Wnt) (Wilhelm et al., 2006), proteínas da via de sinalização da insulina/IGFs (Reynolds; Kyprianou, 2006).

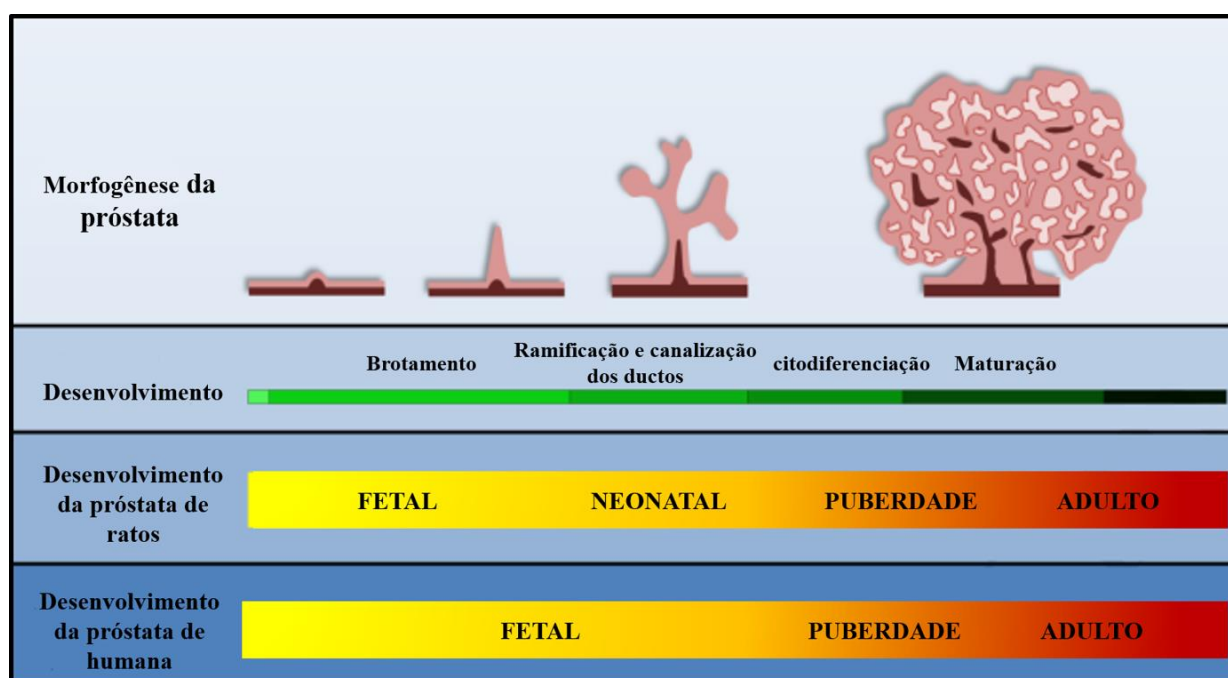


Figura 6. Esquema da morfogênese da próstata representando os estágios de desenvolvimento, linha do tempo e comparações entre ratos e adultos. Adaptado de Scarano et al., (2018) e Prins; Putz, (2008).

Portanto, para o desenvolvimento destes três órgãos (testículo, epidídimo e próstata) que completam o processo de morfogênese somente após o nascimento, os insultos que ocorrem no período crítico de formação e desenvolvimento são decisivos para a sua funcionalidade com a maturidade sexual. A maioria dos estudos experimentais sobre DOHaD avaliam os efeitos sobre o metabolismo, sendo que as pesquisas que avaliam as funções reprodutivas em animais submetidos à restrição proteica (RP) durante a gestação/lactação se intensificaram na última década (Langley-Evans, 2015; Picut; Parker, 2017). Neste contexto, estudos demonstraram que a RP durante a gestação e/ou lactação é responsável pelo atraso do tempo de instalação da puberdade e, conseqüentemente, da maturação sexual (Van Weissenbruch et al., 2005; Zambrano 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; Zambrano et al., 2005); alteração na concentração sérica de testosterona e estradiol (Villanova Teixeira et al., 2007; Rinaldi et al., 2013;

Colombelli et al., 2017), menor peso do testículo, epidídimo e próstata (Santos et al., 2004; Rinaldi et al. 2013; Gombar; Ramos, 2013), diminuição da expressão de receptores de andrógenos, quantidade de células de Sertoli e na qualidade espermática no testículo (Rodrigues-Gonzales et al., 2014; Toledo et al., 2011), aumento do estresse oxidativo no testículo e epidídimo (Toledo et al., 2011; Rodrigues-Gonzales et al., 2014) e alteração no movimento do fluido e na formação de vasos no epidídimo, afetando o desenvolvimento (Cavariani et al., 2019; Arrighi et al., 2010).

Especificamente para a próstata, estudos em modelos de RPM revelaram que o desenvolvimento e maturação prostática são afetados pela restrição proteica gestacional desde o início da vida. Pinho et al. (2014) observou atraso no desenvolvimento prostático na prole de animais já no dia pós-natal (DPN) 1, demonstrando redução do índice proliferativo das células luminais e redução da imunomarcagem do receptor de andrógeno (AR). Resultados similares foram visualizados por estudos já publicados do nosso grupo de pesquisa por Rinaldi et al., 2013, Colombelli et al. (2017) e Santos et al., (2019) com próstatas ventrais no DPN 10, 21 e 35. Observou-se redução do processo de angiogênese prostática, o que pode ter ocasionado uma menor troca de fatores de crescimento, nutrientes e hormônios entre os vasos e os compartimentos epitelial e estromal, impactando negativamente o desenvolvimento, maturação e função secretora glandular. Adicionalmente, tivemos alterações nas vias de AKT, desequilíbrio entre os eventos de proliferação e diferenciação das células prostáticas (Colombelli et al., 2017), além da formação de carcinoma *in situ* em ratos envelhecidos (Santos et al., 2019) (Figura 4).

1.3 Consumo de açúcares de adição

Além do cuidado com a dieta materna, nos últimos anos tem aumentado a preocupação com a dieta ao longo da vida, desde a infância até a vida adulta, uma vez que vêm crescendo o consumo de alimentos açucarados e bebidas adoçadas artificialmente que contêm “açúcares de adição” (Yarmolinsky et al., 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo de “açúcares de adição”, ou seja, carboidratos simples que são adicionados artificialmente durante o processamento industrial dos alimentos, devem ser não mais que 10% do total de calorias diárias, uma vez que a quantidade superior a 10% pode levar ao aumento de obesidade e doenças relacionadas ao metabolismo (Makarem et al., 2018), que são importantes fatores de risco para o câncer. O Brasil é o 5º maior consumidor de açúcar no mundo, com consumo de 50% a mais do que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que levou a um acordo entre o Ministério da Saúde e a indústria alimentícia para diminuir o açúcar em alguns produtos até 2022 (MS, 2018; USDA, 2020).

O aumento do consumo de produtos com carboidratos simples foi associado a elevação de consumo de alimentos processados (IPEA, 2012). Dentre os produtos mais consumidos, que contêm açúcar de adição, destacam-se os refrigerantes, que apresentam baixo valor nutricional e causam o mesmo sentimento de saciedade que comidas sólidas, assim, o seu alto consumo está associado ao aumento de ingestão energética total e, conseqüentemente, o aumento da prevalência de sobrepeso, além do desenvolvimento de SMs (Figura 5) (Gambero, et al.; 2018). Os mecanismos que ligam o consumo de “açúcares de adição” ao aumento da incidência de doenças incluem a corrosão do esmalte dentário por ácidos resultantes do metabolismo dos açúcares por bactérias, o comprometimento da auto-regulação do balanço energético, desenvolvimento de resistência à insulina, aumento da concentração de triglicerídeos, diminuição da concentração da lipoproteína de alta densidade circulante, aumento da massa de tecido adiposo abdominal, que caracteriza obesidades, e alterações no padrão de secreção do tecido adiposo (Wozniak et al., 2009; Zubiría et al., 2013; Gambero et al., 2018). Além disso, o consumo elevado de “açúcares de adição” pode ser associado a uma diminuição no teor de proteínas e de micronutrientes na dieta (Levy et al., 2012).

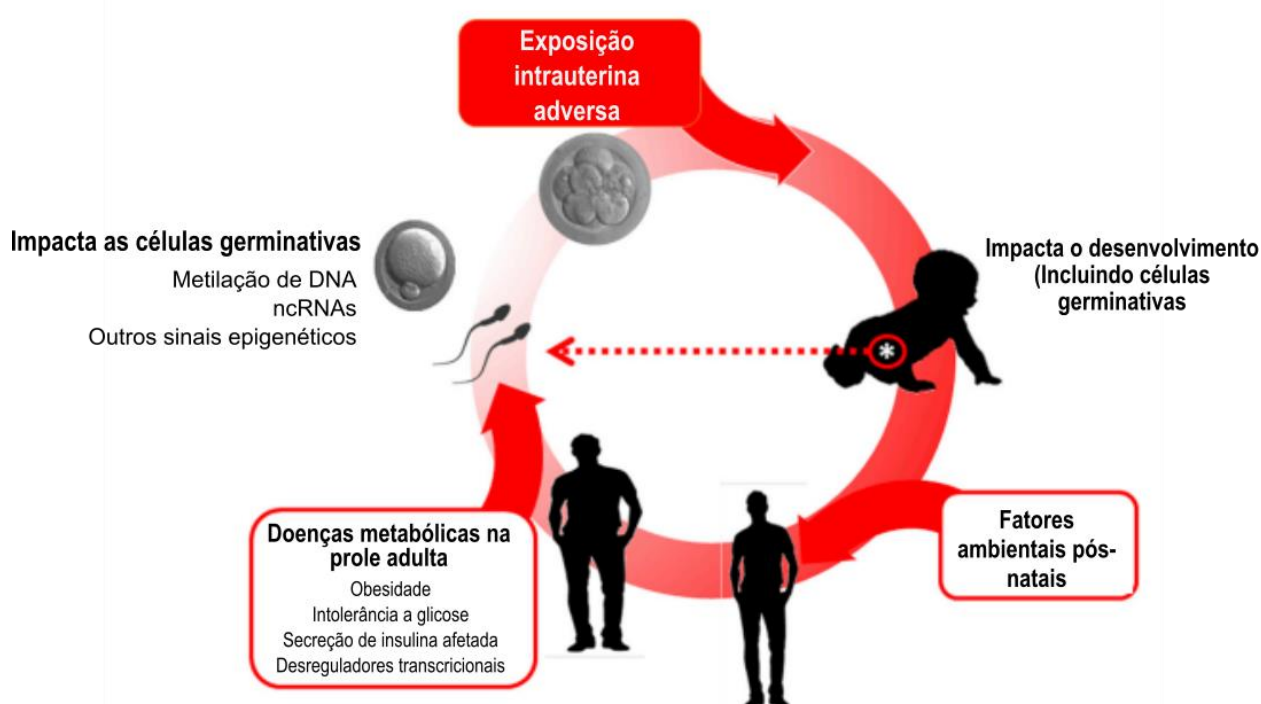


Figura 7. Imagem demonstrando a importância dos estudos de condições intrauterinas adversas associadas a um ambiente pós-natal desfavorável. Adaptado de Sales et al. (2017).

Foi demonstrado que uma dieta materna com alta quantidade de açúcares é responsável por disfunções no tecido adiposo da prole, e está relacionada a alterações epigenéticas associadas ao aumento da pressão arterial na prole de ratos idosos (Wu et al., 2016), além de aumentar a chance

do desenvolvimento de doenças crônicas, como a diabetes (Alzamendi et al., 2016). Já se sabe que, em adultos, a diabetes interfere negativamente nos parâmetros reprodutivos. Estudos demonstram que disfunções sexuais e reprodutivas, incluindo impotência, redução da libido, prejuízo da espermatogênese e infertilidade, diminuição da qualidade espermática, são decorrentes de alterações nos testículos e glândulas sexuais acessórias (Kolodny et al., 1974; Handselman et al., 1985; Vignon et al., 1991; Niven et al., 1995; Baccetti et al., 2002; Park et al., 2003). Em animais experimentais, tem sido observada alteração no ciclo estral, anovulação, redução em número de recrutamento folicular, diminuição da esteroidogênese e atrofia ovariana associados ao diabetes (Jhonson; Sidman, 1979; Murray et al., 1981; Steger et al., 1989; King; Rohrbach, 1990; Steger; Kienast, 1990; Altay et al., 2003; Scarano et al., 2006). Estes dados corroboram com estudos anteriores que demonstram danos testiculares causados pelo diabetes.

1.4 Restrição proteica materna e o consumo de “açúcares de adição” associados aos impactos na idade reprodutiva e no envelhecimento

Mundialmente, vem aumentando a idade média da população desde de 1980. Para 2050, estipula-se que o número de idosos seja de aproximadamente 2 bilhões. Em países em desenvolvimento, este aumento está relacionado com a melhoria das condições de vida e redução da taxa de mortalidade ao nascimento e durante a infância, além da diminuição de mortalidade por doenças infecciosas. Em países desenvolvidos, o aumento contínuo é devido a redução da taxa de mortalidade dos idosos (WHO, 2016). O envelhecimento é um conjunto de alterações em diferentes sistemas que podem alterar os fatores epigenéticos, encurtamento de telômeros, danos de DNA e disfunções mitocondriais que podem causar a diminuição da capacidade de combater infecções e de resposta à vacinação e aumentar a incidência de câncer (Dominguez; Barbagallo 2016; Akha, 2018; Mc Hugh; Gil. 2018). O envelhecimento também contribui e é considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como: isquemia, aterosclerose, sarcopenia, osteoporose, câncer, diabetes, doenças cardíacas e doenças neurodegenerativas (García-Velázquez; Arias, 2017). Apesar da complexidade inerente ao desenvolvimento destas doenças, estudos demonstram que o status nutricional durante períodos críticos de desenvolvimento tem forte impacto sobre a longevidade.

Portanto, tanto o consumo de açúcar, quanto a RPM estão fortemente ligados ao aumento da incidência de doenças crônicas na população em geral, como o ganho de peso, a obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares, condições consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Estudos recentes do nosso grupo, em ratos

355 velhos (DPN 540), demonstraram que a RPM por si só aumenta a incidência de alterações
356 prostáticas e o desenvolvimento de carcinoma *in situ* (Santos et al., 2019).

357 Há muito tempo sabe-se da relação do câncer com a inflamação, porém o desenvolvimento
358 de um ambiente cancerígeno também está ligado com o consumo de açúcar. Otto Warburg, em
359 1920, estudou o metabolismo das células no câncer, e notou que células cancerígenas se
360 aglutinavam em uma maior quantidade para consumir o açúcar, ou seja, células cancerígenas
361 consumiam mais glicose que células normais, este efeito ficou conhecido como o “efeito de
362 Warburg” (Kutchera et al.; 2020). Este é discutido em muitos tipos de câncer, inclusive no câncer
363 de próstata (CaP), que é o segundo câncer mais frequente entre os homens, ficando atrás apenas
364 do câncer de pele, e sendo a quinta causa principal de morte entre o sexo masculino (Bray et al.,
365 2018). Sabe-se que as células modificam o metabolismo de energia que é baixo em células
366 prostáticas normais e aumentam o metabolismo, alterando os processos catabólicos e anabólicos
367 (Cutruzzolà et al., 2017). Além disso, estudos epidemiológicos têm apresentado uma relação direta
368 do alto consumo de produtos com alta quantidade de açúcares com o aumento da incidência de
369 SMs, o qual consequentemente, contribui na incidência, agressividade e mortalidade do CaP
370 (Caliskan et al. 2019; Makaren et al., 2018; Miles et al., 2018).

372 2. JUSTIFICATIVA

374 Considerando-se o aumento do consumo de “açúcar de adição”, especialmente
375 influenciado pela ingestão de refrigerantes pelas crianças/adolescentes em idade escolar, associado
376 à importância da manutenção do ambiente intrauterino normal para o desenvolvimento da prole, é
377 relevante investigar se o microambiente intrauterino alterado pela RPM “programa” a prole a
378 responder diferentemente à exposição pós-natal ao açúcar refinado (forma mais consumida de
379 açúcar no mundo). Foram avaliados neste estudo dois aspectos de extrema relevância
380 socioeconômica:

382 1. Alteração dos parâmetros reprodutivos em animais adultos jovens submetidos à RPM associado
383 ao consumo de açúcar. Esta análise se justifica em função do aumento crescente do número de
384 indivíduos com dificuldades de reprodução, associado ao aumento de recursos destinados à
385 reprodução assistida.

386 2. Histopatologia da próstata de ratos velhos submetidos à RPM associado ao consumo de açúcar.
387 Uma vez que em resultados já publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a RPM
388 pode levar ao desenvolvimento de um carcinoma *in situ* na próstata no envelhecimento.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

1) Avaliar os efeitos da restrição proteica materna associado ao consumo de açúcar pós-natal pela análise de expressão global de proteínas (proteoma) da próstata ventral de ratos machos da linhagem *Sprague Dawley* nos dias pós-natais 90 (adultos jovens) e 540 (velhos) e associar as proteínas diferencialmente expressas às alterações funcionais visualizadas na próstata ventral.

2) Analisar os efeitos da restrição proteica materna nos períodos de gestação e lactação e o consumo de açúcar pós-natal nos parâmetros funcionais dos órgãos reprodutivos (próstata, testículo e epidídimo) de ratos machos adultos *Sprague Dawley* com 90 dias de idade.

3.2 Objetivos específicos

1) Caracterizar o proteoma da próstata ventral de animais adultos e velhos e correlacionar com os parâmetros funcionais da glândula.

2) Comparar os resultados do proteoma dos animais adultos com os animais velhos pra verificar se as alterações da idade adulta persistiram até o envelhecimento.

3) Analisar parâmetros funcionais reprodutivos básicos como a morfologia e a contagem espermática dos órgãos reprodutivos (próstata ventral, testículo e epidídimo) dos animais no dia pós-natal 90.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se descritos nos próximos 2 capítulos (capítulos II e III). No capítulo II são apresentados os resultados referentes as análises proteômicas realizadas nos animais adultos (dia pós-natal 90) e no envelhecimento (dia pós-natal 540). O capítulo III é composto pelos resultados funcionais dos órgãos reprodutivos (próstata, testículo e epidídimo) no dia pós-natal 90.

Referências Bibliográficas

- AKHA, A. A. S. **Aging and the immune system: An overview** *Journal of Immunological Methods* Elsevier B.V., , 1 dez. 2018.
- AL-GUBORY, K. H. Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 29, n. 1, p. 17–31, 2014.
- ALBERTI, K. G. M. M. et al. **Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International atherosclerosis society; And international association for the study of obesity** *Circulation* Circulation, , out. 2009.
- ALTAY, B. et al. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. SUPPL. 2, p. 828–831, 1 set. 2003.
- ALZAMENDI, A. et al. High risk of metabolic and adipose tissue dysfunctions in adult male progeny, due to prenatal and adulthood malnutrition induced by fructose rich diet. **Nutrients**, v. 8, n. 3, 2016.
- ARRIGHI, S. et al. Undernutrition during foetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1661–9, dez. 2010.
- AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. **International review of cytology**, v. 121, p. 127–231, 1990.
- BACCETTI, B. et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2673–2677, 1 out. 2002.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C.; LAW, C. M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 43, n. 3, p. 237–240, set. 1989.
- BARKER, D. J. P. et al. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **British Medical Journal**, v. 298, n. 6673, p. 564–567, 1989a.
- BARKER, D. J. P. et al. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577–580, 9 set. 1989b.
- BARKER, D. J. P. The developmental origins of well-being. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1449, p. 1359–1366, set. 2004.
- BARKER, D. J. P.; OSMOND, C. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077–1081, maio 1986.
- BELLEANNÉE, C.; THIMON, V.; SULLIVAN, R. **Region-specific gene expression in the epididymis** *Cell and Tissue Research* Cell Tissue Res, , set. 2012.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- BRETON, S. et al. **Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis** *Asian Journal of Andrology* Medknow Publications, , 1 jan. 2016.
- BURNS, S. P. et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. **Journal of Clinical**

- Investigation**, v. 100, n. 7, p. 1768–1774, 1 out. 1997.
- CALISKAN, S. et al. The effect of metabolic syndrome on prostate cancer final pathology. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 15, n. 8, p. S47–S50, 1 mar. 2019.
- CALZADA, L. et al. Maternal protein restriction during gestation impairs female offspring pancreas development in the rat. **Nutrition Research**, v. 36, n. 8, p. 855–862, 1 ago. 2016.
- CARPINELLO, O. J.; DECHERNEY, A. H.; HILL, M. J. Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 36, n. 3–4, p. 177–182, 13 maio 2018.
- CAVARIANI, M. M. et al. Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019.
- CHEN, H.; NEMBHARD, W. N.; STOCKWELL, H. G. Sex-Specific Effects of Fetal Exposure to the 1959–1961 Chinese Famine on Risk of Adult Hypertension. **Maternal and Child Health Journal**, v. 18, n. 3, p. 527–533, abr. 2014.
- COLOMBELLI, K. T. et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and Comparative Endocrinology**, v. 246, p. 258–269, 15 maio 2017.
- COSTA-SILVA, J. H. et al. Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: Potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? **European Journal of Nutrition**, v. 48, n. 7, p. 437–445, 2009.
- CUNHA, G. R. et al. Stromal-epithelial interactions in adult organs. **Cell differentiation**, v. 17, n. 3, p. 137–48, set. 1985.
- CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987.
- CUTRUZZOLÀ, F. et al. Glucose metabolism in the progression of prostate cancer. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. FEB, 2017.
- DAHRI, S. et al. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. **Diabetes**, v. 40 Suppl 2, p. 115–20, dez. 1991.
- DE BRITO ALVES, J. L. et al. Short-and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 4, p. 606–615, 28 fev. 2014.
- DE BRITO ALVES, J. L. et al. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 12, p. 1177–1184, 1 dez. 2016.
- DE OLIVEIRA, J. C. et al. Protein restriction during the last third of pregnancy malprograms the neuroendocrine axes to induce metabolic syndrome in adult male rat offspring. **Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 1799–1812, 2016.
- DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; ROSS, M. G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 4, p. 633–641, 2015.
- DOMINGUEZ, L. J.; BARBAGALLO, M. **The biology of the metabolic syndrome and aging** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* Lippincott Williams and Wilkins, , 1 jan. 2016.
- EL-ALFY, M. et al. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. **Microscopy Research and Technique**, v. 51, n. 5, p. 436–446, 1 dez. 2000.
- ENGLAND, L. J. et al. **Developmental toxicity of nicotine: A transdisciplinary synthesis and implications for emerging tobacco products** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Elsevier

Ltd, 1 jan. 2017.

- FALCÃO-TEBAS, F. et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 3, p. 372–377, 14 fev. 2012.
- FARID, S. A. et al. Long term effects of maternal protein restriction on postnatal lung alveoli development of rat offspring. **Folia Morphologica (Poland)**, v. 74, n. 4, p. 479–485, 2015.
- FERREIRA, D. S. et al. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutritional Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 369–375, 13 set. 2016.
- FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 449–456, 14 fev. 2013.
- GAMBARO, S. E. et al. M1 macrophage subtypes activation and adipocyte dysfunction worsen during prolonged consumption of a fructose-rich diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 61, p. 173–182, 1 nov. 2018.
- GARCÍA-VELÁZQUEZ, L.; ARIAS, C. The emerging role of Wnt signaling dysregulation in the understanding and modification of age-associated diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 37, p. 135–145, 2017.
- GIANATIEMPO, O. et al. Intergenerational transmission of maternal care deficiency and offspring development delay induced by perinatal protein malnutrition. **Nutritional Neuroscience**, v. 23, n. 5, p. 387–397, 3 maio 2020.
- GOLDSTEIN, J. M. et al. Prenatal stress-immune programming of sex differences in comorbidity of depression and obesity/metabolic syndrome. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 425–436, 2016.
- GOMBAR, F. M.; RAMOS, C. F. Perinatal malnutrition programs gene expression of leptin receptors isoforms in testis and prostate of adult rats. **Regulatory Peptides**, v. 184, p. 115–120, jun. 2013.
- HABIB, S.; ZHANG, Q.; BAUM, M. Prenatal Programming of Hypertension in the Rat: Effect of Postnatal Rearing. **Nephron Extra**, v. 1, n. 1, p. 157–165, jan. 2011.
- HALES, C.; BARKER, D. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 5, p. 1215–1222, out. 2013.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. **Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis***. [s.l: s.n.].
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 5–20, 2001.
- HALLOWS, S. E.; REGNAULT, T. R. H.; BETTS, D. H. The Long and Short of It: The Role of Telomeres in Fetal Origins of Adult Disease. **Journal of Pregnancy**, v. 2012, 2012.
- HANDELSMAN, D. J. et al. Testicular Function and Glycemic Control in Diabetic Men A Controlled Study. **Andrologia**, v. 17, n. 5, p. 488–496, 1985.
- HAYWARD, S. W.; BRODY, J. R.; CUNHA, G. R. An edgewise look at basal epithelial cells: Three-dimensional views of the rat prostate, mammary gland and salivary gland. **Differentiation**, v. 60, n. 4, p. 219–227, 1 ago. 1996.
- HE, X. et al. Erratum to: Prenatal nicotine exposure induces HPA axis-hypersensitivity in offspring rats via the intrauterine programming of up-regulation of hippocampal GAD67 (Arch Toxicol, 10.1007/s00204-017-1996-8). **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 12, p. 3945–3946, 2017.
- HYNES, P. J.; FRAHER, J. P. The development of the male genitourinary system. I. The origin of the urorectal septum and the formation of the perineum. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 57, n. 1, p. 27–36, 1 jan. 2004.

- IDF. **Eighth edition 2017**. [s.l.: s.n.].
- JOBGEN, W. S. et al. Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 571–588, set. 2006.
- JOHNSON, L. M.; SIDMAN, R. L. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. **Biology of Reproduction**, v. 20, n. 3, p. 552–559, 1979.
- JOSEPH, A.; SHUR, B. D.; HESS, R. A. **Estrogen, efferent ductules, and the epididymis****Biology of Reproduction**Biol Reprod, , 1 fev. 2011.
- KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; SANTTI, R.; PELLINIEMI, L. J. Correlation of early cytodifferentiation of the human fetal prostate and leydig cells. **The Anatomical Record**, v. 196, n. 3, p. 263–273, 1 mar. 1980.
- KING, T. S.; ROHRBACH, D. H. Reduced aminergic synthesis in the hypothalamus of the infertile, genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) male mouse. **Experimental Brain Research**, v. 81, n. 3, p. 619–625, ago. 1990.
- KOLODNY, R. C. et al. Sexual dysfunction in diabetic men. **Diabetes**, v. 23, n. 4, p. 306–309, 1974.
- KUTSCHERA, U. et al. **The Warburg-effects: basic metabolic processes with reference to cancer development and global photosynthesis****Plant Signaling and Behavior**Taylor and Francis Inc., , 2 jul. 2020.
- LAM, D. W.; LEROITH, D. **Metabolic Syndrome**. [s.l.] MDText.com, Inc., 2000.
- LANGLEY-EVANS, S. C. **Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review****Journal of Human Nutrition and Dietetics**Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2015.
- LEANDRO, C. G. et al. Maternal moderate physical training during pregnancy attenuates the effects of a low-protein diet on the impaired secretion of insulin in rats: Potential role for compensation of insulin resistance and preventing gestational diabetes mellitus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. **Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology****Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**Endocrinol Metab Clin North Am, , set. 2011.
- LEVY, R. B. et al. Availability of added sugars in Brazil: distribution, food sources and time trends. **Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology**, v. 15, n. 1, p. 3–12, mar. 2012.
- LI, X. et al. **“Three hits” hypothesis for developmental origins of health and diseases in view of cardiovascular abnormalities****Birth Defects Research**John Wiley and Sons Inc, , 1 jun. 2017.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man - PubMed. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38–50, 1991.
- MACCIONI, M.; CABEZAS, L. E.; RIVERO, V. E. Effect of Prostatein, the Major Protein Produced by the Rat Ventral Prostate, on Phagocytic Cell Functions. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 6, p. 473–480, dez. 2003.
- MAKAREM, N. et al. Consumption of Sugars, Sugary Foods, and Sugary Beverages in Relation to Cancer Risk: A Systematic Review of Longitudinal Studies. **Annual Review of Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 17–39, 2018.
- MARCINIAK, A. et al. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 133–138, 2017.
- MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165–174, 15 jan. 2003.
- MARWARHA, G. et al. Maternal low-protein diet decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the brains of the neonatal rat offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 45,

- p. 54–66, 2017.
- MCMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiological reviews**, v. 85, n. 2, p. 571–633, abr. 2005.
- MCNEAL, J. E. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. **Investigative Urology**, v. 15, n. 4, p. 340–345, 1 jan. 1978.
- MCNEAL, J. E. Normal and pathologic anatomy of prostate. **Urology**, v. 17, n. 3 Suppl., p. 11–16, 1 mar. 1981.
- MILES, F. L.; NEUHOUSER, M. L.; ZHANG, Z. F. Concentrated sugars and incidence of prostate cancer in a prospective cohort. **Proceedings of the International Astronomical Union**, v. 120, n. 6, 2018.
- MITA, P.; HINTON, B. T.; DUFOUR, J. M. **The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions** *Biology of Reproduction* Biol Reprod, , maio 2011.
- MOHOLDT, T.; HAWLEY, J. A. **Maternal Lifestyle Interventions: Targeting Preconception Health** *Trends in Endocrinology and Metabolism* Elsevier Inc., , 1 ago. 2020.
- MURRAY, F. T. et al. The pituitary-testicular axis in the streptozotocin diabetic male rat: evidence for gonadotroph, Sertoli cell and Leydig cell dysfunction. **International Journal of Andrology**, v. 4, n. 1–6, p. 265–280, 1981.
- NAISA, C. et al. Área : Cv () Chsa () Avaliação Da Composição Corporal Por Imc , Índice De Lee E Bia Área : Cv () Chsa () Ecet (). n. cm, p. 2009–2011, 2013.
- NASCIMENTO, L. et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 8, p. 880–887, ago. 2014.
- NEGRATO, C.; GOMES, M. Low birth weight: causes and consequences. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 5, n. 1, p. 49, 2013.
- NIVEN, M. J.; HITMAN, G. A.; BADENOCH, D. F. A Study of Spermatozoal Motility in Type 1 Diabetes Mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 12, n. 10, p. 921–924, 1995.
- NORIEGA, N. C. et al. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and long-evans rats. **Toxicological Sciences**, v. 111, n. 1, p. 163–178, 2009.
- O'DONNELL, K. J.; MEANEY, M. J. Fetal Origins of Mental Health: The Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis. **Am J Psychiatry**, v. 174, p. 319–328, 2017.
- OZANNE, S. E. **Epigenetics and metabolism in 2014: Metabolic programming-knowns, unknowns and possibilities** *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, fev. 2015.
- OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Catch-up growth and obesity in male mice. **Nature**, v. 427, n. 6973, p. 411–412, 29 jan. 2004.
- PARK, J. IL et al. Transforming growth factor- β 1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF- κ B, JNK, and Ras signaling pathways. **Oncogene**, v. 22, n. 28, p. 4314–4332, 10 jul. 2003.
- PAULINO-SILVA, K. M.; COSTA-SILVA, J. H. Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 11, p. 1046–1053, 1 nov. 2016.
- PEEHL, D. M. **Primary cell cultures as models of prostate cancer development** *Endocrine-Related Cancer* Endocr Relat Cancer, , mar. 2005.
- PETRY, C. J. et al. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. **International journal of experimental diabetes research**, v. 2, n. 2, p. 139–43, 2001.
- PICUT, C. A.; PARKER, G. A. Postnatal Organ Development as a Complicating Factor in Juvenile

- Toxicity Studies in Rats. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 1, p. 248–252, 2017.
- PINHO, C. F. et al. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 7, p. 967–973, ago. 2014.
- PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2582–9, out. 2000.
- PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 641–659, 2008.
- RAMÍREZ-LÓPEZ, M. T. et al. El papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual: Revisión de los mecanismos biológicos implicados. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 6, p. 2433–2445, 2015.
- RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 7, p. 349–353, 12 ago. 1976.
- REBELLO, R. J. et al. Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2021.
- REYNOLDS, A. R.; KYPRIANOU, N. **Growth factor signalling in prostatic growth: Significance in tumour development and therapeutic targeting**. British Journal of Pharmacology. **Anais...Br J Pharmacol**, fev. 2006
- RIBEIRO, D. L. et al. AKT and AMPK activation after high-fat and high-glucose in vitro treatment of prostate epithelial cells. **Hormone and Metabolic Research**, v. 46, n. 7, p. 471–476, 5 maio 2014.
- RINALDI, J. C. et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763–774, 19 abr. 2013.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M.-C. **The Epididymis**. [s.l: s.n.].
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L. et al. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 36, n. 6, p. 9721, dez. 2014.
- SALES, V. M.; FERGUSON-SMITH, A. C.; PATTI, M. E. **Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations**Cell MetabolismCell Press, , 7 mar. 2017.
- SANTOS, A. M. DE S. et al. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 36, n. 1, p. 27–33, jan. 2004.
- SANTOS, S. A. A. et al. Maternal low-protein diet impairs prostate growth in young rat offspring and induces prostate carcinogenesis with aging. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 74, n. 6, 2019.
- SCARANO, W. R. et al. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 482–488, ago. 2006.
- SCARANO, W. R. et al. Cell junctions in the prostate: an overview about the effects of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCS) in different experimental models. **Reproductive Toxicology**, v. 81, p. 147–154, 2018.
- SCHULZ, L. C. **The Dutch hunger winter and the developmental origins of health and disease**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of AmericaNational Academy of Sciences, , 28 set. 2010.
- SELAHATTIN CAHSKAN, SELÇUK KABA, EMRAH ÖZSOY, MUZAFFER OĞUZ KELEŞ, ORHAN KOCA, MEHMET AKYÜZ, M. İ. K.; DEPARTMENT. The effect of metabolic syndrome on prostate cancer final pathology. p. 47–50, 2019.
- SENE, L. DE B. et al. Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-

- mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71310, ago. 2013.
- SHIRAI, T. et al. Experimental prostate carcinogenesis - Rodent models. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 462, n. 2–3, p. 219–226, 2000.
- SIGIT, F. S. et al. The prevalence of metabolic syndrome and its association with body fat distribution in middle-aged individuals from Indonesia and the Netherlands: A cross-sectional analysis of two population-based studies. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 1, p. 2, 7 jan. 2020.
- SMITH, C. A. Effects of maternal undernutrition upon the newborn infant in Holland (1944-1945). **The Journal of Pediatrics**, v. 30, n. 3, p. 229–243, 1 mar. 1947.
- STEGER, R. W. et al. Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. **Endocrinology**, v. 124, n. 4, p. 1737–1743, 1989.
- STEGER, R. W.; KIENAST, S. G. Effect of continuous versus delayed insulin replacement on sex behavior and neuroendocrine function in diabetic male rats. **Diabetes**, v. 39, n. 8, p. 942–948, 1990.
- TARRY-ADKINS, J. L.; OZANNE, S. E. The impact of early nutrition on the ageing trajectory. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 2, p. 289–301, 2014.
- TARRY-ADKINS, J. L.; OZANNE, S. E. Nutrition in early life and age-associated diseases. **Ageing Research Reviews**, v. 39, p. 96–105, 2017.
- TIMMS, B. G. Prostate development: A historical perspective. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 565–577, 2008.
- TIMMS, B. G.; HOFKAMP, L. E. **Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia** Differentiation Elsevier, , 1 nov. 2011.
- TOIVANEN, R.; SHEN, M. M. **Prostate organogenesis: Tissue induction, hormonal regulation and cell type specification** Development (Cambridge) Company of Biologists Ltd, , 15 abr. 2017.
- TOLEDO, F. C. et al. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 9, n. 1, p. 94, jun. 2011.
- UNTERGASSER, G.; MADERSBACHER, S.; BERGER, P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 3, p. 121–128, mar. 2005.
- VAISERMAN, A. M. Early-life nutritional programming of longevity. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 5, n. 5, p. 325–338, 2014.
- VAN DER BEEK, E. M. **NUTRITIONAL PROGRAMMING AND LATER LIFE**. [s.l.: s.n.].
- VAN WEISSENBRUCH, M. M. et al. **Fetal nutrition and timing of puberty**. Endocrine development Endocr Dev, , 2005.
- VEGA, C. C. et al. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 5, p. 1483–1499, 2016.
- VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. . 1 jul. 2016, p. 379–386.
- VIGNON, F. et al. Comparative study of semen in diabetic and healthy men. **Diabete et Metabolisme**, v. 17, n. 3, p. 350–354, 1 maio 1991.
- VILANOVA TEIXEIRA, C. et al. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and estrogen receptors expression in rat testis at weaning. **Journal of Endocrinology**, v. 192, n. 2, p. 301–311, fev. 2007.
- WADHWA, P. D. et al. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. . 26 set. 2009, p. 358–368.
- WALKER, C. L.; HO, S. M. **Developmental reprogramming of cancer susceptibility** Nature

Reviews CancerNIH Public Access, , jul. 2012.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479–1490, 1 abr. 2008.

WHO | WHO calls on countries to reduce sugars intake among adults and children. **WHO**, 2016.

WILHELM, D. et al. Comparative proteomic analysis to study molecular events during gonad development in mice. **Genesis**, v. 44, n. 4, p. 168–176, abr. 2006.

WOZNIAK, S. E. et al. **Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article***Digestive Diseases and Sciences*Dig Dis Sci, , set. 2009.

WU, L. et al. High sucrose intake during gestation increases angiotensin II type 1 receptor-mediated vascular contractility associated with epigenetic alterations in aged offspring rats. **Peptides**, v. 86, p. 133–144, 2016.

YARMOLINSKY, J. et al. Artificially Sweetened Beverage Consumption Is Positively Associated with Newly Diagnosed Diabetes in Normal-Weight but Not in Overweight or Obese Brazilian Adults. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 2, p. 290–297, 2016.

ZAMBRANO, E. et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **The Journal of physiology**, v. 563, n. Pt 1, p. 275–284, fev. 2005.

ZANA-TAIEB, E. et al. Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs: morphometric and gene expression analysis. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78326, nov. 2013.

ZENZMAIER, C.; UNTERGASSER, G.; BERGER, P. **Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell***Experimental Gerontology*Exp Gerontol, , nov. 2008.

ZHENG, J. et al. Maternal low-protein diet modulates glucose metabolism and hepatic microRNAs expression in the early life of offspring. **Nutrients**, v. 9, n. 3, 2017.

ZHU, Z.; CAO, F.; LI, X. **Epigenetic Programming and Fetal Metabolic Programming***Frontiers in Endocrinology*Frontiers Media S.A., , 3 dez. 2019.

ZUBIRÍA, M. G. et al. Excess fructose intake-induced hypertrophic visceral adipose tissue results from unbalanced precursor cell adipogenic signals. **FEBS Journal**, v. 280, n. 22, p. 5864–5874, nov. 2013.

CAPÍTULO II - Artigo

The proteome landscape of adult and aging prostate rats subjected to maternal low protein diet associated with postnatal sugar consumption

COLOMBELLI, K.T.¹; FIORETTO, M.N.¹; SILVA, C.L.F.¹; SANTOS, S.A.A.¹; CAMARGO, A.C.L.¹; CONSTANTINO, F.B.¹; PORTELA, L.M.F.¹; MANI, F.²; OLIVEIRA, R.A.; MACKLIN, A.³ IGNATCHENKO, V.³; KISLINGUER, T.³; JUSTULIN, L.A.¹

¹ Department of Structural and Functional Biology, Morphology sector, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu- SP, Brazil.

² Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu- SP, Brazil.

³ Department of Medical Biophysics, Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Toronto- Canada.

Corresponding author: Luis A Justulin

Sao Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, SP, Brazil.

Zip Code: 18618-689

Phone number: +551438800481

email: justulin@ibb.unesp.br

39

ABSTRACT

Maternal insults during neonatal and postnatal life can alter the functionality of the prostate. Female rats that received a low protein diet (LPD) during gestational and lactation periods can impair prostate morphogenesis and causes an increased incidence of prostatic disorders in aging animals. Besides, the LPD is associate with the increasing of metabolic syndromes and these effects can be enhanced by sedentary life and an increase in sugar consumption. The aim of this study was to investigate if sugar consumption after weaning until adult life (postnatal day- PND) 90, amplified the negative impact of maternal LPD in male Sprague Dawley offspring on PND 90 and 540. The females received either control (CTR, 17% protein) or the LPD (6% protein) during the gestational and lactational periods. In the weaning (PND 21) the male offspring rats were divided into 4 groups: Control (CTR; normal water); Control+sugar (CTR+SUG; 10% sugar in water); Gestational and Lactational Low Protein (GLLP; normal water); GLLP+SUG (10% sugar in water). After PND 90, all the animals received normal water. The animals were euthanized on PND 90 and 540. It was realized the oral glucose tolerance test (OGTT) and metabolic profile analyses. The ventral prostates (VP) were collected to evaluate the alterations in the proteomic profile associated with the morphophysiological parameters. The total proteins, triglycerides, glucose, and total cholesterol did not have any changes in both ages. In OGTT analyses showed a significant increase in glycemia in the CTR+SUG group in 120 minutes and in area under curve (AUC) when compared to the CTR group ($p<0.05$), this result indicating a glucose sensibility, that possibly there is a relation with the higher intake of sugar solution, consequently lower intake of diet and body weight from CTR+SUG and GLLP+SUG. The anogenital distance (AGD) was reduced in GLLP and GLLP+SUG groups and, on PND 90 the VP weight did not have any change, while on PND 540 this parameter was reduced in GLLP and GLLP+SUG groups. The proteomic profile demonstrated just some enrichment pathways that helped to understand better the effects visualized in animals from different experimental groups. The differentially expressed proteins (DEPs) by sugar consumption altered pathways related to glucose metabolism and autophagy, although these processes are common during aging, these pathways remained altered just in CTR+SUG and GLLP+SUG groups. The GLLP group altered pathways related to cell cycle, cellular proliferation, and estrogen pathways. The enriched terms in the experimental groups in each age by differentially expressed proteins (DEP) are reflected in the biometric, water, and diet intake and morphophysiological alterations visualized on PND 90 and 540. Since both ages showed variations in the compartment frequency in the epithelium, lumen, and stroma; proliferation index, prostatein expression, and development of some lesions such as atrophy, dysplasia, and carcinoma in situ. So, the results showed that the MLP diet enhances the effects of postnatal sugar consumption since some parameters were more reduced in the GLLP+SUG group than the GLLP group. Additionally, autophagy alterations stimulated by sugar consumption visualized from PND 90 until 540, can have to exacerbate the alterations affecting the homeostasis and contribute to the development of prostatic lesions.

Keywords: DOHaD, Maternal Low protein, Sugar consumption, Prostate, Proteomic.

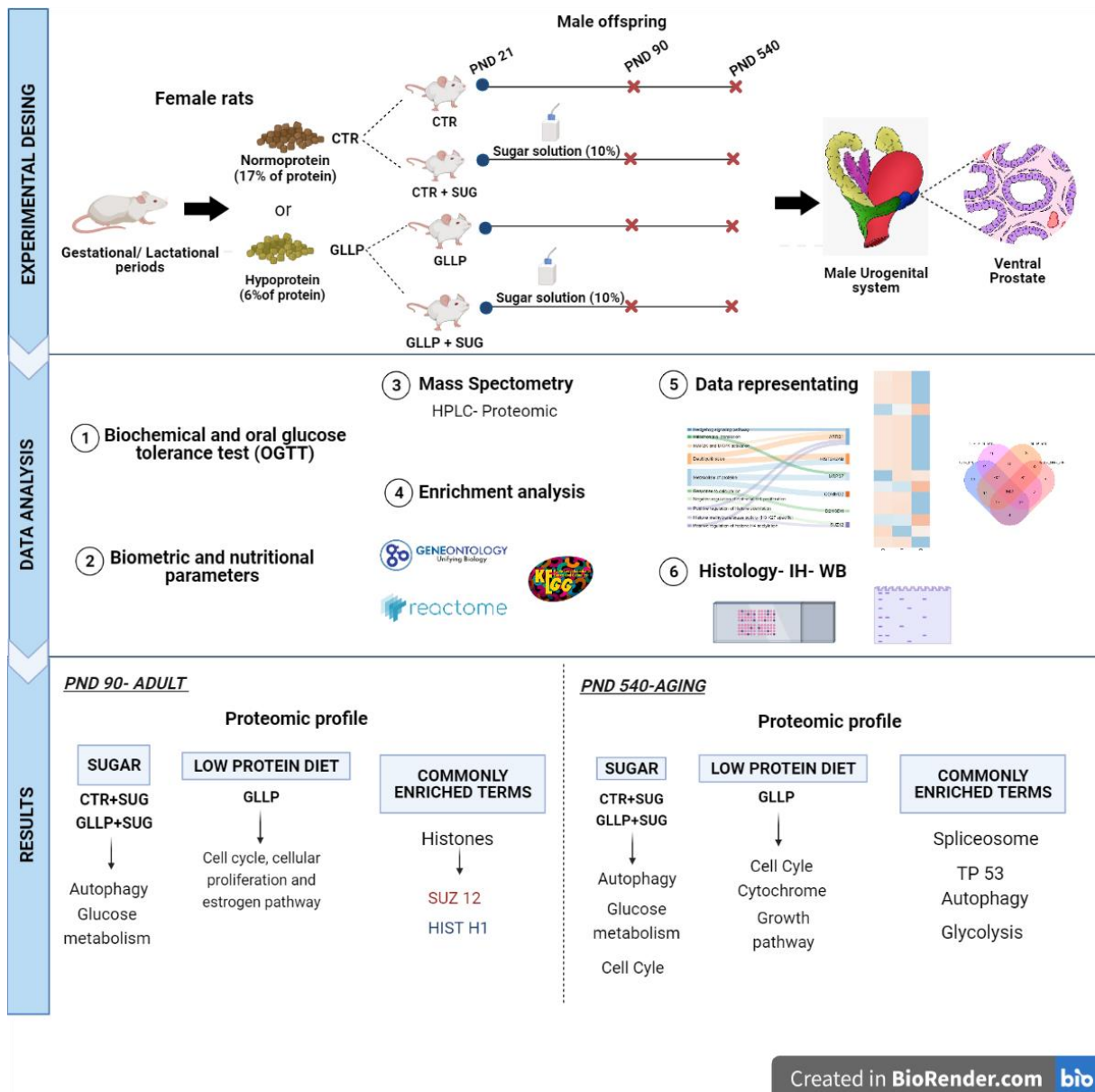


Figure 1. Schematic representation of the experimental design, data analysis, and results. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+Sugar group; GLLP- Gestation and lactation low protein diet group; GLLP+SUG- Gestational and Lactation Low Protein+Sugar group; PND- postnatal- day 21, 90 and 540; IH- Immunohistochemistry; Ventral prostate (VP); upregulated proteins in red, downregulated proteins in blue.

1. Introduction

The neonatal period is a window in which maternal malnutrition and offspring post-natal dietary habits may cause a permanent change in the pattern and characteristics of development leading to a risk onset of disease in adult life or aging (Zambrano et al., 2014; Fleming et al., 2015). These lifelong consequences are related to the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis, which parental early life experiences may permanently alter offspring development and physiology, modulating health trajectories throughout life (Barker et al., 1990; Schulz, 2010; Wadhwa et al., 2009). The most well-known

human evidence supporting the DOHaD effects is the Dutch Famine that happened during the end of the second world war. During this period the caloric intake was reported to be as low as 500 to 600 calories per person per day.

Researchers suggesting that depending on the period that the mother has exposed the effects are different, additionally, a long exposure period can worsen the effects and affect more organs and systems (Ravelli et al., 1976; Langley evans, 2014). One of the most common DOHaD experimental models is the low protein diet (LPD) offered to dams during the gestation and lactation periods (Rinaldi et al., 2013; Sene et al., 2013; Pinho et al., 2014; Oliveira et al., 2016; Colombelli et al., 2017; Santos et al., 2019). The maternal LPD during the gestational and/or lactation periods causes alterations such as low birth weight, increased systolic pressure and, insulin resistance, factors which can predispose the development of metabolic syndromes (MSs) an adulthood (Bai et al., 2012; Claycombe et al., 2015; Dalvi et al., 2018).

According to the World Health Organization (WHO), MS has been considered a health problem that can get worse by the increase of consumption of ultra-processed food and drinks, that have a high quantity of 'added sugar' and, associated with sedentary lifestyle habits (Dearden; Ozanne, 2014; Langley-Evans, 2015; Malik; Hu, 2015). Sugar consumption is growing, especially in low- and middle-income countries, it is higher mainly in adolescents (Ford et al., 2017; Hyer et al., 2019). The adults who were obese during childhood had twice as likely to maintain this obesity into adulthood (Pulgarón, 2013). Besides that, experimental evidence with rodents shown that even low levels of added sugar consumption affecting negative survival, competitive ability, and reproduction (Ruff et al., 2013).

The reproductive studies with prostate with maternal LPD associated postnatal sugar consumption model are scarce. Our research group demonstrated that maternal LPD during the gestational and/or lactation periods is related to a decrease of ventral prostate weight, delay of development, imbalance of proliferation index and prostatic cell differentiation, a decrease of angiogenesis process in animals on a postnatal day (PND) 10 and 21, an increase of oxidative stress, and development of the carcinoma in situ on PND 540 and, alterations in molecular pathways involved in prostate carcinogenesis (Colombelli et al., 2017; Santos, et al. 2019; Santos et al., 2020; Portela et al., 2021). The effects of consumption of ultra-processed food and drinks with added sugar are related to a decrease of testosterone and testosterone/estrogen ratio and spermatogenesis impairment (Martins et al., 2019; León-Ramírez et al., 2021).

The last decades were marked by major advances in the large-scale sequencing studies based on the combination of "omics", among then the proteomic technologies may allow physicians to identify possible associated etiologies that affect the mother during pregnancy and lead to associated complications affecting the development of offspring (Vora et al., 2019).

We investigated by ventral prostate proteomic profile analyses if the maternal LPD associated with postnatal sugar consumption affects the functionality of the ventral prostate in adults and enhances the pathologies in aging.

2. Material and methods

2.1 Animals and experimental design

Adult female (90 days old, n= 20 per group) and male (90 days old, n= 20) *Sprague Dawley* rats were obtained from the Central Stock breeder at the State University of Campinas (Campinas, SP, Brazil). The animals were maintained under controlled temperature (22 to 25°C), relative humidity (55%), and photoperiod (12 hour), with free access to water and diet. All experimental procedures were in accordance with the Ethical Animal research principles and Experimentation adopted by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and approved by Biosciences Institute/Unesp Ethical Committee on Animal Use of the Institute of Biosciences, São Paulo State University (Protocol number- 951) (Appendix 1).

Virgin female rats were mated overnight with established male breeders and after detection of spermatozoa in the vaginal smear was designated as Gestational Day 0 (GD 0). The dams were placed in individual boxes and separated into two experimental groups: 1) Control group (CTR, n=20), dams fed with normoprotein diet (17% protein) during gestation and lactation periods and 2) Gestation and Lactation Low Protein group (GLLP, n=20), dams fed with low protein diet (6% protein). The normoprotein and low protein diets were provided by Pragsoluções (PragSoluções, SP- Brazil) (Supplementary Table 1). All diets were isocaloric and normosodic and were prepared as recommended by American Institute of Nutrition (AIN 93-G). The metabolic energy of diet was calculated using the following metabolic factor values: protein- 4.0 kcal/g (16.76 kJ/g), fat- 9.0 kcal/g (37.71 kJ/g) and digested carbohydrates- 4.0 kcal/g (16.76 kJ/g) (Sadowska; Rygielska, 2019). During the gestational and lactational periods, the dams body weight and food intake were measured weekly. To improve lactation performance the litters were reduced to eight pups (four males and four females) on postnatal day 1 (PND 1) (Rinaldi et al., 2013; Colombelli et al., 2017).

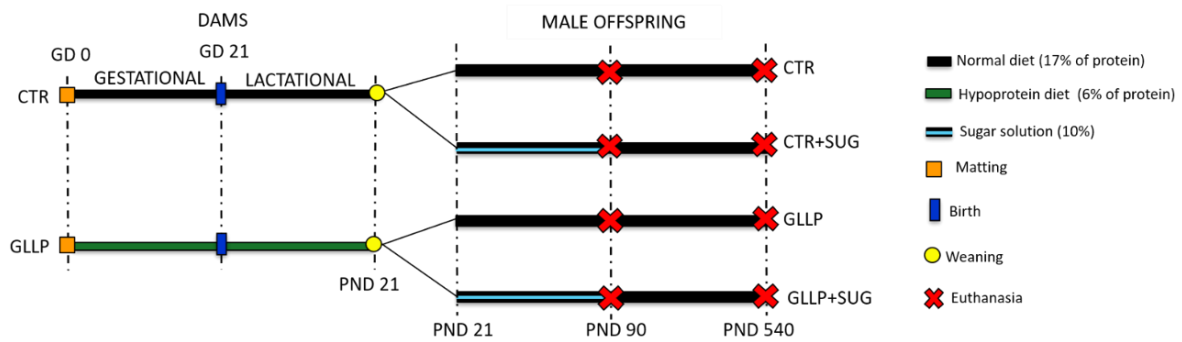


Figure 2. Experimental design. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+Sugar group; GD- Gestational Day 0 and 21; GLLP- Gestational and Lactation Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactation Low Protein+Sugar group; PND (Post natal Day) 21, 90 and 540.

After weaning, on PND 21 the male rats were divided into 4 groups and all animals were fed with normoprotein diet: Control (CTR): rats born from CTR dams were given filtered water; Control+Sugar (CTR+SUG): rats born from CTR dams were given 10% sugar diluted in filtered water; Gestation and Lactation Low Protein diet (GLLP): rats born from GLLP dams were given filtered water and Gestation and Lactation Low Protein diet+Sugar (GLLP+SUG): rats born from GLLP dams were given 10% sugar solution diluted in filtered water. The sugar was consumed from PND 21 until PND 90 (Figure 2). Refined sugar was chosen as the most consumed and easily accessible sugar type for the population. The 10% concentration was opted based on the data published by Kendig et al. (2015). During the sugar consumption the body weight, the sugar and food consumption were measured weekly.

On PND 90 and 540, the animals were weighed, anesthetized (ketamine/xylazine) and euthanatized by decapitation. Blood samples were collected from ruptured cervical vessels for biochemical and hormonal analyses. The ventral prostate (VPs) lobes were collected and processed as described below.

2.2 Biometric and nutritional determinations

On PND 21, the offspring's body weight, food and water intake were measured weekly throughout the experiment period. On PND 90 and 540, the male rats were anesthetized (ketamine/xylazine), weighed and the body length (nose-to-anus) was measured to determine the following biometric parameters:

- Body weight gain= Final weight body (g) – Initial body weight (g)
- Body mass Index (BMI)= body weight (g)/length² (cm²) (Novelli et al., 2007).
- Lee index= cube root of body weight (g)/ nose-to-anus length (cm) (Bernardis, 1970).

Based on food and sugar solution intake during PND 21 until PND 90, the energy intake was calculated using the metabolic energy (mentioned above), from this the following parameters were calculated:

- Energy intake (kJ/day) = mean food consumption (kJ) + mean sugar solution consumption (kJ) x dietary metabolizable energy.

2.3 Blood serum analyses

The blood was collected from male offspring (PND 90 and 540; n=8 per group) centrifuged (2400 g for 20 min), and the serum was stored at -20°C until use. The concentrations of total protein (99-250 Labtest, MG, Brazil), glucose (177013 Laborlab, MG, Brazil), triglycerides (1770290 Laborlab. MG. Brazil) and total cholesterol (Labtest 76, MG- Brazil) were determined by colorimetric methods using manufactures' protocols.

The estrogen (E2) (Monobind® 9140 CA- EUA, sensitivity: 8,2 pg/mL) and total testosterone (Monobind® 8505 CA- EUA, sensitivity: 0,105 ng/mL) serum concentration (n=8 per group) was determined by colorimetric methods using manufactures' protocols.

2.4 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed on PND 90 and 540 as described by Rakvaag et al., (2019). The animals (n= 8 per group) were submitted to 10 hours of fasting and the procedures started at either 8 am. until 10 am. D-(+)-Glucose (2g/kg body weight) diluted in water was administrated by oral gavage (t=0 minutes). Blood samples for glycemic measurements were obtained from the tail. The One-touch glucometer was used to determine glycemic levels at t= 0, 30, 60 and 120 minutes. The alterations of glycemia during the OGTT were evaluated by calculating of the area under the curve (AUC).

2.5 Mass spectrometry

The mass spectrometry protocol was performed according to Cogger et al., (2017). The VP tissue samples were first pulverized using a Covaris cryoPREP Pulverizer and proteins were extracted through the freeze-thaw cycle and sonication process, to ensure lysis of the cell membranes (See suppl. figure 1).

Digestion of proteins for mass spectrometry

After the extraction the VP lobes were re-suspended in 100 µL of 50% trifluoroethanol (TFE) in 100mM ammonium bicarbonate (ABC) solution. Before the protein quantification by Bicinchoninic Acid assay (BCA) (100 µg of protein in each sample) the sonication and freeze-

thaw cycles were repeated to certify the lysis of the cell membranes. Subsequently, the samples were incubated with 8 pmol of invertase protein (SUC2- a yeast glycoprotein, Sigma- Aldrick/ Uniprot accession- P00724), as an internal method control, and the disulfide bonds were denatured by 1 μ L de dithiothreitol 5 mM (DTT), at 56°C for 30 min. The lysates were cooled prior to adding 10 μ L of 25 mM Iodoacetamide (IAA) and incubated in the dark for 30 minutes, to prevent the reformation of disulfide bridges. All samples were diluted 1:5 (v/v) using 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) (pH 8.0) and to proteins were digested to peptides with the addition of 2 μ g of trypsin (trypsin: protein 1:50, Promega) and 1 μ L of 2M Calcium chloride (trypsin cofactor), and incubated at 37°C overnight. After the digestion, the peptides were dried and resuspended in 50 μ L of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water. Peptides of VP were desalted using C18 MacroSpin Columns (Nest Group), eluted in 0.1% TFA in 80% acetonitrile (AcN), and lyophilized using a vacuum concentrator. The samples were diluted in 0.1% formic acid (FA) and standardized to a 0.2 μ g μ L of peptide concentration.

Mass spectrometry, peptide/protein identification and DPIs

A total of 2 μ g of peptides were injected for each sample. The samples were chromatographically separated using reversed- phase chromatography with 4-hour gradient on a 50 cm column (EasySpray 803, Thermo Scientific) with a flow rate of 250 nl/minute using an EasyLC-1000 nano-liquid-chromatography system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). The Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer was used for MS\MS data-dependent acquisition. The acquired raw-files were processed with MaxQuant (version: 1.6.2.3) using a protein-FASTA sequence database containing rat protein sequences from UniProt (Cox; Mann, 2008). At first, were removed of the data the reverse, potential contaminants, and proteins that had to identify just one peptide, a minimum of two peptides required for protein identification, and peptide spectral matches and protein identifications were filtered using a target-decoy approach at a false discovery rate (FDR) of 1%.

The number of total proteins identified were represented by a Heat map, clustered by pearson correlation. Differentially expressed proteins (DEPs) between experimental groups were determined applying the statistical cutoff of Log2 Fold Change $\geq |1| \leq -1$ and the p-value < 0.05 , and the proteins with label-free quantification (LFQ) intensities of value 0 were replaced with 1 to compute the fold-changes. We used one-way analysis of variance (ANOVA) in conjunction with Tukey's HSD (Honest Significant Difference) post hoc test were used to identify differences in protein expression among the groups (CTR x CTR+SUG; CTR x GLLP; CTR x GLLP+SUG; CTR+SUG x GLLP+SUG and GLLP x GLLP+SUG). All different DEPs were showing in Supplementary 1.

Functional enrichment analysis of DEPs

Kobas 3.0 software (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) (Xie et al., 2011) was used to determine the enrichment of ontological terms and molecular pathways related to the identified DEPs on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>), PANTHER (<http://pantherdb.org>), and Reactome (<https://reactome.org/>) databases. The cut-off criterion used for both analyses was p-value adjusted < 0.05 . The enrichment analysis from each group analyzed was showed in Supplementary 2.

Identification commonly terms among groups

Venn diagrams were generated using the VennDIS (Venn diagram interactive software) (Ignatchenko et al., 2015), in the first time were identify commonly enrichment terms between follow groups: CTR vs CTR+SUG groups; CTR vs GLLP groups, and CTR vs GLLP+SUG groups, on both PND 90 and 540. Next, venny diagram represented enrichment terms commonly dysregulated among all groups, on PND 90 and 540 (Supplementary 3 and 4). The Protein-Protein Interaction (PPI) networks functional enrichment analysis was constructed from those protein enriched by functional terms, using STRING database (<https://string-db.org/>). We set the following active interaction sources: text mining, databases, experiments, and co-occurrence. Also, the minimum interaction score was 0.700 (medium confidence), and all disconnected nodes in the network were hidden to facilitate display analysis. The PPI enrichment P-values represented the statistical significance provided by STRING.

Data representation and analyses

Bar plots were constructed using GraphPad Prism® software (version 8.0.1, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). Alluvial diagram connecting the representative target proteins into gene ontology (GO) terms and molecular signaling, was generated using SankeyMATIC online tool (<http://sankeymatic.com/>). The Principal component analysis (PCA), Heat maps and volcano plots were created in environment R with following packages: ‘stats’, ‘ComplexHeatmap’ and ‘ggplot2’.

2.6 Histological procedures, stereological and morphometrical analysis

The VPs samples from PND 90 and 540 animals were fixed by immersion in Methacarn (70% methanol + 20% chloroform + 10% acetic acid) (Puchtler et al., 1970) for 4 hours, dehydrated in series of graded ethanol, diaphanized in xylene and embedded in Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO). The histological slides were done with 5 μ m thickness sections

and stained with hematoxylin-eosin (HE) for morphological and stereological analysis. The slides were analyzed using a Leica DMLB 80 microscope and the relative proportions of the VP components (epithelium, lumen, and stroma) were performed according to Colombelli, et al. (2017) and Rinaldi et al. (2013). The results were expressed as a percentage of each component and a proportion of the total area analyzed. Additionally, to investigate the inflammatory profile, it was performed the mast cells quantification (n= 6 per group) by toluidine blue histochemical staining (Ribatti, 2018).

2.7 Immunohistochemistry (IH)

Silanized slides with VP histological sections (n= /group) were deparaffinized and hydrated, afterward was realized the antigen retrieval in a pressure cooker in 10 mM sodium citrate solution pH 6.0 for 30 minutes. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), the endogen peroxidase activity was blocked by 3% hydrogen peroxide in methanol solution for 10 minutes, and the slides were immersed to in 3% nonfat milk in PBS to block unspecific protein-protein interactions for 1 hour at room temperature. The VP sections from different groups were incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies (see Supplementary Material- Table S2 for antibody specifications and dilutions), than the slides were washed in PBS and incubated for 1 hour at room temperature with HRP-conjugated secondary antibody (see Supplementary Material- Table S2 for antibody specifications and dilutions). The slides were washed in PBS and the reactions were developed -using 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma) and counterstained with hematoxylin. The analyses of the immunostaining were performed using a Leica DMLB 80 microscope. The cell proliferation index was expressed as percentages of positive cells from the total cells, counted in five histological sections of six VP lobes per group at 400x (Colombelli et al., 2017).

2.8 Western Blotting

The proteins expressions analyses were evaluated by Western blotting according to Colombelli et al., (2017). Frozen samples of VP lobes (n= 6) from all experimental groups on PND 90 and PND 540 were mechanically homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) plus 0.25% Triton-X 100 and protease inhibitor (Sigma) using a Polytron for 30 s at 4 °C followed by centrifugation, and protein was extracted from the supernatant and quantified using the Bradford method (Bradford, 1976). Protein samples (70 µg) were loaded into 8% SDS-PAGE under reducing conditions. After, proteins were transblotted onto a nitrocellulose

membrane (Millipore), blocked in 5% non-fat milk and incubated in primary antibodies overnight (see Suppl. table 2 for antibody specifications and dilutions). After 3 washes with TBS-T, the membranes were incubated with specific HRP-conjugated secondary antibody antibodies for 2 hours at room temperature. The reactions were developed using ECL reagent (Amersham, UK), and the signals were captured using a CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®; GE Healthcare). The quantification was performed by Integrated optical densities (IODs) of the targeted protein bands using Image Software (National Institutes of Health). The protein levels expressions were normalized by β -actin, and the results were expressed in fold change as the mean $\pm$ SD.

2.9 Statistical Analysis

For continuous variables collected from the biometric parameters of the animals in the PND 90, descriptive statistics were calculated (mean, median, standard deviation, minimum and maximum) for each experimental group (CTR, CTR+SUG, GLLP and GLLP+SUG). As statistical analysis, generalized linear models (GLM) were adjusted, using the Gamma distribution, which has greater adjustment flexibility for data with asymmetric sample distribution. Differences among groups were tested by means of multiple comparisons using the Tukey-Kramer test with significance when p -value < 0.05 . Statistical analyses were performed using SAS statistical software (version 9.3, Statistical Analysis Systems, SAS Institute, Inc. Cary, NC) and, to adjust the models, the GENMOD procedure was used, which analyzed the continuous variables by means of GLM adjust, considering the gamma distribution (Madsen, 2011).

Statistical analyses of other parameters were performed using GraphPad Prism® software (version 8.0.1, Graph Pad, Inc., San Diego, CA). The Shapiro-Wilk normality test was realized in all data. The parametric data were submitted to one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test, and no-parametric data were evaluated by analysis of Kruskal- Wallis followed by Dunns. The parametric data were expressed as mean $\pm$ SD and, no-parametric data were demonstrated as median $\pm$ SEM. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Maternal LPD alters the biometric parameters in dams and offspring

All the pregnant rats started with similar body weight in the gestational and lactational periods, but at the end of the lactation period the GLLP dams presented low body weight, this result -was associated with lower diet consumption that reflects in the decrease of Lee Index and BMI (Suppl. Table 3). Interestingly, the GLLP dams had a decrease of diet consumption, they showed a significant increase in visceral, perituterinic, retroperitoneal, and total fat relative weight (Suppl. Table 3 and 4). Serum levels of total cholesterol and estrogen were lower in dams submitted to LPD (Suppl. Table 4). Despite the LPD effects visualized in biometric data of dams, did not change the offspring or male/female ratio (data not shown), however, at birth (PND 0) and in the weaning (PND 21) the male offspring from GLLP dams had a significant decrease of body weight and AGD compared to CTR group (Suppl. Table 5).

3.2 Post-natal growth profile and food and water intake of the male offspring

The CTR+SUG body weight when compared to the CTR group did not change until PND 90, while both LPD groups (GLLP and GLLP+SUG) showed lower body weight in relation to the CTR group since the beginning of the experiment until PND 90. The GLLP+SUG animals had a decrease in body weight when compared to the GLLP group after PND 45. On PND 90 the GLLP+SUG animals had the lower body weight when compared to all the experimental groups (CTR, CTR+SUG, and GLLP) (Figure 3- A, Table 1).

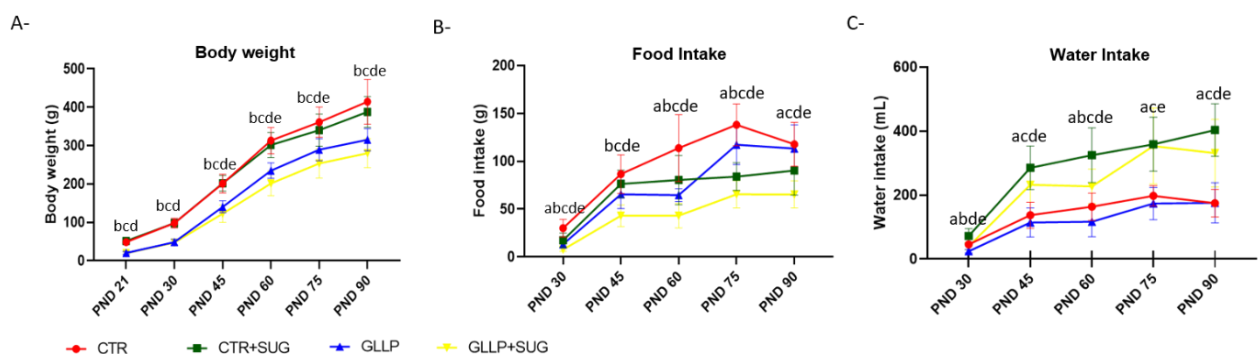


Figure 3. The body weight, food and water intake from different experimental groups evaluated since postnatal day 21 until 90. A-Mean of body weight. B- Food intake. C- Water intake. Different letters represent statistical difference when $p < 0.05$. a- Statistically difference between CTR+SUG vs CTR group; b- Statistically difference between GLLP vs CTR group; c- Statistically difference between GLLP+SUG vs CTR group; d- Statistically difference between CTR+SUG vs GLLP+SUG group; e- Statistically difference between GLLP vs GLLP+SUG group. CTR- control group (Red); CTR+SUG- Control+Sug (green); GLLP- Gestational and Lactational Low Protein (blue); GLLP+SUG - Gestational and Lactational Low Protein+ Sug (yellow); Postnatal day (PND).

The diet consumption was similar in the CTR+SUG group in relation to the CTR group until PND 45, after PND 60 the CTR+SUG animals showed lower diet consumption than the CTR group. The GLLP group showed a decrease in diet intake when compared to the CTR group since on PND 30, but at the end of the experiment (on PND 90) did not have a significant difference. While the diet intake in the GLLP+SUG group was lower when compared among experimental groups (CTR, CTR+SUG, and GLLP) until PND 90 (Figure 3- B, Table 1).

The GLLP and CTR group had a similar water intake, we observed the difference just on PND 30 and PND 60. Both groups that consumed sugar (CTR+SUG and GLLP+SUG) showed increased of water intake after PND 45 when compared to the CTR and GLLP group, respectively (Figure 3- C, Table 1).

The energy intake was similar between CTR+SUG and CTR groups. Both LPD groups (GLLP and GLLP+SUG) had a significant decrease when compared to the CTR group, additionally, the GLLP+SUG group was lower than the CTR+SUG group (Table 1).

Table 1. - Anthropometrical parameters of animals from different experimental groups on postnatal day 90.

Parameters	PND 90			
	CTR	CTR+SUG	GLLP	GLLP+SUG
Initial body weight PND 21 (g) ¹	49.50 ± 1.42	52.05 ± 1.26	19.35 ± 0.66 *	18.90 ± 0.59 *#
Final body weight PND 90 (g)	420.20 ± 11.32	402.80 ± 10.31	327.20 ± 7.91 *	294.40 ± 8.98 *#
Body weight gain (g)	359.50 ± 41.81	335.60 ± 36.10	292.80 ± 29.18 *	262.50 ± 36.15 *#+
Food consumption (g/day) ¹	6.25 ± 0.24	5.00 ± 0.18 *	5.55 ± 0.17 *	3.21 ± 0.07 *#+
Water Consumption (ml/day) ¹	10.40 ± 0.25	23.39 ± 0.56 *	8.84 ± 0.33	18.49 ± 0.69 *+
Energy Intake (kJ/day) ¹	103.50 ± 4.04	116.70 ± 3.15	91.86 ± 2.87 *	78.33 ± 2.36 *#

Data are expressed as median ± SD. ¹Data are expressed as median ± SEM. Different symbols represent statistical difference between groups when p<0.05. *Statistically difference among different experimental groups (CTR+SUG, GLLP, GLLP+SUG) in relation to CTR group. # Statistically difference between CTR+SUG and GLLP+SUG. +Statistically difference between GLLP and GLLP+SUG. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+ sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein+sugar group. PND- Post Natal Day.

3.3 The maternal low protein diet and sugar consumption alters the response in the glucose metabolism.

In the oral glucose tolerance test (OGTT) the CTR+SUG animals showed a different glycemic profile in relation to other groups (Figure 4- A). The blood glucose of the CTR+SUG group was increased in 120 minutes, and at the area under curve (AUC) the CTR+SUG had a significant increase when compared to the CTR group, which characterizes a glucose

intolerance (Figure 4- A and B). The glycemic profile did not have significant alterations on PND 540, which demonstrate the animals recover after PND 90 until 540 (Figure 4- C and D).

Although the animals were submitted to LPD diet during the gestational and lactational period and the sugar consumption during the post-natal life, this is not enough to result in some alteration in serum biochemical analyses. The triglycerides, total proteins, glucose and total cholesterol on PND 90 and 540 did not change among the experimental groups (Suppl. Figure 2).

3.4 Biometric parameters response to maternal LPD and post natal sugar consumption.

The GLLP and GLLP+SUG groups demonstrated a significant decrease of body weight on PND 90 when compared to the CTR group. The CTR+SUG group showed an increase of body weight compared to the GLLP+SUG group, this alteration remained until PND 540. The BMI was decreased in GLLP+SUG on PND 90 when compared to the CTR, CTR+SUG and GLLP groups, while the Lee Index was increase in CTR+SUG group related to CTR and GLLP+SUG groups. The same parameters did not change among the experimental groups on PND 540 (Table 2). On PND 90, the visceral, epididymis, retroperitoneal, and total fats weight decreased in the GLLP group when compared to the CTR group and in the GLLP+SUG group in relation to the CTR+SUG group. While the GLLP+SUG group showed a significant decrease in epididymis, retroperitoneal and total fats weight in relation to the CTR group. In aging, the following significant differences remained: decrease of the epididymis and retroperitoneal fats weight in GLLP+SUG vs CTR and GLLP+SUG vs CTR+SUG (Table 2).

The anogenital distance (AGD) was decrease in GLLP+SUG group when compared to the CTR and CTR+SUG groups. While, the GLLP+SUG animals did not recover on PND 540, since this group continued to show a decrease related to the CTR+SUG group. The absolute VP weight did not change in both ages, but in relative VP weight on PND 540 the LPD groups (GLLP and GLLP+SUG) showed an increase when compared to the CTR group and, the GLLP+SUG was higher than the CTR+SUG group. The hormone profile, the serum levels testosterone did not change on PND 90 and 540. The serum estrogen levels showed a decrease in the GLLP+SUG group on PND 90 when compared to the CTR group, and the aging the animals was completely recovered (Table 3).

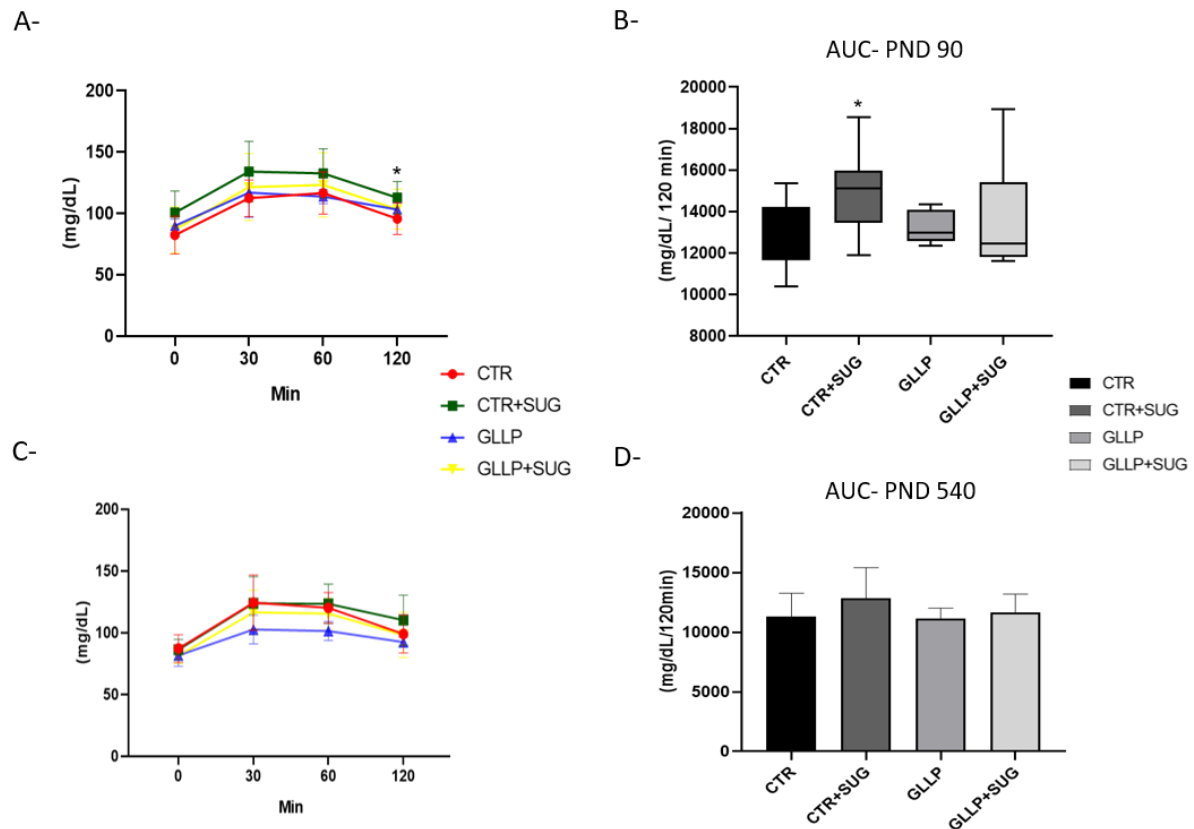


Figure 4. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) from different experimental groups. A- The glycemia from different experimental groups on postnatal day (PND) 90. B- The area under curve (AUC) on postnatal day (PND) 90. *Statistically difference between CTR+SUG in relation to CTR group ($p < 0.05$). C- The glycemia from different experimental groups on PND 540. D- The AUC from animals on PND 540. Area Under Curve; CTR- control group (Red); CTR+SUG- Control+Sug (green); GLLP- Gestational and Lactational Low Protein (blue); GLLP+SUG - Gestational and Lactational Low Protein+ Sug (yellow); OGTT- Oral Glucose Tolerance Test; PND- Postnatal day.

3.5 Maternal LPD and sugar consumption alters ventral prostate proteomic profile in adult and aging animals.

On PND 90, the PCA showed a similar distribution of samples among experimental groups (Suppl. Figure 3- A). The MS/MS analysis approach in VP samples identified 5.234 proteins, that had a similar profile among experimental groups (CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG) (Suppl. Figure 3- B and C). In order to investigate the effects of maternal LPD associated with postnatal sugar consumption, we use the following combinations: CTR vs CTR+SUG; CTR vs GLLP, and CTR vs GLLP+SUG. The volcano plot showing the distribution of DEP into combination groups (Figure 5- A, B, and C). The CTR vs CTR+SUG combination detected 35 DEPs: 19 upregulated proteins and 16 downregulated proteins. The CTR vs GLLP combination had 56 proteins DEPs: 19 upregulated proteins and 37 downregulated proteins. The CTR vs GLLP+SUG combination had 102 DEPs: 53 upregulated proteins and 49 downregulated proteins.

The proteomic profile on PND 540 samples showed a PCA distinct among CTR, CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG groups, especially GLLP+SUG group when compared with other groups, in this age was identified 5027 total proteins (Suppl. Figure 4- A, B and C). The volcano plot represented the distribution of DEP into combination groups (Figure 5- D, E, and F). The CTR vs CTR+SUG combination detected 47 DEPs: 25 upregulated proteins and 22 downregulated proteins. The CTR vs GLLP combination had 68 DEPs: 16 upregulated proteins and 52 downregulated proteins. The CTR vs GLLP+SUG combination showed 695 DEPs: 212 upregulated and 483 downregulated. DEP's dataset was available in Supplementary 1.

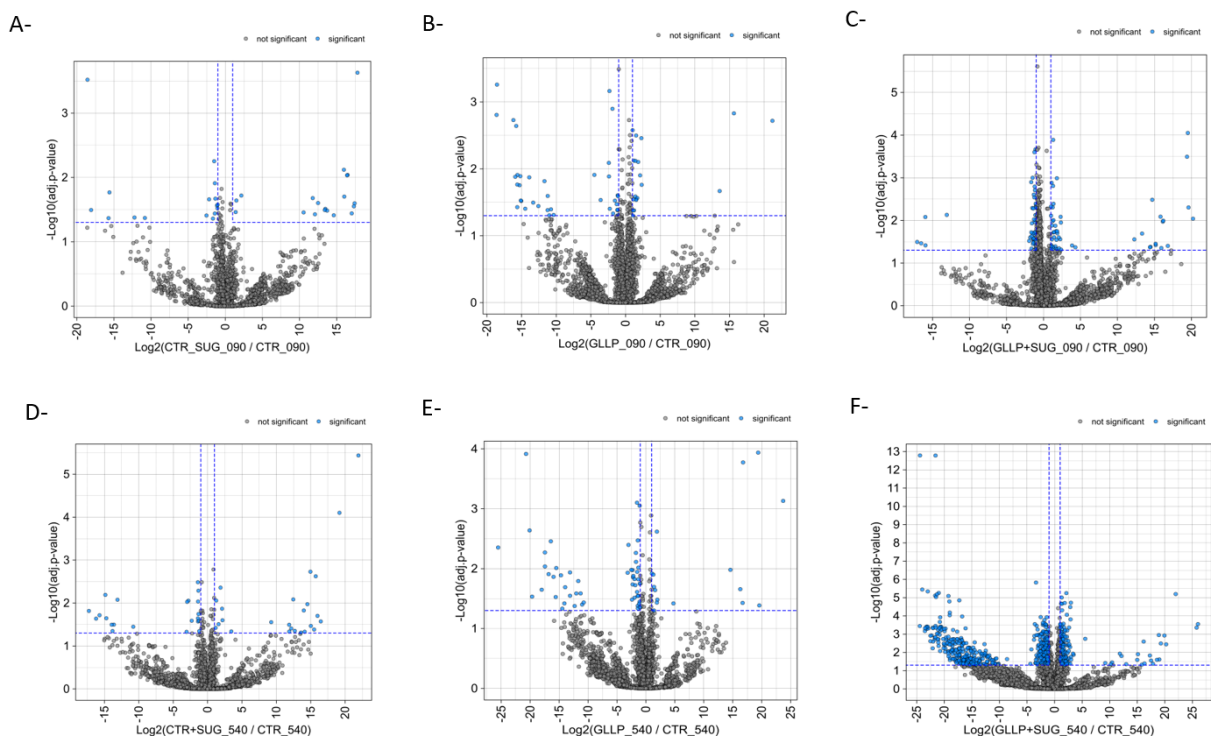


Figure 5. The Volcano plots illustrate the upregulated proteins and downregulated proteins differentially expressed (Blue points) in each comparisons on postnatal day (PND) 90 (A- C) and 540 (D- F). A- Control vs Control+ Sugar on PND 90; B- Gestational and Lactational Low Protein (GLLP) vs Control group on PND 90; C- GLLP + Sugar vs Control group on PND 90; D- Control + Sugar vs CTR group on PND 540; E- GLLP vs CTR group on PND 540; F- GLLP+SUG vs CTR on PND 540.

Table 2. Biometrical parameters of animals from different experimental groups on postnatal day 90 and 540.

Parameters	PND 90				PND 540			
	CTR	CTR+SUG	GLLP	GLLP+SUG	CTR	CTR+SUG	GLLP	GLLP+SUG
Body weight (g)	420.20 ± 11.32	402.80 ± 10.31	327.20 ± 7.91 [*]	294.40 ± 8.98 ^{*#}	537.85 ± 126.49	653.00 ± 62.20	513.32 ± 61.26	478.94 ± 53.83 [#]
BMI (g/cm ²)	0.71 ± 0.07	0.79 ± 0.08	0.67 ± 0.06	0.61 ± 0.06 ^{*#+}	0.82 ± 0.20	0.94 ± 0.07	0.82 ± 0.08	0.84 ± 0.08
Lee Index	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.01 [*]	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.01 [#]	3.26 ± 0.22	3.30 ± 0.12	3.20 ± 0.12	3.27 ± 0.13
Visceral Fat (g)	6.55 ± 0.94	7.23 ± 1.86	4.32 ± 1.41 [*]	5.30 ± 1.75 [#]	15.52 ± 8.23	13.95 ± 3.75	11.63 ± 3.51	10.12 ± 3.14 [*]
Relative Visceral Fat Weight ¹	1.60 ± 0.20	1.81 ± 0.38	1.31 ± 0.40	1.75 ± 0.49 ⁺	2.35 ± 1.25	2.12 ± 0.48	2.33 ± 0.62	2.05 ± 0.49
Epididymis Fat Weight (g)	6.92 ± 1.61	7.98 ± 2.47	4.24 ± 1.48 [*]	4.94 ± 1.78 ^{*#}	16.87 ± 3.67	19.53 ± 6.12	12.33 ± 3.16 [*]	11.53 ± 2.60 ^{*#}
Relative Epididymis Fat Weight ¹	1.68 ± 0.32	1.99 ± 0.45	1.30 ± 0.44	1.63 ± 0.52	2.61 ± 0.55	2.97 ± 0.75	2.42 ± 0.48	2.36 ± 0.43 [#]
Retroperitoneal Fat (g)	8.37 ± 2.57	9.52 ± 2.79	3.85 ± 1.91 [*]	5.64 ± 2.55 ^{*#+}	18.69 ± 4.67	23.04 ± 6.73	10.61 ± 3.29 [*]	11.41 ± 4.20 ^{*#}
Relative Retroperitoneal Fat Weight ¹	2.03 ± 0.58	2.41 ± 0.51	1.14 ± 0.50 [*]	1.84 ± 0.75 ⁺	2.78 ± 0.57	3.49 ± 0.81	2.10 ± 0.57 [*]	2.21 ± 0.59 [#]
Total fat (g)	21.85 ± 4.87	24.74 ± 6.61	12.19 ± 4.31 [*]	15.88 ± 5.89 ^{*#}	51.08 ± 14.47	54.75 ± 15.30	34.59 ± 8.43	33.07 ± 8.96
Relative Total Fat Weight ¹	5.33 ± 1.02	6.22 ± 1.17	3.67 ± 1.13 [*]	5.24 ± 1.68 ⁺	9.59 ± 3.68	8.31 ± 1.84	6.88 ± 1.31	6.63 ± 1.24

Data are expressed as mean ± SD.¹ Data multiplied by 100. Different symbols represent statistical difference between groups when p<0.05. *Statistically difference among different experimental groups (CTR+SUG, GLLP, GLLP+SUG) in relation to CTR group. # Statistically difference between CTR+SUG and GLLP+SUG. +Statistically difference between GLLP and GLLP+SUG. BMI- Body Mass Index; CTR- Control group; CTR+SUG- Control+ sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein+sugar group. PND- Post Natal Day.

Table 3. Reproductive parameters of animals from different experimental groups on postnatal day 90 and 540.

Parameters	PND 90				PND 540			
	CTR	CTR+SUG	GLLP	GLLP+SUG	CTR	CTR+SUG	GLLP	GLLP+SUG
Ano Genital Distance (AGD) (mm)	31.14 ± 6.19	30.44 ± 7.62	28.97 ± 6.49	25.05 ± 3.42 ^{*#}	32.52 ± 3.72	34.80 ± 3.32	29.21 ± 3.54	29.84 ± 3.96 [#]
VP Absolute weight (g)	0.39 ± 0.12	0.38 ± 0.12	0.33 ± 0.08	0.33 ± 0.05	0.538 ± 0.168	0.485 ± 0.113	0.637 ± 0.153	0.600 ± 0.144
Relative VP weight ²	0.97 ± 0.30	0.91 ± 0.28	1.00 ± 0.20	1.15 ± 0.23	0.084 ± 0.014	0.074 ± 0.021	0.124 ± 0.035 [*]	0.127 ± 0.032 ^{*#}
Testosterone (ng/mL) ¹	0.62 ± 1.30	0.10 ± 0.15	0.51 ± 0.25	0.08 ± 0.23	0.19 ± 0.10	0.15 ± 0.11	0.068 ± 0.02	0.063 ± 0.02
Estrogen (pg/mL) ¹	17.44 ± 6.62	0.57 ± 1.36	0.02 ± 6.70	0.02 ± 0.0003 [*]	8.45 ± 3.74	7.32 ± 5.79	1.57 ± 6.30	0.02 ± 0.43

¹Data are expressed as median ± SEM. ²Data multiplied by 100. Different symbols represent statistical difference between groups when p<0.05. *Statistically difference among different experimental groups (CTR+SUG, GLLP, GLLP+SUG) in relation to CTR group. # Statistically difference between CTR+SUG and GLLP+SUG. Ano Genital Distance (AGD); CTR- Control group; CTR+SUG- Control+ sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein+sugar group. PND- Post Natal Day; VP- Ventral prostate.

3.6 Protein set enrichment analysis of adult animals (PND 90) that were exposed to a maternal low protein diet and postnatal sugar consumption.

3.6.1 The postnatal sugar consumption enriched pathways in CTR+SUG related to sugar metabolism.

On PND 90 the upregulated DEPs altered by postnatal sugar consumption enriched important pathways related with: metabolism of proteins, synthesis, secretion, and diacylation of ghrelin, SHC- related events triggered by IGF1R, regulation of autophagy, insulin receptor signaling pathway, negative regulation of insulin receptor, histone methylation, NADH metabolic process, histone ubiquitination, negative regulation of extrinsic apoptotic and positive regulation of insulin-like growth factor receptor (Figure 6- A). Downregulated proteins enriched terms related to sphingolipid metabolism, Rab regulation of trafficking, Rab guanyl-nucleotide exchange factor activity, positive regulation of glycolytic process, histone deubiquitination, chaperone-mediated protein transport, histone exchange and histone binding (Figure 6- C). The set of DEPs (up and downregulated) associated with each enrichment term was illustrated in the alluvial diagram (Figure 6- B and D). The enrichment terms by upregulated proteins and downregulated proteins were showed in Supplementary 2.

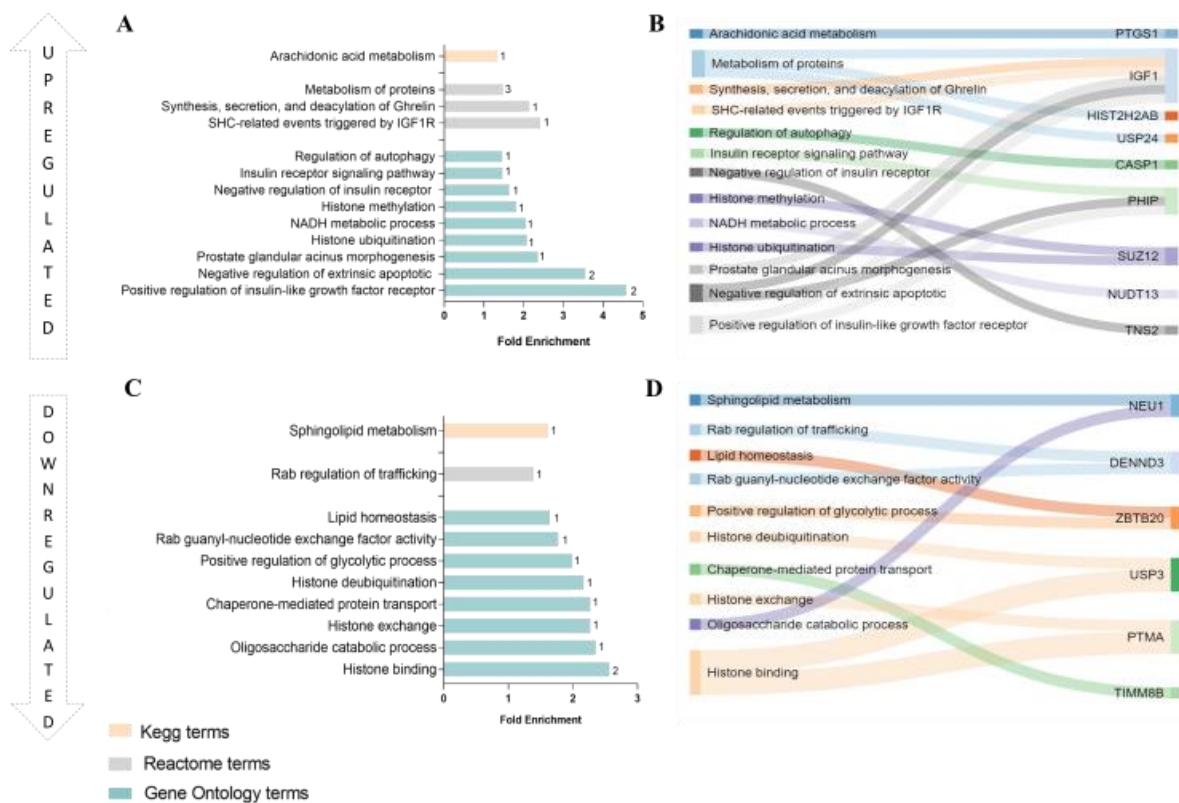


Figure 6. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs CTR+SUG group on postnatal day 90. Bars graph demonstrated KEGG, Reactome and Gene Ontology deregulated terms in upregulated proteins (A) and downregulated proteins (C). Number of proteins/terms in front of bars Alluvial plot was generated using SankeyMATIC online tool (<http://sankeymatic.com/>), connected interaction protein – terms for upregulated (B) and downregulated (D). Significant when p -value ≤ 0.05 .

3.6.2 The maternal LPD enriched in GLLP group proliferation and histone pathways.

In GLLP group the upregulated DEPs enriched the pathways: hedgehog signaling pathway, Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and MAP2K and activation, deubiquitination, negative regulation of epithelial cell proliferation, positive regulation of histone acetylation, histone methyltransferase activity (H3-K27 specific) and positive regulation of histone H4 acetylation (Figure 7- A). Enriched terms by downregulated DEPs were insulin processing, mitochondrial translation, tissue homeostasis, cholesterol efflux, histone deubiquitination, positive regulation of vasculogenesis, positive regulation of growth, histone binding and high-density lipoprotein particle assembly (Figure 7- C). The alluvial diagram showed the upregulated proteins and downregulated proteins and each enrichment terms (Figure 7- B and D).

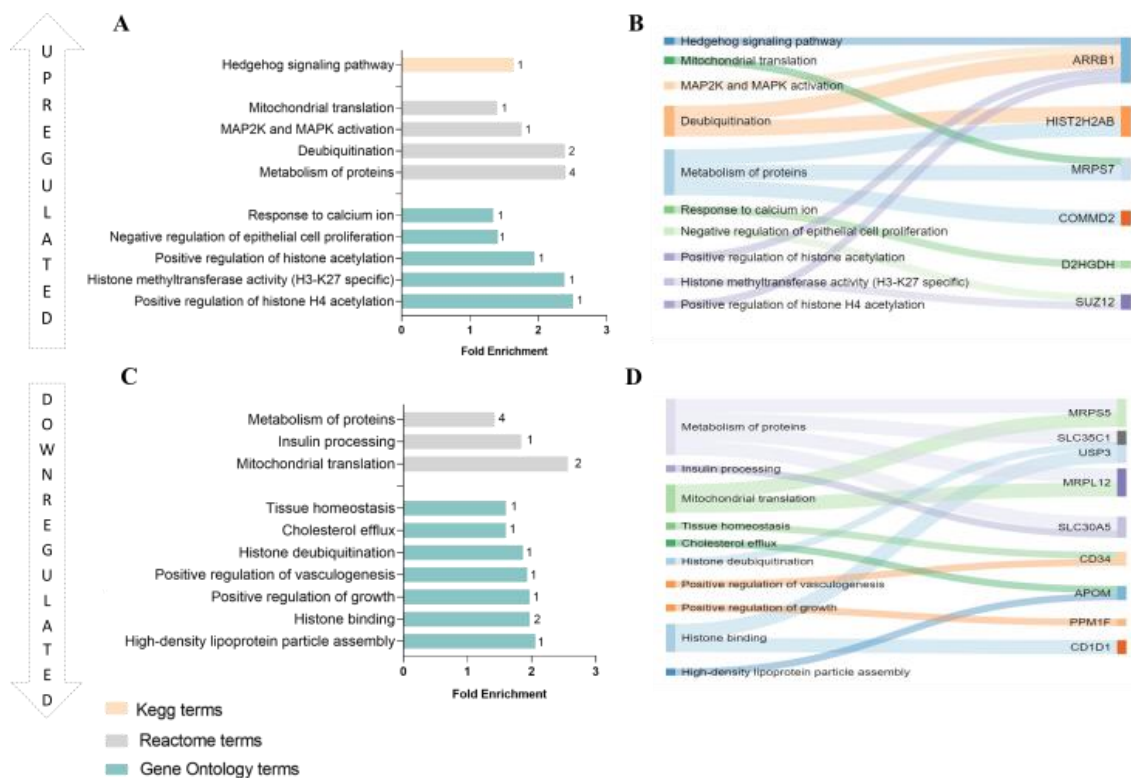


Figure 7. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein group on postnatal day 90. Bars graph demonstrated KEGG, Reactome and Gene Ontology deregulated terms in upregulated proteins (A) and downregulated proteins (C). Number of proteins/terms in front of bars Alluvial plot was generated using SankeyMATIC online tool (<http://sankeymatic.com/>), connected interaction protein – terms for upregulated (B) and downregulated (D). Significant when p -value ≤ 0.05 .

3.6.3 Maternal LPD associated with postnatal sugar consumption altered autophagy and histones terms.

The enriched terms by upregulated DEPs in GLLP+SUG group were arachidonic acid metabolism, microautophagy, positive regulation of macroautophagy, response to nutrient levels, 1-phosphatidylinositol binding, histone K3K27 methylation, histone methyltransferase activity (H3-K27 specific) and phosphatidylinositol-4,5-biphosphate binding (Figure 8- A). While the process enriched by downregulated DEPs were acyl chain remodeling of PE, phosphatidylinositol-4-phosphate binding, positive regulation of macroautophagy, histone H3-K4 trimethylation, positive regulation of autophagosome assembly and gland morphogenesis (Figure 8- C). The proteins that enriched each term were showed in the alluvial diagram (Figure 8- B and D).

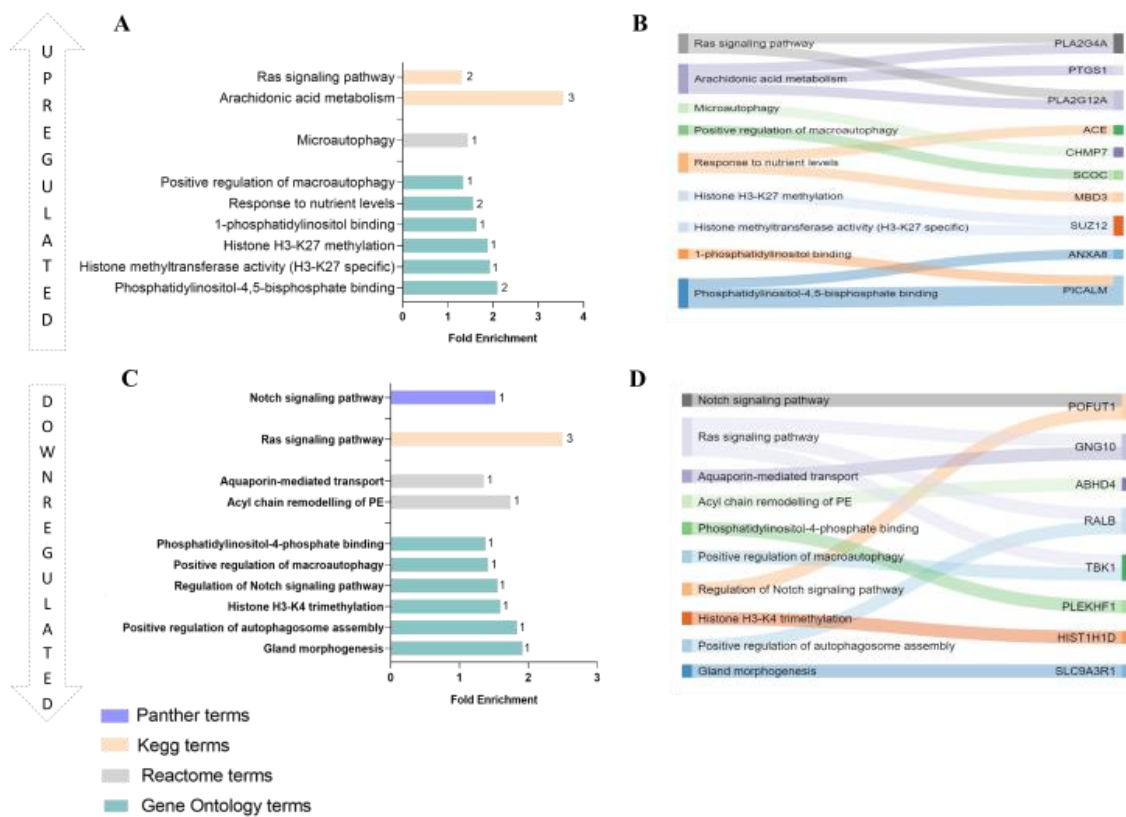


Figure 8. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein+Sugar group on postnatal day 90. Bars graph demonstrated Panther, KEGG, Reactome and Gene Ontology deregulated terms in upregulated proteins (A) and downregulated proteins (C). Number of proteins/terms in front of bars; Alluvial plot was generated using SankeyMATIC online tool (<http://sankeymatic.com/>), connected interaction protein – terms for upregulated (B) and downregulated (D). Significant when p -value ≤ 0.05 .

3.7 Enrichment analysis in aging animals on PND 540 that were exposed to a maternal low protein diet and postnatal sugar consumption.

3.7.1 The CTR+SUG group enriched terms related to metabolism pathways, autophagy, cell cycle and growth.

In aging animals (PND 540), the upregulated DEPs enrichment terms were related to ferroptosis, autophagy, AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway, regulation of TP53 expression and degradation, transcriptional regulation by TP53, mTOR signaling, and positive regulation of glucose metabolic process (Figure 9- A). Downregulated DEPs enrichment terms were related to glycolysis/gluconeogenesis, fat digestion and absorption, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, dopamine neurotransmitter release cycle, serotonin neurotransmitter release cycle, cholesterol metabolic process, and insulin growth factor binding (Figure 9- C). The DEPs associated with each enriched term was illustrated in alluvial diagram (Figure 9- B and D).

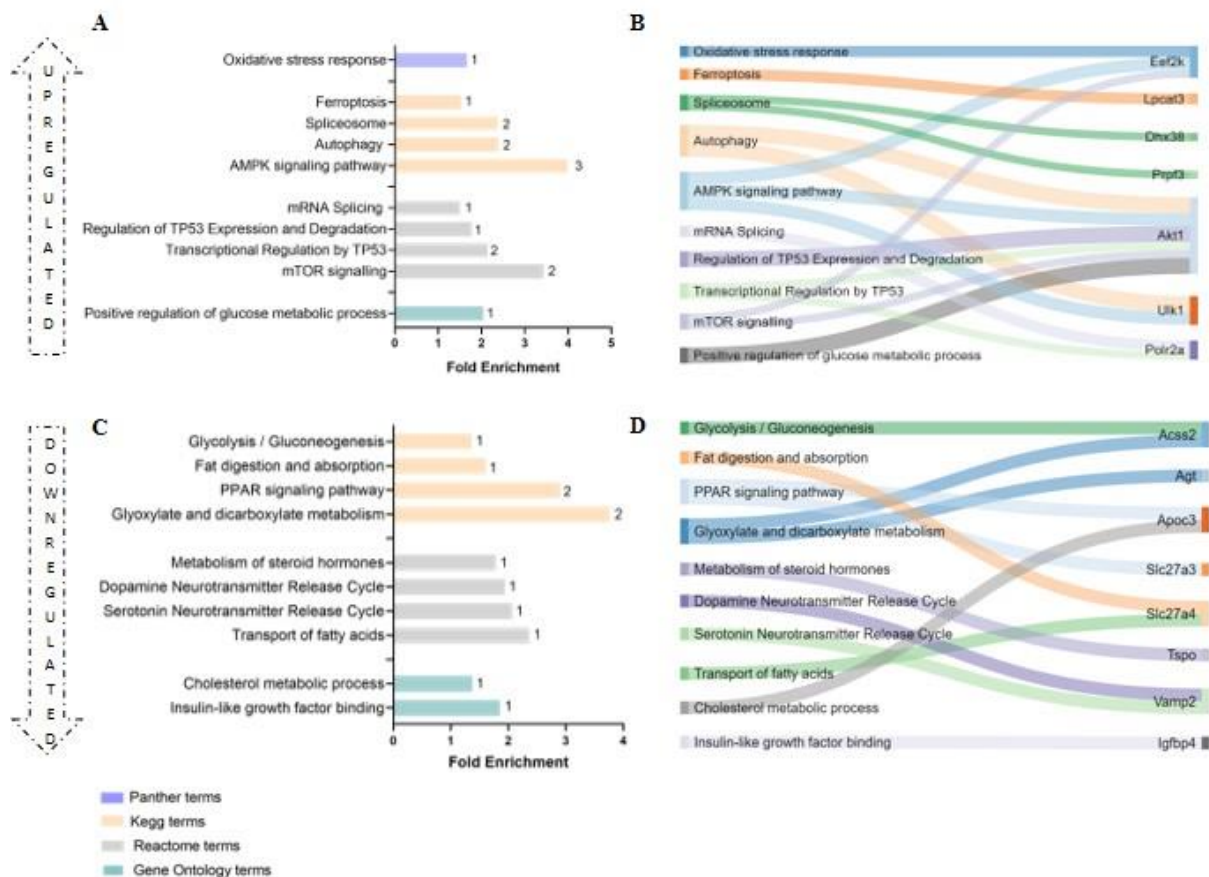


Figure 9. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Control+Sugar group on postnatal day 540. Bars graph demonstrated Panther, KEGG, Reactome and Gene Ontology deregulated terms in upregulated proteins (A) and downregulated (C). Number of proteins/terms in front of bars; Alluvial plot was generated using SankeyMATIC online tool (<http://sankeymatic.com/>), connected interaction protein – terms for upregulated (B) and downregulated (D). Significant when p- value ≤ 0.05 .

3.7.2 Pathways related to growth, cell cycle and cytochrome were altered in GLLP animals on PND 540.

On PND 540, the upregulated DEPs were related to the steroid biosynthetic process, metabolism of lipids, mTOR signaling, regulation of TP53 activity through acetylation, prostate cancer, PPAR signaling pathway, and p53 pathway by glucose deprivation (Figure 10- A). The terms enrichment by downregulated DEPs were estrogen signaling pathway, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, drug metabolism- cytochrome P450, glycolysis/gluconeogenesis, gluconeogenesis, fructose metabolic process, calcium-dependent ATPase activity, calcium-dependent protein binding (Figure 10- C). The upregulated proteins and downregulated proteins that enriched the highlighted terms were illustrated in the alluvial diagram (Figure 10- B and D).

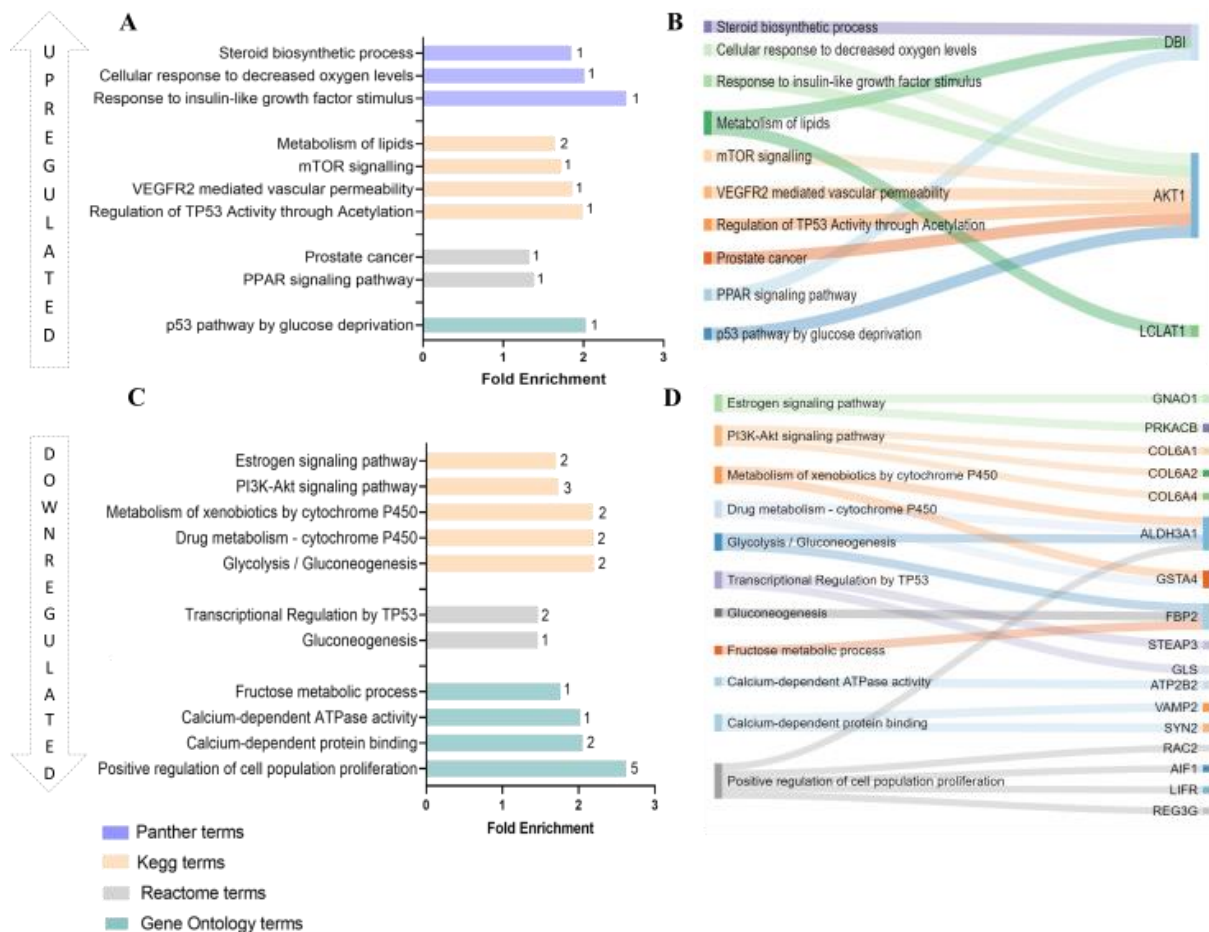


Figure 10. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein group on postnatal day 540. Bars graph demonstrated the Panther, KEGG, Reactome and Gene Ontology deregulated terms in upregulated proteins (A) and downregulated proteins (C). Number of proteins/terms in front of bars; Alluvial plot was generated using SankeyMATIC online tool (<http://sankeymatic.com/>), connected interaction protein terms for upregulated (B) and downregulated (D). Significant when p -value ≤ 0.05 .

3.7.3 Glucose metabolism and Autophagy regulation mechanisms were enriched in the GLLP+SUG group in aging.

The upregulated DEPs altered by the GLLP+SUG group enrichment the following terms: prostate cancer, estrogen signaling pathway, autophagy, metabolism of lipids, metabolism of RNA, glucose metabolic process, histone H3-K27 trimethylation, phosphatidylinositol-3,5-biphosphate 3-phosphatase activity (Figure 11- A). The downregulated DEPs enrichment important terms related to the amino sugar and nucleotide sugar metabolism, negative regulation of autophagy, autophagy, phosphatidylinositol-3-phosphate binding (Figure 11- C). The alluvial diagram shows the enriched terms by upregulated and downregulated proteins (Figure 11- B and D).

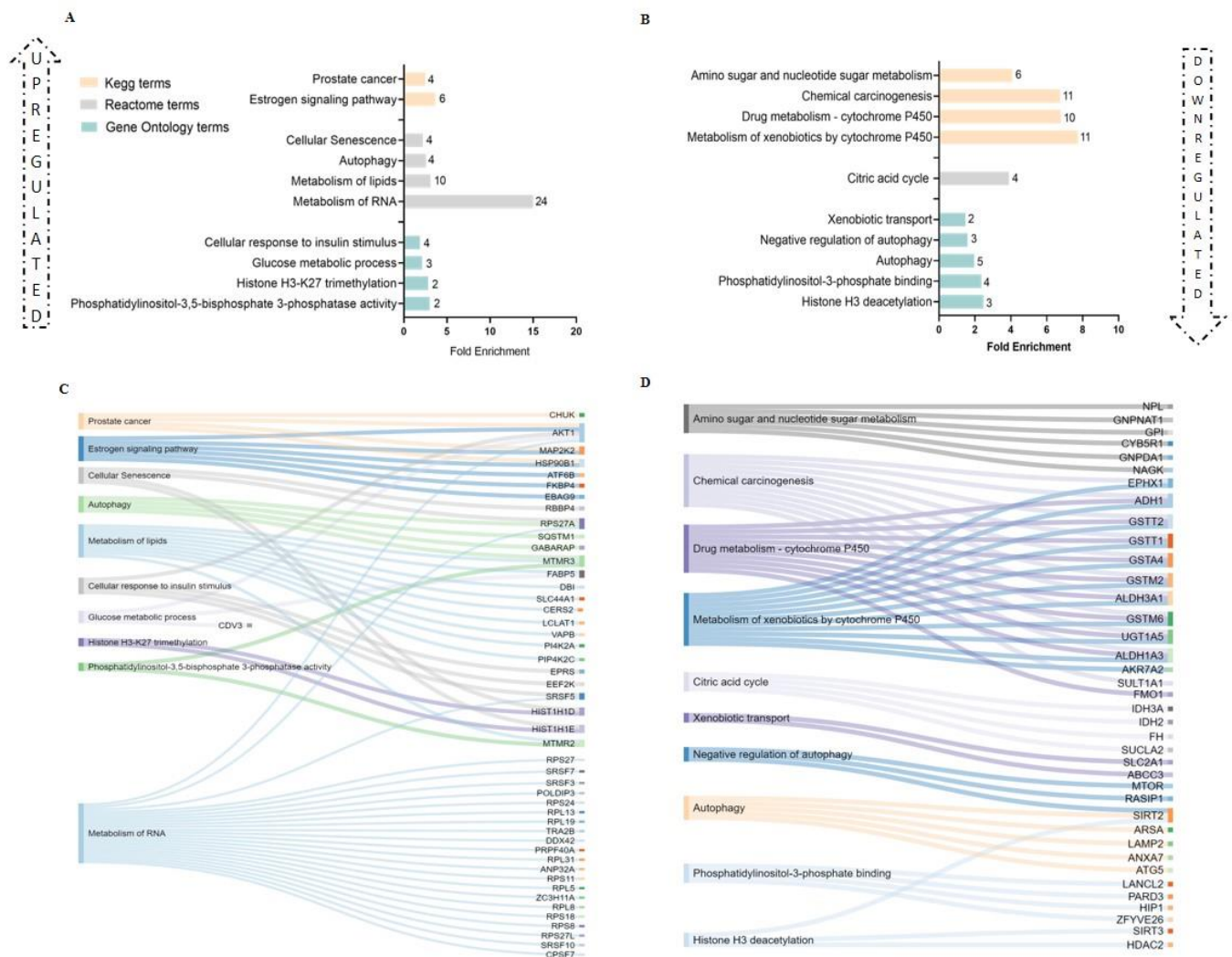


Figure 11. Ontology terms and molecular pathways enriched by differentially expressed proteins in the ventral prostate of Control vs Gestational and Lactation Low Protein+Sugar group on postnatal day 540. The bars graph represented the GO, KEGG, Reactome and gene ontology deregulated terms by upregulated proteins (A) and downregulated proteins (B) Number of proteins/terms in front of bars; Alluvial plot was generated using SankeyMATIC online tool (<http://sankeymatic.com/>), connected interaction protein terms for upregulated (C) and downregulated (D). Significant when p -value ≤ 0.05 .

3.8 Commonly enriched terms in all experimental groups on PND 90 and 540

3.8.1 The histones pathways were altered in all experimental groups in the adult animals

Through venny analysis were identified 16 terms commonly enriched in CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG groups (Figure 12-A). The differential of expression of commonly enriched terms among experimental groups was illustrated by a heat map, connected to the alluvial diagram with the respective proteins that acting in these terms. Most of the DEPs identified were modulated by histone pathways: histone methyltransferase activity, histone methylation, histone ubiquitination, histone H3-K27 trimethylation, histone methyltransferase activity (H3-K27 specific), histone deubiquitination, and histone H3-K27 methylation (Figure 12- B). The commonly enriched terms by upregulated proteins and down-regulated proteins in all experimental groups were showed in Supplementary 3.

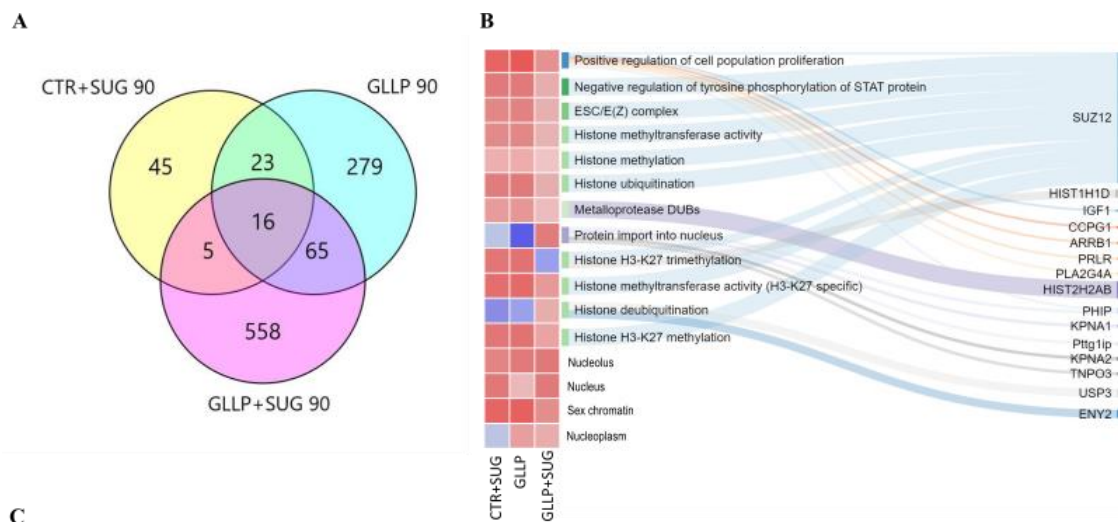


Figure 12. Venn diagram and heatmap representing the commonly enriched terms on postnatal day 90. A) Venn diagram showing enrichment terms commonly dysregulated among groups; **B)** Alluvial plot 16 dysregulated terms among groups connected with differentially expressed proteins; **C)** PPI generated by String of interesting differentially expressed proteins. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein + sugar group.

3.8.2 Pathways related to growth, cell cycle, apoptosis, glucose metabolism and spliceosome were enriched in CTR+SUG, GLLP and GLLP+SUG groups in aging.

The venny analysis showed 126 commonly enriched terms in CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG groups. The differential of expression of 26 commonly terms enriched more relevant for CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG groups were illustrated by a heat map, connected to the alluvial diagram with the respective proteins that acting in some pathways (VEGF signaling pathway, regulation of TP53 expression, and degradation, hypoxia response via HIF activation, negative regulation of autophagy, NIK/NF-kappa beta signaling, mTOR signaling, response to insulin-like growth factor stimulus, transcriptome regulation by TP53, glycolysis/gluconeogenesis, spliceosome) (Figure 13- A and B). The commonly enriched terms on PND 540 by upregulated proteins and downregulated proteins in all experimental group were showed in Supplementary 4.

The PPI network analysis on PND 540 demonstrated 3 clusters of proteins: cluster 1- ALDH3A1, ACSS2, ALDH1A3 and ADH1; cluster 2- LDHA, GPI and FBP2; and cluster 3- SRSF7, TRA2B, SRSF5, SRSF3, PRPF3, PRPF6, PRPF40A, SNRPE, LSM2, LSM8, LSM5, DDX42, DHX38, POLR2A, POLR2E, POLR2G, POLR2J, NCBP1, GTF2H4, PIN1, PIP4K2C, RAC2, PIK3CA, AKT1, MTOR, PRKCA, RRAGD, CHUK, RPTOR and EEF2K (Figure 11- C).

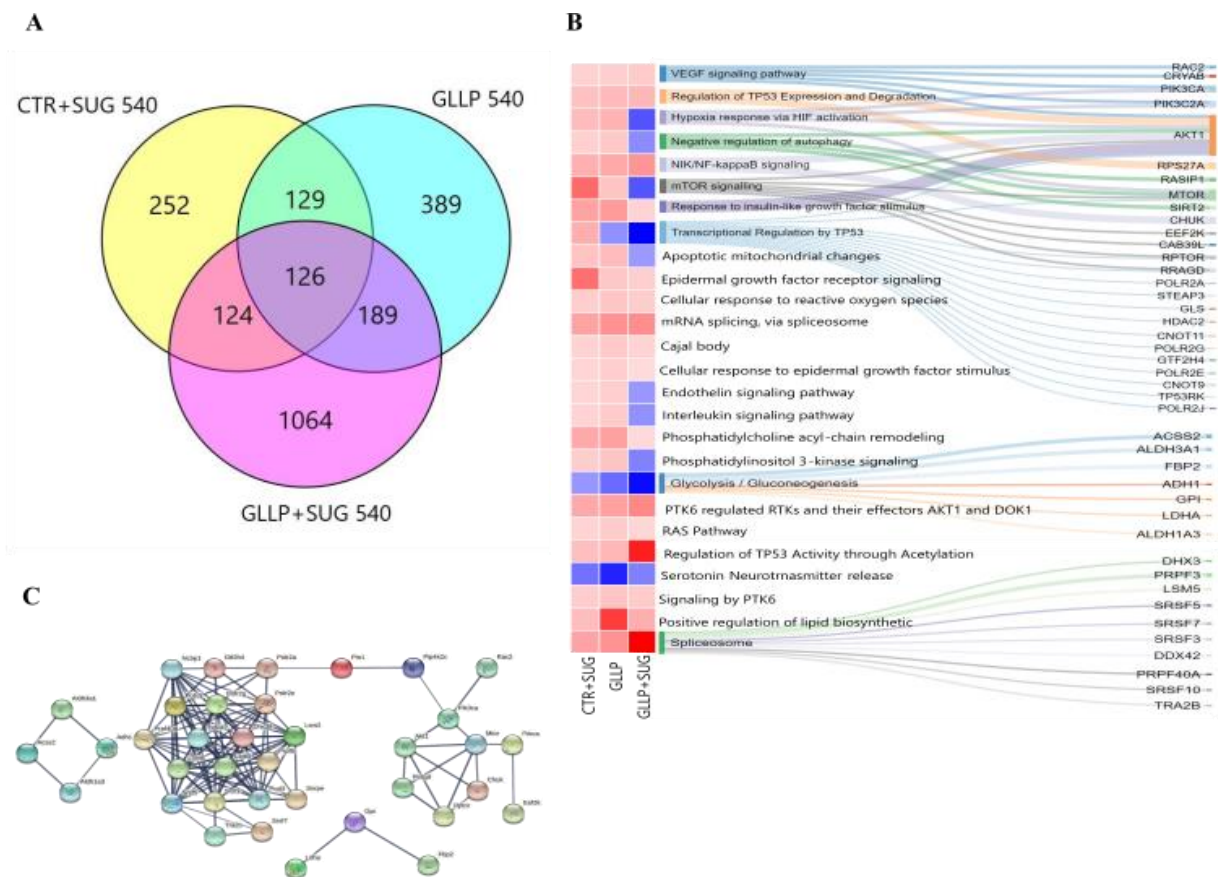


Figure 13. Venn diagram, heatmap and protein-protein interaction (PPI) representing the commonly enriched terms on postnatal day 540. A) Venn diagram showing enrichment terms commonly dysregulated among groups; **B)** Alluvial plot 26 interesting terms among groups connected with differentially expressed proteins; **C)** PPI generated by String of interesting differentially expressed proteins. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein + sugar group.

3.9 Maternal LPD and post-natal consumption causes alterations in ventral prostate

We observed the alterations in the frequency of glandular components caused by maternal LDP and postnatal sugar consumption, although the absolute and relative VP weight did not differ on PND 90 (Figure 14). The treated animals (CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG) had an increase in epithelium compartment, and a decrease of acinus and lumen compartments when compared to the CTR group. The epithelium compartment presented more folds in GLLP and GLLP+SUG groups, additionally, the same groups showed an increase of stroma compartment in relation to the CTR group (Figure 12- A and B). In histological analyses were observed the inflammatory infiltrate, especially in the stromal compartment in the groups that drunk sugar solution, the mast cell index increased in GLLP and GLLP+SUG groups when compared to the CTR group (Figure 14- C and D).

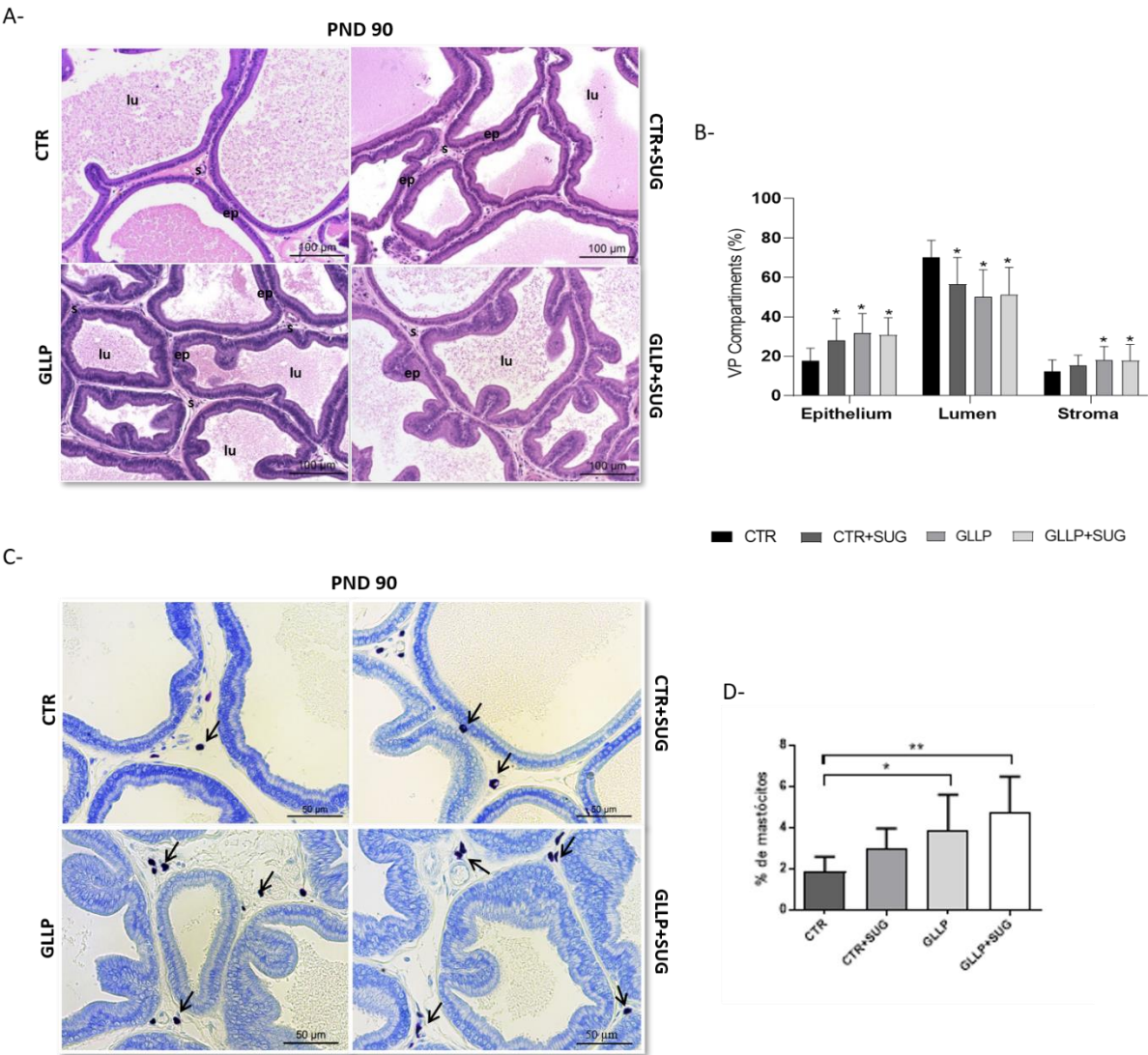
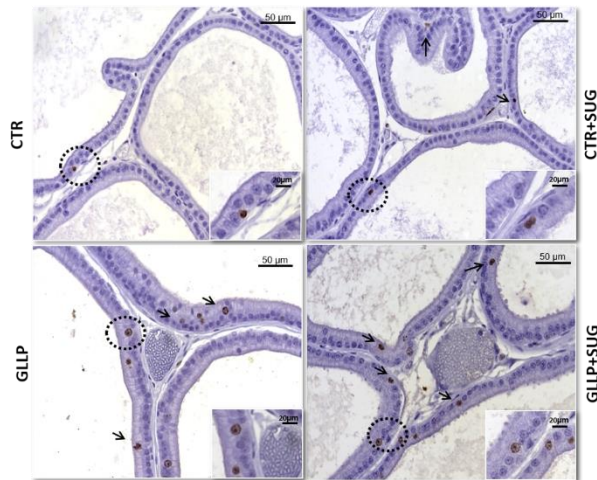


Figure 14. Representative histological sections of ventral prostate (VP) on postnatal day 90. A- General view of glandular morphology stained with hematoxylin-eosin (HE) and stereological quantification of the VP compartment's (B). C- Toluidine blue histochemical staining, arrows indicate the mast cells and mast cell quantification among experimental groups (D). *Statistically difference among experimental groups (CTR+SUG, GLLP, GLLP+SUG) when compared to the Control (CTR) group ($p < 0.05$). CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; Ep- epithelium; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein + sugar group; PND- postnatal day; lu- lumen; S- stroma.

On PND 90, the cellular proliferation index evaluated by Ki67 was increased in the GLLP group when compared to the CTR group and it was visualized less intense AR immunostaining in the nuclei of prostatic epithelial cell in GLLP and GLLP+SUG groups (Figure 15 and 16).

A-



B-

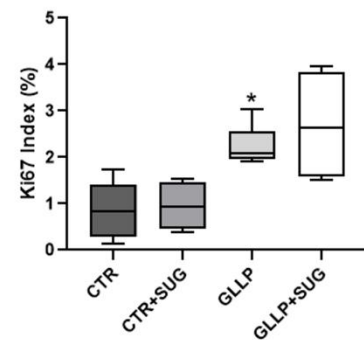


Figure 15. Proliferation cell analysis in ventral prostate on postnatal day 90. A- Representative immunohistochemistry against Ki67 in the VP from CTR, CTR+SUG, GLLP and GLLP+SUG groups. Filled arrow: positive proliferation cells; B- Graphics represent the percentage of positive cells for Ki67 of VP from different experimental groups (n = 6/group). Data are expressed as median $\pm$ SEM. *Demonstrated statistically difference between GLLP when compared to the CTR group ($p < 0.05$). CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein + sugar group. VP- ventral prostate.

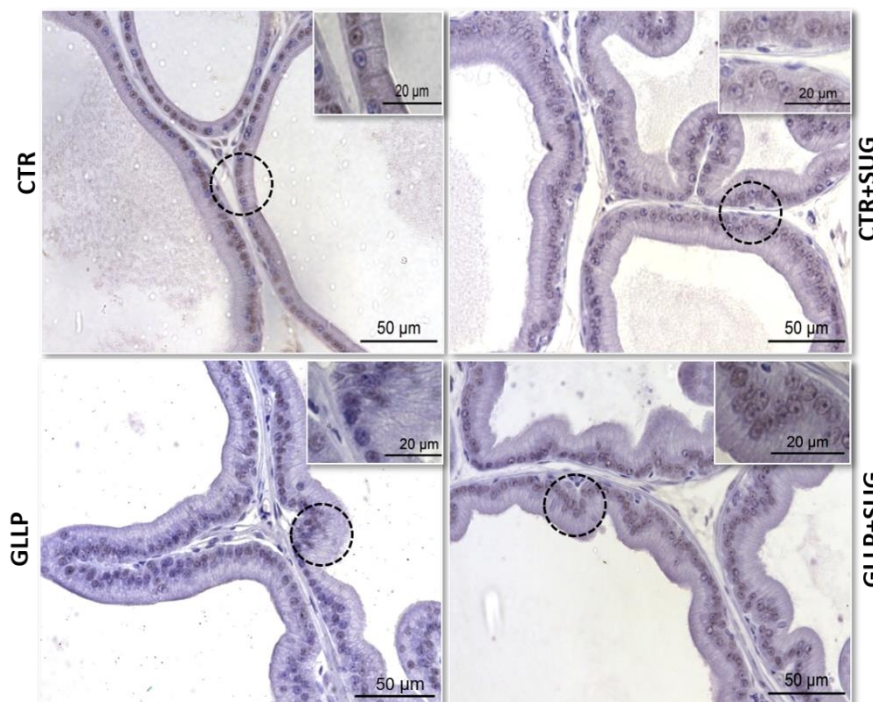


Figure 16. Representative immunohistochemistry against androgen receptor (AR) in ventral prostate on postnatal day 90. Dashed circle illustrates the positive AR nucleus. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein + sugar group.

On PND 540, the stroma compartment increased in the GLLP+SUG group when compared to other experimental groups (CTR, CTR+SUG, and GLLP), whereas, the luminal compartment was reduced in the same group in relation to the CTR and CTR+SUG groups (Figure 17- A and B). The older rats showed the presence of some prostatic lesions. It was observed the epithelial atrophy and physiological hyperplasia in CTR, CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG groups, this kind of alteration is typic in aging animals. Other prostatic disorders such as focal hyperplasia, intraepithelial neoplasia, and carcinoma in situ were visualized in treatment groups (CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG) (Suppl. Figure 5- A-J).

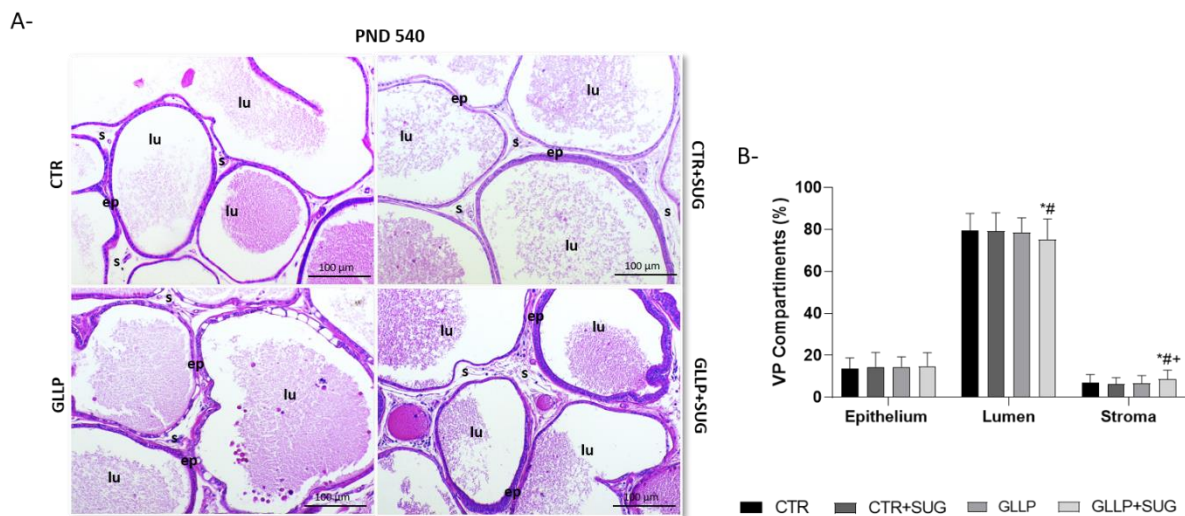


Figure 17. Representative histological sections of ventral prostate (VP) on postnatal day 540. A- General view of glandular morphology stained with hematoxylin-eosin (HE) and stereological quantification of the VP compartment's (B). *Statistically difference between experimental groups (CTR+SUG, GLLP, GLLP+SUG) in relation to Control (CTR) group when $p < 0.05$. # Statistically difference between CTR+SUG and GLLP+SUG groups when $p < 0.05$. + Statistically difference between GLLP and GLLP+SUG when $p < 0.05$. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein + sugar group. PND- Postnatal day.

The PCNA and prostatein expression analyzed by western blotting did not have a significant difference among experimental groups on PND 90 and 540 (Figure 18- A-D).

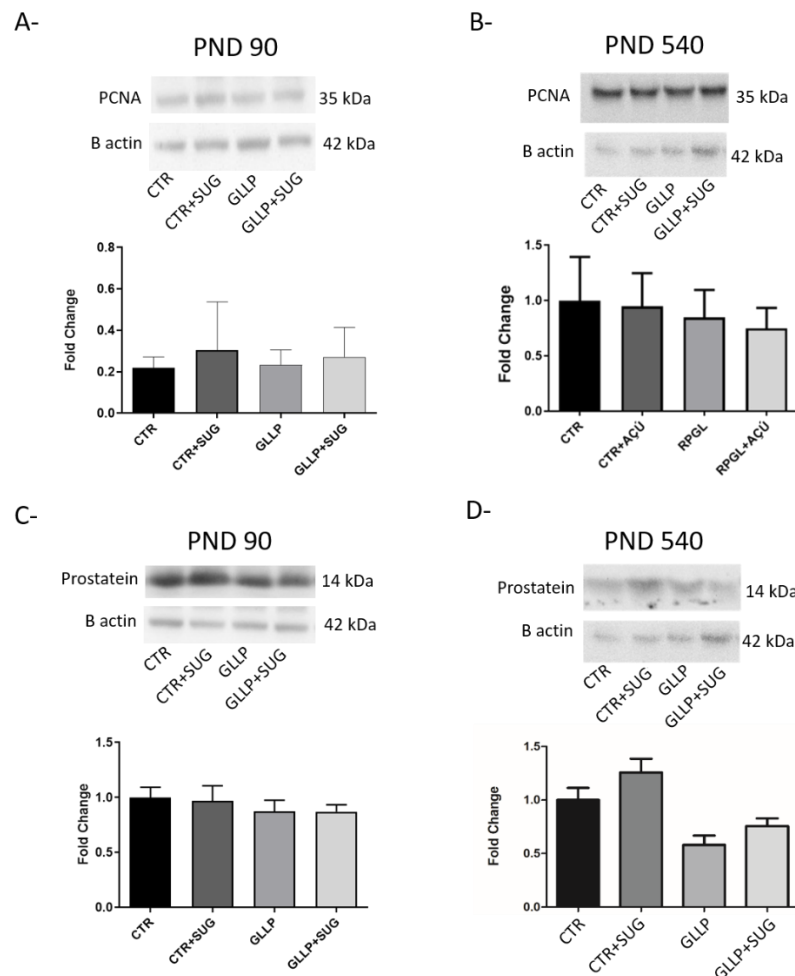


Figure 18. Graphics represent the protein expression of PCNA and prostatein on postnatal day 90 and 540. A and B- PCNA expression from different experimental groups on postnatal day (PND) 90 and 540, respectively. C and D- Prostatein expression from different experimental groups on PND 90 and 540. Data are expressed as mean $\pm$ SD. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein + sugar group; PND- Post Natal Day.

4. Discussion

The novel aspect of this study demonstrated that maternal LPD and postnatal sugar consumption altered the VP morphophysiology on PND 90 and persists until PND 540, mainly changing the autophagy process observed on the proteomic profile. The animals submitted to maternal LPD and postnatal sugar consumption on PND 90 enriched terms related to proliferation and histones pathways, while in aging enriched terms that influence the growth, cell cycle, and autophagy. The enriched terms can explain the alterations generated by maternal LPD and postnatal

sugar consumption such as growth delay induced by LPD, glucose intolerance caused by the increase of sugar solution intake, alterations in VP morphophysiology aspects in adult and aging animals.

The GLLP dams had a reduction of body weight in the end of lactation period and was associated with a lower diet consumption. Although there was a significant increase in all relative adipose tissue weights in GLLP dams, similar results were visualized by Moretto et al., 2011 with dams fed with LPD (6% of protein) during the lactation period. The adverse conditions during the gestational and lactational periods stimulate energy storage and increase of adiposity since the lipid content especially in gonadal white adipose tissue in the lactation period are essential for milk-protein synthesis (Moretto et al., 2011). Additionally, the maternal LPD can impact a decrease in quality milk and dairy production, consequently induce growth restriction resulting in low birth weight and reduced organ growth in offspring (Grigor et al., 1987; Moretto et al., 2011). However, since these animals start to feed normal diet, this result can be reversed through catch-up growth (Jones et al., 2011).

The CTR+SUG and GLLP+SUG animals had an increase in sugar solution intake that resulted in a decrease in the food intake in both experimental groups, especially for the GLLP+SUG group, which also showed a decrease in the energy intake when compared to the CTR and CTR+SUG groups. The body weight of the CTR+SUG group was similar to the CTR group, while the GLLP+SUG group decreased during all sugar solution consumption period. Based on these data, we realized the sugar consumption enhance the effects caused by maternal LPD. The fat weights of the CTR+SUG group did not have a significant difference and the GLLP+SUG group showed a decrease in relation to the CTR+SUG, both groups (CTR+SUG and GLLP+SUG) had an increase in this parameter. Similar results were described by De Oliveira et al., (2020), who showed lower energy intake and an increase of adipose tissue and Lee index with rats fed with a high sugar diet (HSD) contained 36.32% of add sugar consumed during 18 weeks. Additionally, the postnatal sugar consumption in the CTR+SUG group increased glycemia in 120 minutes and at the AUC when compared to the CTR group on PND 90, which characterized a glucose intolerance. On PND 540, the glycemia and AUC were not different, the CTR+SUG animals recovered in this parameter. Thus, we believe in a compensatory mechanism in the treated animals, where there is an increase in insulin production, taking glycemic parameters to levels close to the control group (Sheng et al., 2017).

The control and composition of body weight are depending on factors set, such as energy intake, energy expenditure, fat deposition and, the action of hormones (insulin, leptin, and Ghrelin) (Woods et al., 1985; Martinez, 2000; Zigman et al., 2005; Priego et al., 2009; González-Muniesa et al., 2017). Additionally, the consumption of sugar can modulate the control of appetite through different mechanisms resulting in reduced food intake (Gat-Yablonski; et al., 2013; Barbosa de

Queiroz et al., 2014). In our proteomic data, we observed that the ghrelin and insulin upregulated terms and, glycolytic process enriched by downregulated protein could explain the alterations in the increase of sugar solution intake associated with the decrease in diet intake and body weight and, glucose intolerance visualized in the CTR+SUG group on PND 90. Since, the ghrelin hormone regulates glucose metabolism and insulin secretion (Poher, et al., 2018). Epidemiological studies highlighted the inverse relationship between the indexes of impaired glucose tolerance and insulin resistance (Tschop et al., 2001). Zigman et al., (2005) demonstrated that when the rats were exposed to a high-fat diet (HFD), Ghrelin or Ghrelin receptor (GHSR)- null mice showed a better glucose tolerance and insulin sensitivity when compared to wildtype. Additionally, the zinc finger and BTB domain containing 20 (ZBTB20) downregulated DEP can affect the glycolytic metabolism contributing to the glucose intolerance visualized in CTR+SUG animals (Sun et al., 2020).

The other processes that were enriched by down-regulated DEPs were the sphingolipid metabolism and lipid homeostasis that have an association with the regulation of autophagy, which was an upregulated term enriched. Autophagy is a prosurvival mechanism, can be stimulated by different types of cellular stress, which promoting the removal of damaged proteins and/ or organelles, to maintain essential activity and viability in response to nutrient limitation (Kim et al., 2011; Young et al., 2013; Rodriguez-vargas et al., 2019). The autophagy regulation process is directly related to the metabolism of lipid and sphingolipids (Young et al., 2013; Young; Wang, 2018; Soto- Avellaneda; Morrison, 2020). Sphingolipid metabolites regulate the Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase (ULK) 1/2 complex via mammalian target of rapamycin 1 (mTOR1), AMPK, which is responsible for initiating autophagosome (Young; Wang, 2018). De Stefani et al., (2017) with a mouse model of sugar solution consumption (15% of glucose) during 7 months showed molecular implications on lipid accumulation and autophagy in skeletal muscle.

On PND 90, the GLLP group had a decrease in AGD, this parameter is directly related to testosterone levels (Lu et al., 2020). It was visualized in the VP an increase of epithelium and stroma compartments and a decrease of the lumen, additionally, the GLLP animals had a higher cellular proliferation index evaluated by Ki 67 immunostaining when compared to the CTR group and, less intense AR immunostaining in the nuclei of prostatic epithelial cell. These parameters indicate the GLLP animals on PND 90 had a delay in the development of VP and these animals did not reach the catch-up growth yet, since Rinaldi et al. (2013) with the same experimental model had similar results in some parameters in animals submitted to maternal LPD on PND 120. Pinho et al. (2014), Colombelli et al., (2017), and Santos et al., (2019) already demonstrated the development delay of the prostate gland since the beginning of life in offspring. Therefore, growth, cellular proliferation, vasculogenesis, and development terms were enriched by upregulated and downregulated DEP, and could contribute to this delay visualized in these GLLP animals, indicating that these animals did

not reach the catch-up growth yet. Interestingly the hedgehog signaling pathway and Mitogen-Activated Protein Kinase 2 (MAPK2) and MAPK activation terms that acting in the endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis (Ma et al., 2019) that it is essential processes for the development and growth prostate (Colombelli et al., 2017) were enriched by arrestin, beta 1 (ARRB1) upregulated DEP. We believe that the catch-up growth will occur with the participation of this protein.

The GLLP+SUG group had a lower food intake than other groups. The GLLP+SUG upregulated and downregulated DEP's enriched pathways related to the arachidonic acid metabolism and autophagy process. Both enriched terms can be stimulated by the metabolism of nutrients. The arachidonic acid metabolic process has an association with an increase of mast cells visualized in the GLLP+SUG group. Depending on the stimulus, mast cell activation can stimulate the prolonged synthesis and secretion of cytokines and derivatives of arachidonic acid, which can act on immunity and inflammation associated with nutrients metabolism (Kovanen; Bot, 2017; Sonnweber et al., 2018). Among the types of autophagy, the macroautophagy (enriched term) is the major catabolic mechanism used by eukaryotic cells to maintain nutrient homeostasis and organellar quality control (Levine; Kroener, 2019). The autophagy process can be activated by nutrients availability, the starvation-induced autophagy is regulated by short coiled-coil protein (SCOC), a Golgi protein, upregulated DEP in the GLLP+SUG group. In addition, other enriched phosphatidylinositol terms had related in the autophagy initiation process (Nishimura et al., 2017; Wang et al., 2017; Blunsom; Cockcroft, 2020).

On PND 540 the CTR+SUG animals showed terms related to the autophagy process, which can have remained enrichment since PND 90. The AMPK and mTOR pathways enriched by AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1), EEK2K and ULK1 upregulated DEPs act in the regulation of the autophagy process (Kim et al., 2011). The process can be promoted by AMPK and, inhibited by mTOR (Kim et al., 2011). Interestingly, the ULK1 was upregulated DEPs by the CTR+SUG group, this protein is part of the complex necessary for the initiation of the autophagosome (Young; Wang, 2018). Downregulated terms related to Glucose metabolism were enriched by acyl-CoA synthetase short-chain 2 (ACSS2) and angiotensinogen (AGT), which also act the autophagy regulation (Ha et al., 2015). ACSS2 can be phosphorylated by AMPK and stimulate the expression of lysosomal and autophagosomal genes (Zhang et al., 2019). Huang et al. (2018) showed that ACSS2 Knockdown animals when received a normal diet were phenotypically normal, but when fed a high-fat diet, these animals become markedly less obese, this can explain the not alteration in the body weight and the fats in CTR+SUG animals.

The effects caused by maternal LPD in the begging of life remained until the aging. GLLP group persisted with a lower body weight and AGD and, showed an increase of relative VP weight

and a decrease of prostatein expression. Some researchers demonstrated that maternal LPD (6% of protein) caused the delay of VP development with some physiologic effects thought life that could impact aging, including the development of VP lesions (Rinaldi et al., 2013; Pinho et al., 2014; Colombelli et al., 2017; Santos et al., 2019). Additionally, the upregulated and downregulated DEPs enriched terms associated to mTOR, insulin, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), estrogen, PI3K-Akt and cytochrome P450. Work from our lab, with the same experimental model with VP already demonstrated the alterations in VP proteomic profile in similar pathways, additionally, the increase of AKT-1 expression in VP on PND 21 and, a decrease of AKT-1 and PI3K expression on PND 540 of animals from GLLP group (Santos et al., 2019; 2020). The changes in young animals remained until the aging, which can have to accelerate the aging process by upregulated or downregulated alterations in common aging metabolic pathways.

The body weight and AGD remained decrease in the GLLP+SUG group from PND 90 until 540. The relative VP weight showed an increase in the GLLP+SUG group when compared to the CTR and CTR+SUG groups. The VP had a significant increase of stroma and a reduction in the lumen compartment, this can have reflected in lower quantity luminal secretion, which can be represented by a decrease of prostatein expression visualized in the GLLP+SUG group. These results demonstrated that the maternal adverse conditions associated with postnatal conditions until adult life can enhance the effects and can result in precancerous histological alterations (Herrera-Covarrubias et al., 2019).

Although autophagy is common in aging, we realized this process is stimulated by sugar consumption, since the animals from the GLLP+SUG group on PND 90 also presented this term enriched. On PND 540, this group had the autophagy related 5 (ATG5) and Sirtuin 2 (SIRT2) downregulated DEPs that enriched pathways which are commons in the autophagy process in aged tissues (Filfan et al., 2017; Xu et al., 2019), additionally had mTOR, Sirtuin 3 (SIRT3) and MTMR3 downregulated DEPs and phosphatidylinositol enrichment terms acting in this process too (Kim et al., 2011; Zou et al., 2012; Han et al., 2020). Proteins related to the cell cycle, differentiation, and development of cellular and mechanisms of cellular detoxification were enriched by the metabolism of RNA and cytochrome P450 (Bogdani et al., 2013; Xu et al., 2016).

In relation, the commonly enriched terms on PND 90 most of them were related to histones modifications, such as methyltransferase, ubiquitination, and deubiquitination, that have been implicated in the modulation of gene expression in physiological and pathological conditions (Audia et al., 2016). Most of the terms were enriched by SUZ12, HIST1H1D, and HIST2H2AB DEPs. The suppressor of zeste 12 (SUZ12) that belong to a polycomb group (PcG), that are important epigenetic regulators of transcription. The SUZ12 acts in PCR2 protein, which is the major methyltransferase for histone 3 at lysine 27 (H3K27) methylation, this modification can be

associated with transcriptional repression of Hox gene expression during embryonic development. This is interesting since the animals from CTR+SUG, GLLP, and GLLP+SUG were submitted to the adverse conditions during the development. Additionally, SUZ12 protein forms an EZH2 complex, which your overexpression was related to prostate cancer (Gao et al., 2010; Brecqueville et al., 2011; Ren et al., 2012; Croce; Helin, 2013). In aging, most of the commonly enriched terms were commons in the aging process such as spliceosome, TP53, glycolysis, autophagy, mTOR, VEGF, hypoxia (Lapierre et al., 2015; Papadopoli et al., 2019; Yeo, 2019). Interestingly the GLLP+SUG group showed a different profile in relation to other groups (CTR+SUG and GLLP), which demonstrated that the LPD associated with postnatal sugar consumption enhances the effects in aging.

5. Conclusion

In the proteomic profile analysis were enriched mainly catabolic and metabolic process. We realized the sugar consumption altered the autophagy process since PND 90 that persists until PND 540. Maternal LPDs enriched growth, cell cycle, and proliferating pathways, while only sugar consumption impacts the pathways related to metabolic stress. In summary, we observed that not only maternal nutritional conditions are important for the individual, but the quality of food throughout life. It can be seen that the adult animals had some changes but not at the level of impacting the functionality of the prostate, but these alterations since adult life in aging can contribute to prostatic pathologies.

References

- AUDIA, J. E.; CAMPBELL, R. M. Histone modifications and cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 4, p. a019521, 1 abr. 2016.
- BAI, S. Y.; BRIGGS, D. I.; VICKERS, M. H. Increased systolic blood pressure in rat offspring following a maternal low-protein diet is normalized by maternal dietary choline supplementation. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 3, n. 5, p. 342–349, out. 2012.
- BARKER, D. J. P. **The fetal and infant origins of adult disease** *British Medical Journal*, 1990.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527–528, 1968.
- BLUNSOM, N. J.; COCKCROFT, S. **Phosphatidylinositol synthesis at the endoplasmic reticulum** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* Elsevier B.V., , 1 jan. 2020.
- BOGDANI, M. et al. Biobreeding rat islets exhibit reduced antioxidative defense and N-acetyl cysteine treatment delays type 1 diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. 111–123, 1 fev. 2013.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRECQUEVILLE, M. et al. **Mutations and deletions of the SUZ12 polycomb gene in myeloproliferative neoplasms** *Blood Cancer Journal* Nature Publishing Group, , 26 ago. 2011.
- CHANDRASHEKAR, D. S. et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. **Neoplasia (United States)**, v. 19, n. 8, p. 649–658, 1 ago. 2017.
- CLAYCOMBE, K. J. et al. Maternal low-protein diet causes body weight loss in male, neonate Sprague-Dawley rats involving UCP-1-mediated thermogenesis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 7, p. 729–735, 2015.
- COGGER, K. F. et al. Glycoprotein 2 is a specific cell surface marker of human pancreatic progenitors. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.
- COLOMBELLI, K. T. et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and Comparative Endocrinology**, v. 246, p. 258–269, 15 maio 2017.
- CROCE, L. DI; HELIN, K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. **Nature Publishing Group**, 2013.
- DALVI, P. S. et al. Long-term metabolic effects of malnutrition: Liver steatosis and insulin resistance following early-life protein restriction. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, 1 jul. 2018.
- DE LEÓN-RAMÍREZ, Y. M. et al. Histomorphological testicular changes and decrease in the sperm count in pubertal rats induced by a high-sugar diet. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 235, p. 151678, 1 maio 2021.
- DE OLIVEIRA, D. T. et al. High-sugar diet leads to obesity and metabolic diseases in ad libitum-fed rats irrespective of caloric intake. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 71–81, 1 jan. 2020.
- DE OLIVEIRA, J. C. et al. Protein restriction during the last third of pregnancy malprograms the

- neuroendocrine axes to induce metabolic syndrome in adult male rat offspring. **Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 1799–1812, 2016.
- DE QUEIROZ, K. B. et al. Endurance Training Increases Leptin Expression in the Retroperitoneal Adipose Tissue of Rats Fed with a High-Sugar Diet. **Lipids**, v. 49, n. 1, p. 85–96, jan. 2014.
- DE STEFANIS, D. et al. Effects of chronic sugar consumption on lipid accumulation and autophagy in the skeletal muscle. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 363–373, 1 fev. 2017.
- DEARDEN, L.; OZANNE, S. E. **The road between early growth and obesity: New twists and turns****American Journal of Clinical Nutrition**American Society for Nutrition, , 1 jul. 2014.
- FLEMING, T. P.; VELAZQUEZ, M. A.; ECKERT, J. J. **Embryos, DOHaD and David Barker****Journal of Developmental Origins of Health and Disease**Cambridge University Press, , 13 maio 2015.
- FORD, N. D.; PATEL, S. A.; NARAYAN, K. M. V. Obesity in Low-and Middle-Income Countries: Burden, Drivers, and Emerging Challenges. v. 38, p. 145–164, 2017.
- GAO, Y.; HYTTTEL, P.; HALL, V. J. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during early porcine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 6, p. 540–549, 1 jun. 2010.
- GAT-YABLONSKI, G.; PANDO, R.; PHILLIP, M. Nutritional catch-up growth. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 106, p. 83–89, 2013.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 15 jun. 2017.
- GRIGOR, M. R. et al. Effect of dietary protein and food restriction on milk production and composition, maternal tissues and enzymes in lactating rats. **Journal of Nutrition**, v. 117, n. 7, p. 1247–1258, 1 jul. 1987.
- HA, J.; GUAN, K. L.; KIM, J. **AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism****Molecular Aspects of Medicine**Elsevier Ltd, , 1 dez. 2015.
- HAN, D. et al. SIRT3 deficiency is resistant to autophagy-dependent ferroptosis by inhibiting the AMPK/mTOR pathway and promoting GPX4 levels. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 11, p. 8839–8851, 1 nov. 2020.
- HERRERA-COVARRUBIAS, D. et al. Prepuberal stress and obesity: Effects on serum corticosterone, prolactin, testosterone and precancerous prostate lesions in adult rats. **Experimental Oncology**, v. 41, n. 2, p. 130–137, 2019.
- HUANG, Z. et al. ACS2 promotes systemic fat storage and utilization through selective regulation of genes involved in lipid metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 40, p. E9499–E9506, 2 out. 2018.
- HYER, M. M. et al. Sex modifies the consequences of extended fructose consumption on liver health, motor function, and physiological damage in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 317, n. 6, p. R903–R911, 2019.
- IGNATCHENKO, V. et al. VennDIS: A JavaFX-based Venn and Euler diagram software to generate publication quality figures. **Proteomics**, v. 15, n. 7, p. 1239–1244, 1 abr. 2015.
- JONES, D. C.; BERNSTEIN, M.; GERMAN, R. Z. Catch-up and targeted growth following variable duration protein restriction: Effects on bone and body mass. **Journal of Morphology**, v. 272, n. 4, p. 485–496, abr. 2011.
- KENDIG, M. D. et al. Metabolic Effects of Access to Sucrose Drink in Female Rats and Transmission of Some Effects to Their Offspring. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131107, 2 jul. 2015.
- KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 132–141, fev. 2011.

- KOVANEN, P. T.; BOT, I. Mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease – Activators and actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 816, p. 37–46, 5 dez. 2017.
- LANGLEY-EVANS, S. C. **Nutrition in early life and the programming of adult disease: A review** **Journal of Human Nutrition and Dietetics** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2015.
- LANGLEY-EVANS, S. C.; MORAN, V. H. **Childhood obesity: Risk factors, prevention and management** **Journal of Human Nutrition and Dietetics** Blackwell Publishing Ltd, , 1 out. 2014.
- LAPIERRE, L. R. et al. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. **Autophagy**, v. 11, n. 6, p. 867–880, 1 jan. 2015.
- LU, Y. et al. The association between anogenital distance and benign prostatic hyperplasia related lower urinary tract symptoms in Chinese aging men. **World Journal of Urology**, 2020.
- MA, Z. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Regulates Endothelial Function Through β -Arrestin 1. **Circulation**, v. 139, n. 13, p. 1629–1642, 26 mar. 2019.
- MADSEN, H. , T. P. **Introduction to General and Generalized Linear Models**. 1. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- MALIK, V. S.; HU, F. B. **Fructose and Cardiometabolic Health What the Evidence from Sugar-Sweetened Beverages Tells Us** **Journal of the American College of Cardiology** Elsevier USA, , 6 out. 2015.
- MARTINEZ, J. A. **Body-weight regulation: Causes of obesity**. Proceedings of the Nutrition Society. **Anais...** CAB International, 2000
- MARTINS, A. D.; MAJZOUB, A.; AGAWAL, A. **Metabolic syndrome and male fertility** **World Journal of Men's Health** Korean Society for Sexual Medicine and Andrology, , 1 maio 2019.
- MORETTO, V. L. et al. Low-Protein Diet during Lactation and Maternal Metabolism in Rats. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2011, p. 1–7, 20 out. 2011.
- NISHIMURA, T. et al. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains . **The EMBO Journal**, v. 36, n. 12, p. 1719–1735, 14 jun. 2017.
- NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 2007.
- PAPADOPOLI, D. et al. Mtor as a central regulator of lifespan and aging. **F1000Research**, v. 8, 2019.
- PINHO, C. F. et al. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 7, p. 967–973, ago. 2014.
- POHER, A. L.; TSCHÖP, M. H.; MÜLLER, T. D. Ghrelin regulation of glucose metabolism. **Peptides**, v. 100, p. 236–242, 1 fev. 2018.
- PORTELA, L. M. et al. Increased oxidative stress and cancer biomarkers in the ventral prostate of older rats submitted to maternal malnutrition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 523, 1 mar. 2021.
- PRIEGO, T. et al. Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: Depot- and sex-related differential response. **Genes and Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 151–156, jun. 2009.
- PUCHTLER, H. et al. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation - Practical and theoretical considerations. **Histochemie**, v. 21, n. 2, p. 97–116, jun. 1970.
- PULGARÓN, E. R. Childhood Obesity: A Review of Increased Risk for Physical and Psychological Comorbidities. **CLITHE**, v. 35, p. A18–A32, 2013.
- RAKVAAG, E. et al. Effects of Different Fasting Durations on Glucose and Lipid Metabolism in Sprague Dawley Rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 51, n. 8, p. 546–553, 2019.

- RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 7, p. 349–353, 12 ago. 1976.
- REN, G. et al. Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 12, p. 3091–3104, 15 jun. 2012.
- RIBATTI, D. **The Staining of Mast Cells: A Historical Overview**International Archives of Allergy and ImmunologyS. Karger AG, , 1 maio 2018.
- RINALDI, J. C. et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763–774, 19 abr. 2013.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L. et al. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 36, n. 6, p. 9721, dez. 2014.
- RODRÍGUEZ-VARGAS, J. M.; OLIVER-POZO, F. J.; DANTZER, F. **PARP1 and poly(ADP-ribose)ation signaling during autophagy in response to nutrient deprivation**Oxidative Medicine and Cellular LongevityHindawi Limited, , 2019.
- RUFF, J. S. et al. Human-relevant levels of added sugar consumption increase female mortality and lower male fitness in mice. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 13 ago. 2013.
- SADOWSKA, J.; RYGIELSKA, M. The effect of high fructose corn syrup on the plasma insulin and leptin concentration, body weight gain and fat accumulation in rat. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 28, n. 7, p. 879–884, 2019.
- SANTOS, S. A. et al. Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Aging**, v. 12, n. 20, p. 19954–19978, 1 jan. 2020.
- SANTOS, S. A. A. et al. Maternal low-protein diet impairs prostate growth in young rat offspring and induces prostate carcinogenesis with aging. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 74, n. 6, 2019.
- SCHULZ, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 39, p. 16757–16758, 2010.
- SENE, L. DE B. et al. Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71310, ago. 2013.
- SHENG, Q. et al. Autophagy protects pancreatic beta cell mass and function in the setting of a high-fat and high-glucose diet. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- SONNWEBER, T. et al. **Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases**International Journal of Molecular SciencesMDPI AG, , 1 nov. 2018.
- SOTO-AVELLANEDA, A.; MORRISON, B. E. **Signaling and other functions of lipids in autophagy: A review**Lipids in Health and DiseaseBioMed Central Ltd, , 30 set. 2020.
- SUN, Y. et al. Zbtb20 Restrains CD8 T Cell Immunometabolism and Restricts Memory Differentiation and Antitumor Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 10, p. 2649–2666, 15 nov. 2020.
- TSCHÖP, M. et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 24, n. 6, p. RC19–RC21, 2001.
- UHLÉN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, 23 jan. 2015.
- VORA, N. et al. **Proteomics and metabolomics in pregnancy-An overview**Obstetrical and Gynecological SurveyLippincott Williams and Wilkins, , 1 fev. 2019.

- WADHWA, P. D. et al. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. . 26 set. 2009, p. 358–368.
- WANG, J. et al. **Autophagosome formation: Where the secretory and autophagy pathways meet**AutophagyTaylor and Francis Inc., , 4 maio 2017.
- WOODS, S. C. et al. **Insulin: Its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight**American Journal of Clinical NutritionAm J Clin Nutr, , 1985.
- XIE, C. et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. W316–W322, 1 jul. 2011.
- XU, D. et al. SIRT2 functions in aging, autophagy, and apoptosis in post-maturation bovine oocytes. **Life Sciences**, v. 232, 1 set. 2019.
- XU, X.; XIONG, X.; SUN, Y. **The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity**Science China Life SciencesScience in China Press, , 1 jul. 2016.
- YEO, E. J. **Hypoxia and aging**Experimental and Molecular MedicineNature Publishing Group, , 1 jun. 2019.
- YOUNG, M. M.; KESTER, M.; WANG, H. G. **Sphingolipids: Regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy**Journal of Lipid ResearchJ Lipid Res, , jan. 2013.
- YOUNG, M. M.; WANG, H. G. Sphingolipids as Regulators of Autophagy and Endocytic Trafficking. **Advances in Cancer Research**, v. 140, p. 27–60, 1 jan. 2018.
- ZHANG, H. et al. ACSS2-related autophagy has a dual impact on memory. **Chinese Neurosurgical Journal**, v. 5, n. 1, p. 14, 11 dez. 2019.
- ZIGMAN, J. M. et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3564–3572, dez. 2005.
- ZOU, J. et al. Myotubularin-related protein (MTMR) 9 determines the enzymatic activity, substrate specificity, and role in autophagy of MTMR8. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 24, p. 9539–9544, 2012.

Supplementary material

Supplementary Table 1. Composition of the standard or Normoprotein (AIN-76A) and Hipoprotein diets (AIN-93).

Ingredients	Normoprotein (17% of protein) g/Kg	Hipoproteic (6% of protein) g/Kg ^a
Starch	397	480
Casein (84% protein)	202	71.5
Dextrin	130.5	159
Sucrose	100	121
Soy oil	70	70
Fiber of pH 101 or pH 102 (microcellulose)	50	50 ^b
Mixture of salts AIN93G ^c	35	35
Mixture of vitamins AIN93G ^c	10	10
L-cystine	3	1
Choline hydrochloride or Choline bitartrate	2.5	2.5
Energy Intake (Kcal/g ⁻¹)	3.96	3.96

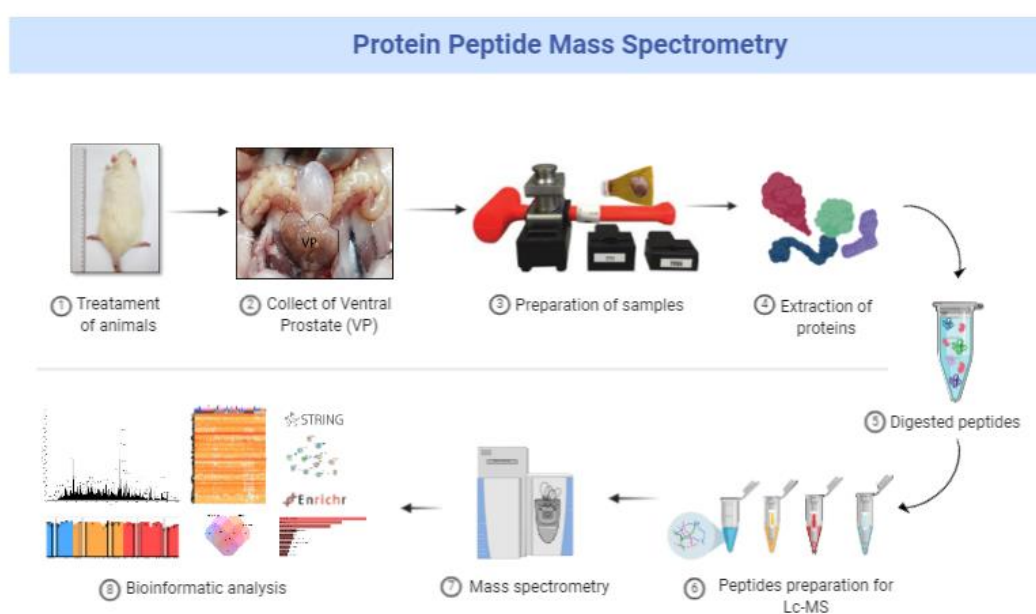
^a The hypoprotein diet was prepared by Pragsoluções (PragSoluções, SP, Brazil). Diets were supplemented with L-Cystine as sulfur amino acid.

^b Vitamin and mineral mixtures were formulated to meet the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendation for rodent diets (Reeves et al., 1993).

^c Potassium phosphate, monobasic, was added to the salt mix of this diet to maintain phosphorus at the levels found in the control casein diet (3 g/kg of diet) and the calcium: phosphorus ratio has been kept at 1.3 in both diets.

Supplementary Table 2. Specification for antibodies used in immunohistochemistry (IH) and Western-blot (WB) experiments.

Name	Company	Cat. number	Dilution IH/WB
AR (N-20)	Santa cruz	sc-816 R	1:100/1:1000
KI 67	Abcam	ab16667	1:100
Prostatein	AbDserotec	7821-1009	1:1000
PCNA	Santa cruz	sc-56	1:1000
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa cruz	sc-2030	1:100/1:2000
Bovine Anti-Goat IgG-HRP	Santa cruz	sc-2378	1:100/1:2000
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Abcam	ab6789	1:200/1:5000



Supplementary Figure 1. Representative figure of mass spectrometry analysis.

Supplementary Table 3. Anthropometrical parameters of dams during gestational and lactational periods.

Parameters	Gestational		Lactational	
	CTR	RPGL	CTR	RPGL
Initial Body Weight (g)	314.5 ± 38.94	316.00 ± 36.70	340.50 ± 29.37	326.90 ± 38.80
Final Body Weight (g)	408.90 ± 44.61	398.90 ± 38.09	350.60 ± 37.42	256.10 ± 35.95*
Body Weight Gain (g/day)	100.60 ± 86.50	82.89 ± 25.47	10.07 ± 26.87	-70.85 ± 16.98*
Food Consumption (g/day)	27.08 ± 4.90	21.62 ± 4.85*	50.91 ± 6.32	22.79 ± 5.74*
Body Length (cm)	22.50 ± 0.98	22.04 ± 0.66	22.50 ± 0.98	22.04 ± 0.66
Lee Index	1.09 ± 0.005	1.09 ± 0.002	1.09 ± 0.004	1.08 ± 0.002*
BMI (g/cm ²)	0.848 ± 0.090	0.796 ± 0.059	0.739 ± 0.057	0.522 ± 0.032*

Data are expressed as mean ± SD. *Demonstrated statistically difference between Control (CTR) group and Gestational and Lactational Low Protein (GLLP) group ($p < 0.05$). Body Mass Index (BMI).

Supplementary Table 4. Biometric parameters of dams in the end of lactation period.

Parameters	Experimental Groups	
	CTR	GLLP
Body Weight (g)	373.20 ± 18.42	253.90 ± 20.83*
Total Liver (g)	17.26 ± 1.58	12.82 ± 2.36*
Relative Liver Weight	4.62 ± 0.31	5.04 ± 0.73
Visceral Fat (g)	4.12 ± 0.69	4.31 ± 0.71
Relative Visceral Fat Weight ¹	1.10 ± 0.15	1.70 ± 0.27*
Periuterinic Fat Weight (g)	4.53 ± 2.24	5.33 ± 1.59
Relative Periuterinic Fat Weight ¹	1.20 ± 0.56	2.09 ± 0.56*
Retroperitoneal Fat (g)	3.19 ± 1.23	5.34 ± 1.55*
Relative Retroperitoneal Fat Weight ¹	0.85 ± 0.31	2.10 ± 0.53*
Total fat (g)	11.85 ± 3.80	14.99 ± 3.00
Relative Total Fat Weight ¹	3.15 ± 0.93	5.89 ± 1.00*
Estrogen ²	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.008*
Total Cholesterol	84.58 ± 13.43	51.07 ± 8.57*

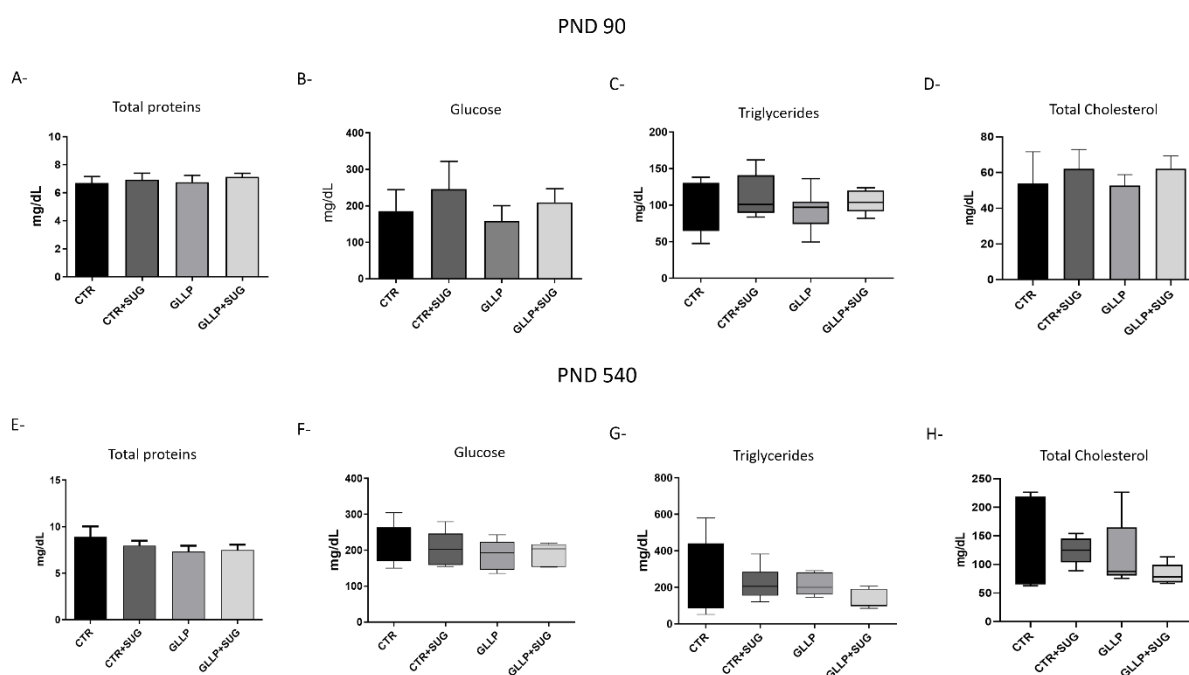
¹Data multiplied by 100. ² Data multiplied by 10. Data are expressed as mean ± SD.

*Demonstrated statistically difference between Control (CTR) group and Gestational and Lactational Low Protein (GLLP) group ($p < 0.05$).

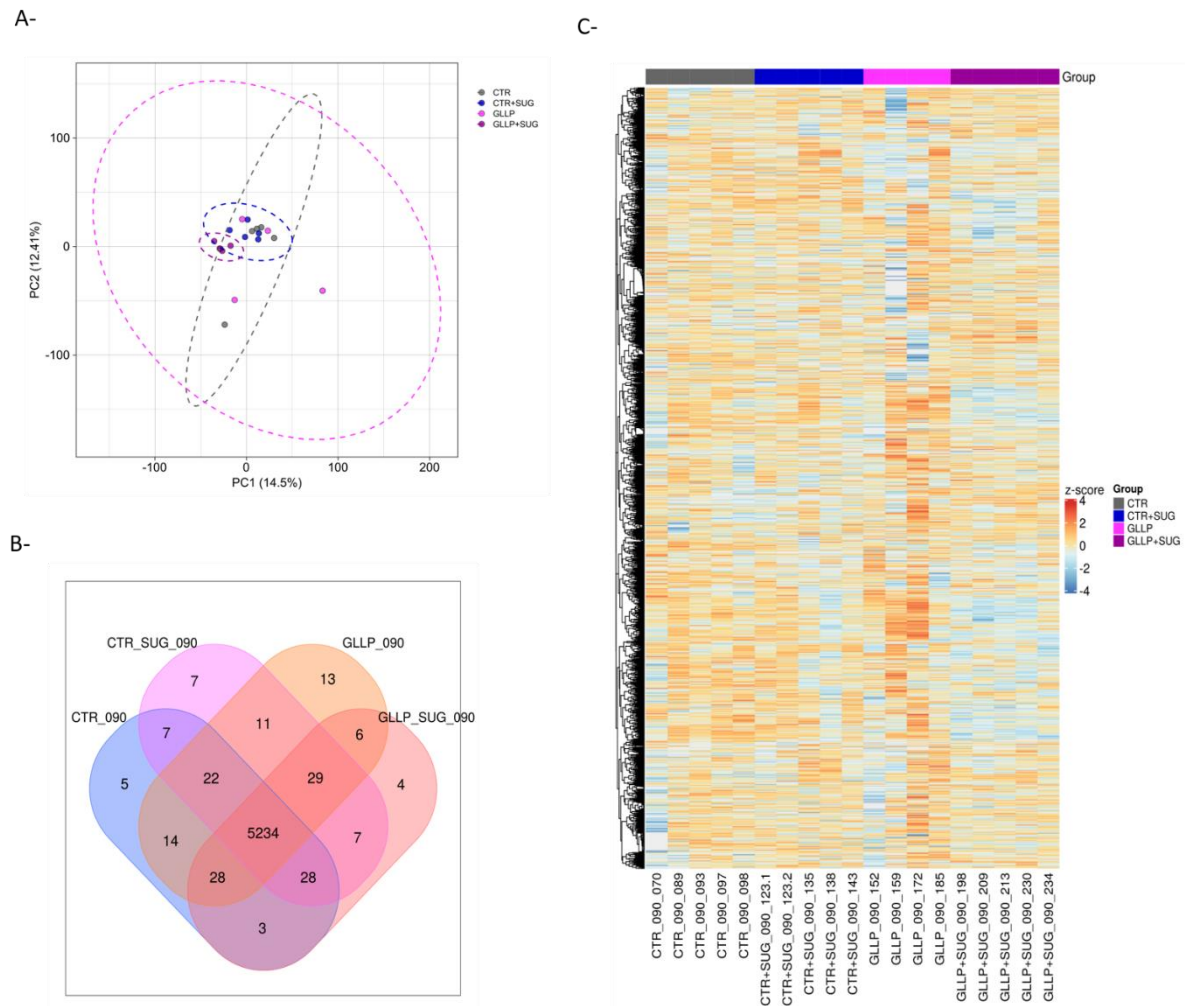
Supplementary Table 5. Biometric parameters of male offspring at postnatal day 0 and 21.

Parameters	Experimental Groups	
	CTR	GLLP
PND 0		
Body Weight (g)	7.02 ± 0.47	5.77 ± 1.22*
AGD (mm)	2.96 ± 0.35	2.75 ± 0.21*
PND 21		
Body Weight (g) ¹	50.90 ± 0.95	19.20 ± 0.44*
AGD (mm)	14.48 ± 1.95	9.23 ± 1.17*

Data are expressed as mean ± SD. ¹Data are expressed as median ± SEM. *Demonstrated statistically difference between Control (CTR) group and Gestational and Lactational Low Protein (GLLP) group (p < 0.05). AGD- Ano-Genital Distance; PND- Postnatal Day.

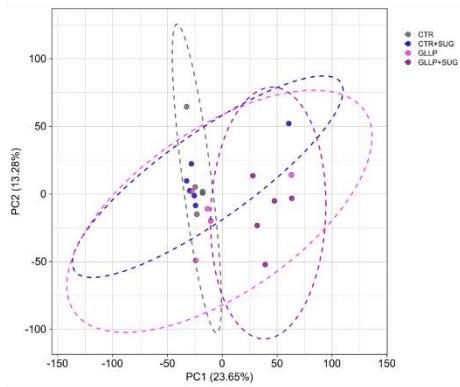


Supplementary Figure 2. Biochemical parameters of male offspring at postnatal day 90 and 540. A- Total proteins on PND 90, data are expressed as mean ± SD; B- Glucose on PND 90, data are expressed as mean ± SD; C- Triglycerides on PND 90, data are expressed as median ± SEM; D- Total cholesterol on PND 90, data are expressed as mean ± SD; E- Total proteins on PND 540, data are expressed as mean ± SD; F- Glucose on PND 540, data are expressed as median ± SEM; G- Triglycerides on PND 540, data are expressed as median ± SEM; H- Total cholesterol on PND 540, data are expressed as median ± SEM. Different symbols mean statically differences with p < 0.05. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein+sugar group; PND - Postnatal day.

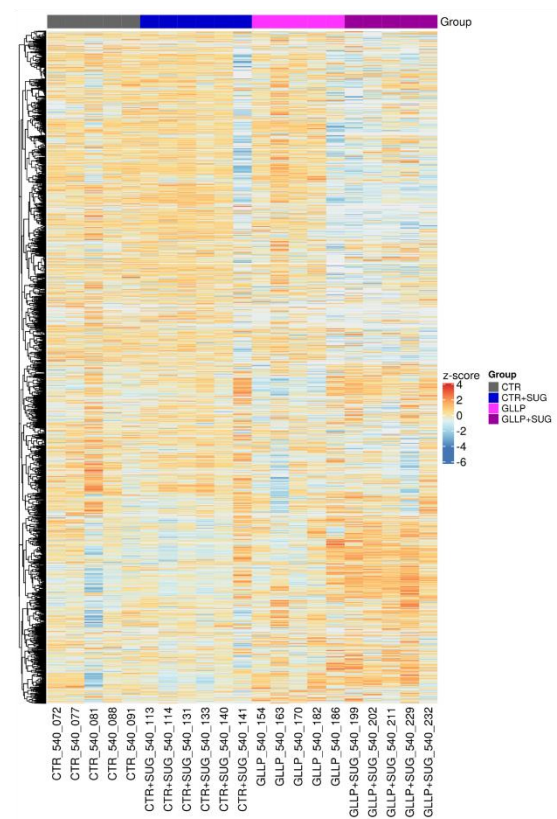


Supplementary Figure 3. Proteomic profile in adult animals on postnatal day- 90. A- Principal Component Analysis (PCA) showing clustering among samples each group; B- Venny diagram showing the intersection of differentially expressed proteins among groups. C- Heatmap showing clustering of differentially expressed proteins. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein+sugar group.

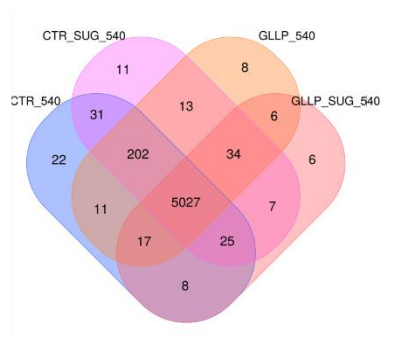
A-



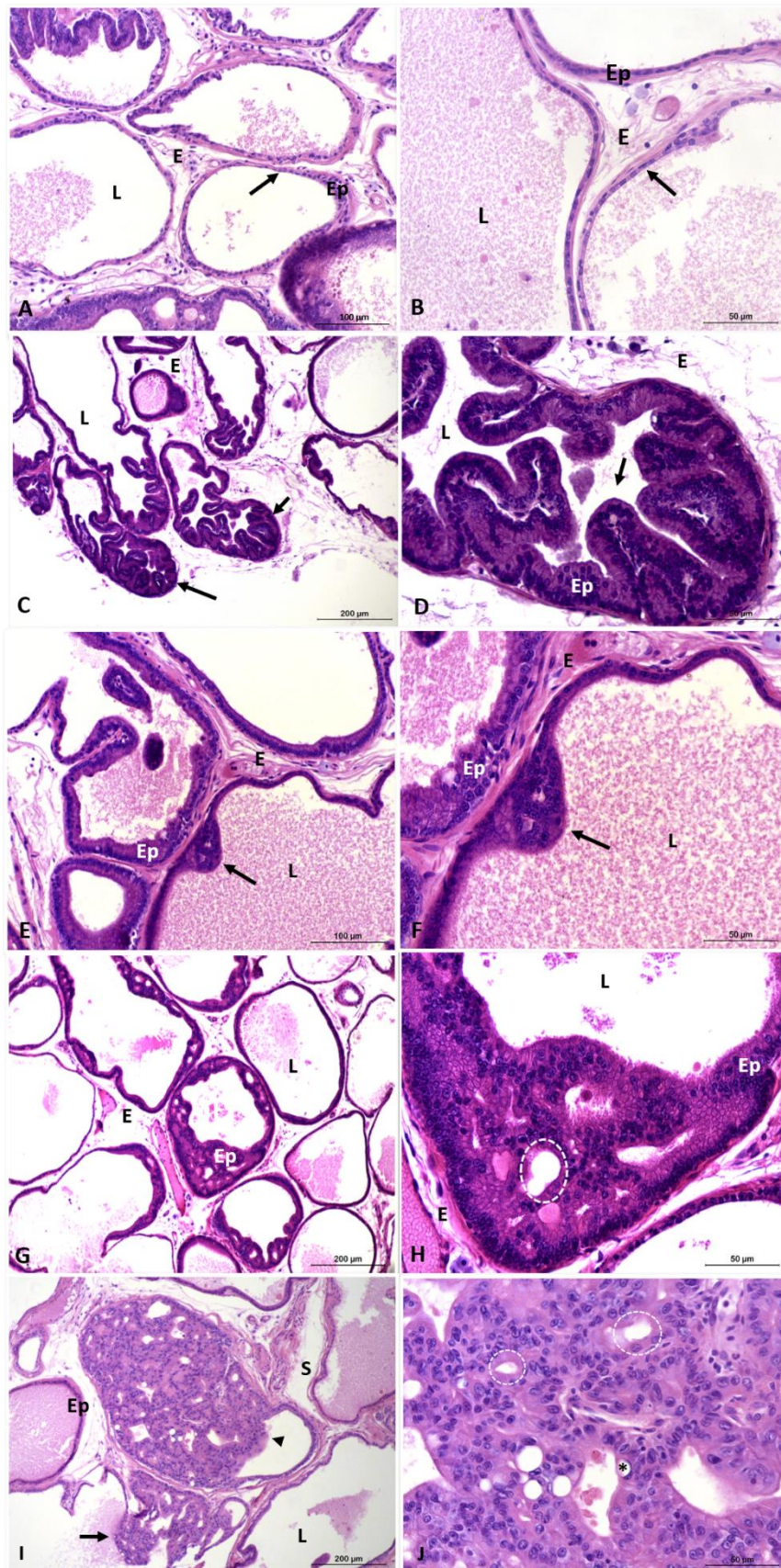
C-



B-



Supplementary Figure 4. Proteomic profile in aging animals on postnatal day-540. A- Principal Component Analysis (PCA) showing clustering among samples each group; B- Venny diagram showing the intersection of differentially expressed proteins among groups. C- Heatmap showing clustering of differentially expressed proteins. CTR- Control group; CTR+SUG- Control+sugar group; GLLP- Gestational and Lactational Low Protein group; GLLP+SUG- Gestational and Lactational Low Protein+sugar group.



Supplementary Figure 5. Representative histological sections of ventral prostate (VP) stained with hematoxylin and eosin (H.E.). A and B- Illustrate the epithelial atrophy indicate by arrows, this kind of lesion was visualized in all experimental groups. C and D- Physiological hyperplasia indicate by arrows mainly in perific regions of the gland. E and F- Atypical Hyperplasia (arrows) normally is associate with inflammation. G and H- Prostatic intraepithelial neoplasia with microacinus indicate by arrows and the presence of microacinus and vessels represented by circles and asterisk. I and J- Carcinoma in situ indicate by arrows and the presence of microacinus and vessels represented by circles and asterisk. S = stroma; EP = epithelium. L = lumen. Magnification 20 x (100 µm) e 40X (50 µm).

CAPÍTULO III

Neste capítulo serão apresentados resultados dos animais no dia pós-natal 90 com o objetivo de analisar se a RPM durante a gestação e lactação e o consumo de açúcar pós natal afetaram a funcionalidade do testículo, próstata e epidídimo.

1. Introdução

A infertilidade é considerada um problema mundial que afeta milhões de pessoas em idade reprodutiva no mundo. Estima-se que aproximadamente 48 milhões de casais são afetados e 186 milhões de indivíduos apresentam alguma doença relacionada à infertilidade, sendo o fator masculino o principal ou a causa de 50% dos problemas (Kumar; Singh, 2015; WHO, 2020; Agarwal et al., 2021). Mais de 90% dos casos de infertilidade masculina é comumente associada à diminuição da qualidade do espermatozoides; fatores como a baixa concentração de espermatozoides (oligospermia), baixa motilidade espermática (Asteno spermia) e morfologia espermática anormal (teratospermia) são os mais comuns (Sabra; Al-harbi, 2014; Kumar; Singh, 2015). Embora, outras alterações em órgãos e glândulas acessórias reprodutivas como o epidídimo, próstata e vesícula seminal também possam influenciar na infertilidade masculina (Verze et al., 2016).

Portanto a composição do fluido seminal, que garante uma boa performance reprodutiva é dependente de boas condições fisiológicas e metabólicas do organismo do indivíduo que podem ser alteradas frente a exposição a fatores genéticos, ambientais ou nutricionais, tanto no início da vida durante o período fetal e durante a vida pós-natal (Rhind; Brooks 2001; Verze et al., 2016; Rahban; Nef, 2020). O desenvolvimento intrauterino e o período pós-natal representam períodos de grande vulnerabilidade e dependendo do tempo e do tipo de exposição esta faixa adaptativa pode contribuir para o surgimento de Síndromes Metabólicas (SM), um conjunto de doenças não transmissíveis que incluem: elevada obesidade abdominal, intolerância à glicose, hipertensão, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, triglicerídeos elevados e resistência à insulina (Davies; Norman, 2002; Ozanne, 2015; Marciniak, et al., 2017).

Atualmente a hipótese de *Development Origins of Health and Disease* (DOHaD) indica que um ambiente adequado no início da vida pode reduzir os riscos de doenças não transmissíveis e melhorar a saúde ao longo da vida (Mc Kerracher, et al., 2019). Embora seja difícil confirmar o impacto das condições adversas no início da vida humana, durante a história da humanidade ocorreram alguns eventos trágicos como da fome holandesa (1944) que foi um período de fome severa na parte oeste da Holanda no final da segunda guerra mundial, que possibilitaram entender melhor as consequências dessa má nutrição materna na vida dos seus descendentes (Schulz, 2010; Carpinello et al., 2018). Dentre os modelos de DOHaD que vem demonstrando grandes impactos na funcionalidade do sistema genital masculino é o de restrição proteica materna (RPM)

(Bautista et al., 2019; Cavariani et al., 2019; Santos et al., 2019, Santos et al., 2020; Portela et al., 2021). Foram demonstradas alterações como menor taxa de fertilidade, redução da distância anogenital ao nascimento, redução dos níveis séricos de testosterona e aumento de estradiol na prole masculina (Santos et al., 2004; Zambrano et al., 2005; Rinaldi et al., 2013; Colombelli et al., 2017; Santos et al., 2019). Além da redução de peso do testículo, epidídimo e próstata (Santos et al., 2004; Rinaldi et al. 2013), aumento do estresse oxidativo no testículo e epidídimo (Toledo et al., 2011; Rodrigues-Gonzales et al., 2012), diminuição da expressão de receptores de andrógenos, quantidade de células de Sertoli e na qualidade espermática no testículo (Rodrigues-Gonzales et al., 2012; Toledo et al., 2011), atraso do desenvolvimento do epidídimo assim como alteração do fluido dinâmico e na vasculogênese (Cavariani et al., 2019; Mello Santos, et al., 2019). Particularmente com a próstata, nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que RPM causa o atraso da morfogênese prostática com redução do processo de angiogênese durante o desenvolvimento (Colombelli et al., 2017); formação de carcinoma *in situ* em ratos envelhecidos (Santos et al., 2019); além de levar a alterações no perfil proteômico principalmente em vias relacionadas a fatores de crescimentos, sinalização de estrógeno e histonas tanto em ratos jovens quanto em animais velhos (Santos et al., 2020), estes animais ainda apresentaram aumento de estresse oxidativo, descrito por Portela et al. 2021.

Estudos evidenciam que além dos impactos na prole da má nutrição materna, uma dieta altamente industrializada, por exemplo, rica em calorias, ácidos graxos, gorduras saturadas, colesterol ou com alta quantidade de açúcares de adição pela prole na vida pós-natal podem potencialmente causar alterações no sistema genital masculino afetando a reprodução (Ruff et al., 2013; Salas- Huetos et al., 2017). Ruff e colaboradores (2013) descreveram que camundongos machos submetidos a uma dieta contendo 25% das calorias oriundas de uma mistura de frutose e glicose, que é uma concentração de açúcares de adição considerada relevante para o consumo humano, produziu uma prole 25% menor. Nos últimos anos tem aumentado o consumo de uma dieta ultra processados, hipercalórica e poucos nutritiva, assim como de bebidas adoçadas artificialmente com “açúcares de adição” (Dearden; Ozanne, 2014; Malik; Hu, 2015; Yarmolinsky et al., 2016). Este aumento associado juntamente com os hábitos de vida sedentários resultou em maior incidência de SM, em especial a obesidade, que atualmente afetam pelo menos 25% dos adultos no mundo (Calle; Kaaks, 2004; Giovannucci, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) este aumento de SMs são importantes fatores de risco para alguns tipos de cânceres, em especial para o câncer de próstata, que é o segundo tipo câncer que mais acomete os homens no mundo (The lancet, 2018; Ferlay et al., 2019).

Em conjunto pode se dizer que tanto condições nutricionais maternas e ao longo da vida são essenciais para o desenvolvimento e funcionalidade dos órgãos reprodutivos. Uma vez que

tanto a RPM na gestação e a lactação e a má alimentação podem proporcionar alterações no âmbito reprodutivo. Com tudo, nossa hipótese de que indivíduos submetidos a restrição proteica materna durante o período intrauterino, e que consumiram açúcar durante as fases iniciais de desenvolvimento, podem ter os aspectos reprodutivos alterados. Este capítulo apresenta dados morfológicos, moleculares e de contagem espermática dos órgãos reprodutivos à resposta da exposição da RPM com o consumo de açúcar na vida pós-natal na próstata, testículo e epidídimo de ratos jovens.

2 Material e métodos

Foram utilizados ratos adultos, da linhagem *Sprague Dawley* machos e fêmeas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Os animais e suas proles foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia, em caixas de polietileno, dois animais por caixa, com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de luminosidade (12 horas de fotoperíodo) e temperatura entre 22°C e 25°C, sendo fornecida água filtrada e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu (CEUA-951) (Anexo I).

Após ser constatada a prenhez das ratas fêmeas no dia gestacional (DG) 0 foram separadas inicialmente em dois grupos: Grupo Controle (CTR) (n= 10 por grupo) que recebeu ração normoproteica (17% de proteína) e Grupo restrição proteica gestacional e lactacional (RPGL) (n= 10 por grupo) que recebeu ração hipoproteica (6% de proteína) durante os períodos de gestação e lactação (Tabela S.1). Ambas as dietas são isocalóricas e normosódicas e foram fornecidas pela empresa PragSoluções (PragSoluções, SP, Brasil, Reeves et al., 1993) (Tabela S1) e foram usadas em estudos anteriores (Santos et al., 2019; 2020; Colombelli et al., 2017). A energia metabolizável foi calculada usando os seguintes valores dos fatores metabólicos: proteína- 4,0 kcal/g (16,76 kJ/g); gordura- 9,0 kcal/g (37,71 kJ/g) e carboidrato digerido- 4,0 kcal/g (16,76 kJ/g) (Sadowska; Rygielska, 2019). O consumo de ração e o peso corpóreo das mães foram mensurados do DG 3 até o DG 21.

Ao nascimento, no dia pós-natal (DPN) 1 os filhotes foram pesados e a prole foi reduzida para 8 filhotes (4 machos: 4 fêmeas) para maximizar a oferta de nutrientes durante a lactação (Fischbeck; Rasmussen, 1987). No desmame no DPN 21, todos os animais passaram a receber ração normoproteica e os animais machos foram separados em 4 grupos experimentais: Grupo

Controle (CTR) que recebeu água normal durante todo o período experimental; Grupo CTR+açúcar (CTR+AÇÚ) que recebeu açúcar refinado diluído a 10% na água a partir do DPN 21 até o DPN 90; grupo Restrição Proteica Gestacional Lactacional (RPGL) que recebeu água normal durante todo o período experimental e o grupo RPGL+AÇÚ que recebeu o açúcar diluído a 10% na água a partir do DPN 21 até DPN 90 (Figura 1). Durante todo este período foram mensurados semanalmente o consumo de ração, ingestão de água e peso corpóreo. Foi escolhido o açúcar refinado por ser o tipo mais consumido e de fácil acesso da população. A concentração de 10% de sacarose foi escolhida a partir de dados publicados por Kendig et al., (2015) que demonstraram que a prole masculina de ratas submetidas ao consumo de sacarose a uma concentração de 10% quando expostas na vida adulta à mesma concentração de açúcar com ou sem atividade física apresentaram aumento da sensibilidade à insulina produzida pelo exercício se comparada ao grupo controle, além de maiores níveis de glicemia em jejum em animais nascidos de mães que consumiram açúcar na gestação comparada aos animais provenientes de gestação normal. Durante todo este período foram mensurados semanalmente o consumo de comida, a ingestão de água e o peso corpóreo.

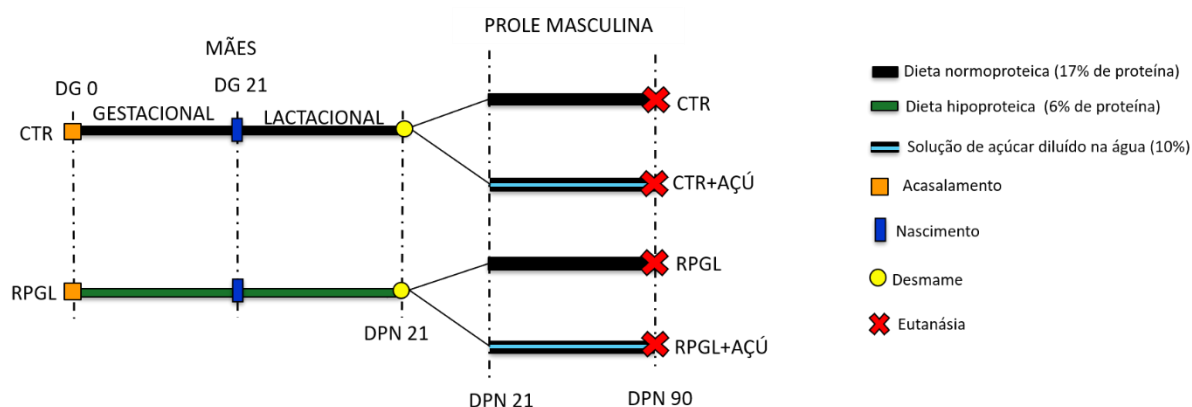


Figura 1. Delineamento experimental. CTR- Grupo controle; CTR+AÇÚ- controle+açúcar; DG- dia gestacional; DPN- dia Pós-natal (DPN); RPGL- restrição proteica gestacional e lactacional; RPGL+AÇÚ- restrição proteica gestacional e lactacional + açúcar.

No DPN 90, os animais machos foram anestesiados via intraperitoneal com o uso combinado de anestésico geral ketamina (0.0075 mg/kg na concentração de 0,1 mg/ml) e relaxante muscular xilazina (0.0025 mL/kg na concentração de 0,02 g/ml). Amostras sanguíneas foram coletadas pela ruptura cervical dos vasos para análises bioquímicas e hormonais e os lobos prostáticos ventrais, os testículos e os epidídimos foram coletados e processados para diferentes técnicas que estão descritas abaixo.

2.1 Análises morfológicas

Após a coleta e a pesagem dos órgãos, os testículos, epidídimos e os lobos prostáticos ventrais foram fixados em *Methacarn* (Puchtler et al., 1970). Após a fixação, o material foi desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO). Os cortes foram produzidos em micrótomo rotativo com 5µm de espessura, coletados em lâminas silanizadas e corados pela hematoxilina-eosina (HE) para a análise geral da estrutura glandular e de análises histopatológicas. Outros foram armazenados para realização de reações imuno-histoquímicas.

As proporções relativas dos componentes dos órgãos (epitélio, estroma e lumem) foram determinadas pelas análises estereológicas (Weibel et al., 1966; Colombelli et al., 2017). Os resultados foram expressos como porcentagem de cada componente e proporção da área total analisada.

2.2 Reações de imuno-histoquímica

Cortes histológicos foram desparafinizados e foram submetidos a recuperação antigênica por 30 minutos na panela de pressão com tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0. Em seguida as lâminas foram submersas em uma solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas por 10 minutos no escuro, a interação de proteína-proteína não inespecífica foi bloqueada com solução de leite desnatado a 3% diluído em PBS e incubados com anticorpo primário específico *overnight* a 4°C. Os cortes foram lavados com PBS e incubados por 2 horas a temperatura ambiente com anticorpo secundário específico conjugado com *Horseadish peroxidase* (HRP) (ver Tabela Suplementar 2 para especificações dos anticorpos e diluições). A marcação foi revelada pela 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) e os cortes foram contra-corados pela hematoxilina. Os resultados foram analisados ao microscópio e fotodocumentados. Os cortes foram observados em microscópio Leica DMLB e as imagens foram digitalizadas em analisador de imagens no software Leica Q-win versão 3.1 para Windows TM (Colombelli et al., 2017).

O índice de proliferação foi determinado pela contagem dos núcleos imunomarcados positivos por Ki67 de 10 campos microscópicos em objetiva de 40x da próstata ventral de 6 animais de cada grupo experimental (aproximadamente 7.000 núcleos). A proporção de células marcadas foi expressa em relação ao número total de células contadas.

2.3 Expressão proteica por *Western blotting*

As análises de *Western blotting* foram realizadas de acordo com Santos et al. (2019). Próstatas ventrais (n=8/grupo) foram homogeneizadas em tampão de extração RIPA (Pierce, Rockford, IL, USA) adicionado de inibidor de proteases e centrifugada, com a determinação da concentração de proteínas realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Alíquotas (70 µg de proteínas) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. As proteínas foram eletro transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, EUA), foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em PBS por 2 horas à temperatura ambiente e então foram incubadas *overnight* 4° C com o anticorpo primário específico. Após a lavagem em PBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado-HRP específico para cada primário por 2 horas e novamente lavadas em PBS (Tabela Suplementar 2). O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular marcado com cores, Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que foi colocado junto na corrida eletroforética. A reação foi revelada pelo reagente ECL™ de detecção de anticorpo HRP quimioluminescente (Amersham™, UK). Os sinais do ECL foram capturados usando uma câmara CCD (Image Quant LAS4000 mini® -GE- Healthcare™). Posteriormente, foram realizadas análises semiquantitativas por densitometria das bandas, os valores de *Integrated Optical Densities* (IOD) das bandas alvos foram mensuradas no Image J software (Schneider et al., 2012). Os níveis de expressão foram normalizados pela β -actin e os resultados normalizados foram expressos em *Fold change* como média $\pm$ desvio padrão.

2.4 Contagens espermáticas testicular e epididimária

As contagens foram realizadas nos testículos e nos epidídimos (Cabeça/corpo e cauda) nos ratos dos diferentes grupos experimentais. A quantificação espermática testicular resistente a homogeneização (estágios 17-19 de espermiogênese) foi realizada conforme descrita por Robb et al. (1978). Primeiramente foi retirada a túnica albugínea dos testículos e estes foram homogeneizados em solução STM (0.9% NaCl, 0.05% Triton X-100) e sonificados. As amostras foram diluídas em uma diluição de 1:10 em solução STM, e as contagens foram realizadas em uma câmara Neubauer. A produção espermática diária (PED) foi calculada dividindo o número de espermátide resistente a homogeneização por 6,1 (o número de dias que estas células estão presente no epitélio do túbulo seminífero do rato) (Silva et al., 2018).

Para as contagens do epidídimo, a cabeça/corpo e cauda foram processadas como descritas anteriormente. As amostras foram diluídas de 1:20 e a contagem espermática e o PSD foi expresso como 106 células/g de tecido. O tempo de trânsito espermático foi expresso em dias, e foi calculado pela divisão da contagem espermática dentro de cada região do epidídimo pelo PSD (Silva et al., 2018).

2.5 Análises estatísticas

A estatística descritiva (média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo) para as variáveis contínuas dos parâmetros biométricos que foram coletadas dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) no DPN 90 foram calculadas a partir de ajustes de modelos lineares generalizados (MLG) usando a distribuição Gamma, que tem maior flexibilidade de ajuste para dados com distribuição amostral assimétrica. As diferenças entre os grupos foram testadas pelas comparações múltiplas usando o teste de *Tukey-Kramer* ao nível de significância de $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas no Software estatístico SAS (version 9.3, Statistical Analysis Systems, SAS Institute, Inc. Cary, NC), e para os ajustes de modelos, foi usado o procedimento GENMOD, que analisou as variáveis contínuas pelas médias de ajustes MLG, considerando a distribuição Gamma (Madsen, 2011).

As demais análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma (versão 8.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA). Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Os dados de contagens espermática testicular e epididimária que não tiveram distribuição normal foram transformados em valores de log antes de ser realizada a estatística paramétrica. Para os dados que assumiram uma distribuição normal foi realizada análise de variância - ANOVA, com teste “*a posteriori*” de *Bonferroni*, para os dados não paramétricos foi feito o teste de *Kruskal-Wallis*, com teste “*a posteriori*” de *Dunn*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Restrição proteica maternal e o consumo pós-natal de açúcar causam redução do peso corpóreo e redução do peso dos testículos e epidídimos

A RPM causou a redução do peso corpóreo nos animais dos grupos restritos (RPGL e RPGL+AÇÚ) em relação ao grupo controle (CTR) desde o desmame (DPN 21) até o DPN 90 (Tabela 01). Nota-se que o consumo do açúcar não foi o suficiente para causar o impacto para

que ocorresse o aumento do peso corpóreo, uma vez que o grupo RPGL+AÇÚ também apresentou uma redução significativa no peso corpóreo em comparação ao grupo CTR+AÇÚ. Nosso grupo vem demonstrando que a RPM reduz consideravelmente o peso corpóreo dos animais desde o nascimento até o DPN 30 (Pinho et al., 2014; Rinaldi et al., 2013; Colombelli et al., 2017) (Colombelli et al., 2017; Santos et al., 2018). Rinaldi et al. (2013) descreveram que ratos submetidos a RPM no DPN 120 não apresentam mais diferença estatística no peso corpóreo, o que nos mostra que os nossos animais com 90 dias possivelmente ainda não atingiram o pico do “*catch-up growth*” pós-natal, que é um crescimento acelerado normalmente associado a animais que foram submetidos a RPM ou que apresentam baixo peso ao nascimento (Chen et al., 2009).

Em relação a distância ano-genital (DAG) não se observou alterações significativas entre os grupos experimentais no DPN 90 (Tabela 01). Sabe-se que a DAG reflete a exposição de andrógenos fetais especialmente durante o período chamado de “*masculinization programming window*” que ocorre em roedores por volta dos dias 15,5 – 18,5 embrionário. A ação do andrógeno durante este período determina o potencial máximo de crescimento dos órgãos dependentes de andrógenos (próstata, testículo, epidídimo) (Welsh et al., 2008; Mitchell et al., 2015; Sharpe, 2020). Sabe-se que a RPM causa uma diminuição de andrógeno no início da vida que persiste até o DPN 30, portanto este resultado no DPN 90 nos indica que os níveis hormonais de andrógeno possivelmente já estejam normalizados (Rinaldi et al., 2013; Colombelli et al., 2017).

Tabela 1. Parâmetros biométricos dos animais no dia pós-natal (DPN) 90.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	CTR	CTR+AÇÚ	RPGL	RPGL+AÇÚ
Peso Corpóreo no DPN 21 (g)	49.50 ± 1.42	52.05 ± 1.26	19.35 ± 0.66 *	18.90 ± 0.59 *#
Peso Corpóreo Final no DPN 90 (g)	420.20 ± 11.32	402.80 ± 10.31	327.20 ± 7.91 *	294.40 ± 8.98 *#
Distância Ano-genital (DAG) (mm)	31.14 ± 6.19	30.44 ± 7.62	28.97 ± 6.49	25.05 ± 3.42
Próstata ventral (PV) (mg)	0.39 ± 0.12	0.38 ± 0.12	0.33 ± 0.08	0.33 ± 0.05
PV relativa	0.97 ± 0.30	0.91 ± 0.28	1.00 ± 0.20	1.15 ± 0.23
Epidídimo (g)	1.24 ± 0.14	1.11 ± 0.19	0.99 ± 0.06	0.97 ± 0.08 *
Epidídimo relativo	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.05
Testículo (g)	3.52 ± 0.41	3.39 ± 0.22 *	2.88 ± 0.20 *	2.71 ± 0.37 *#
Testículo relativo	0.88 ± 0.10	0.85 ± 0.10	0.86 ± 0.07	0.86 ± 0.11

Dados são expressos como média ± DP. ¹ Dados são expressos com mediana ± EPM. * Demonstram diferença estatística dos diferentes grupos experimentais (CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) quando comparados com o grupo controle quando p<0.05. # Representa diferença estatística entre os grupos CTR+AÇÚ e RPGL+AÇÚ quando p<0.05. CTR- grupo Controle; CTR+AÇÚ- grupo Controle+açúcar; DAG- Distância ano-genital; DPN- Dia pós-natal; PV- Próstata Ventral; RPGL- grupo Restrição Proteica Gestacional e Lactacional; RPGL+AÇÚ- grupo Restrição Proteica Gestacional e Lactacional+Açúcar.

Quanto ao peso dos órgãos reprodutivos, o testículo apresentou uma redução significativa em todos os grupos tratados (CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) em relação ao grupo CTR, e redução no RPGL+AÇÚ em relação ao CTR+AÇÚ. Não sendo visualizada diferença significativa no peso relativo. O epidídimo teve diminuição significativa apenas no grupo RPGL+AÇÚ em comparação ao grupo CTR. Enquanto a PV não teve diferença significativa tanto no peso absoluto quanto no relativo (Tabela 01). Nota-se que a RPM durante os períodos de gestação e lactação juntamente com o consumo de açúcar pós-natal potencializa ainda mais a redução do peso dos órgãos. Uma vez que a literatura já nos traz que a somente a RPM reduz o peso do testículo, epidídimo e próstata (Santos et al., 2004; Rinaldi et al. 2013; Ajuogu et al., 2021). Já para o consumo de açúcar, León-Ramírez et al. (2021) descreveram que o consumo do açúcar em uma concentração maior (30%) por um período menor (30 dias) causa um aumento do peso do testículo, resultados que não foram visualizados no nosso trabalho pela concentração menor de 10% de açúcar e o tempo o qual foi administrado, por 69 dias.

3.2 RPM e o consumo de açúcar pós-natal altera a morfologia prostática e do epidídimo

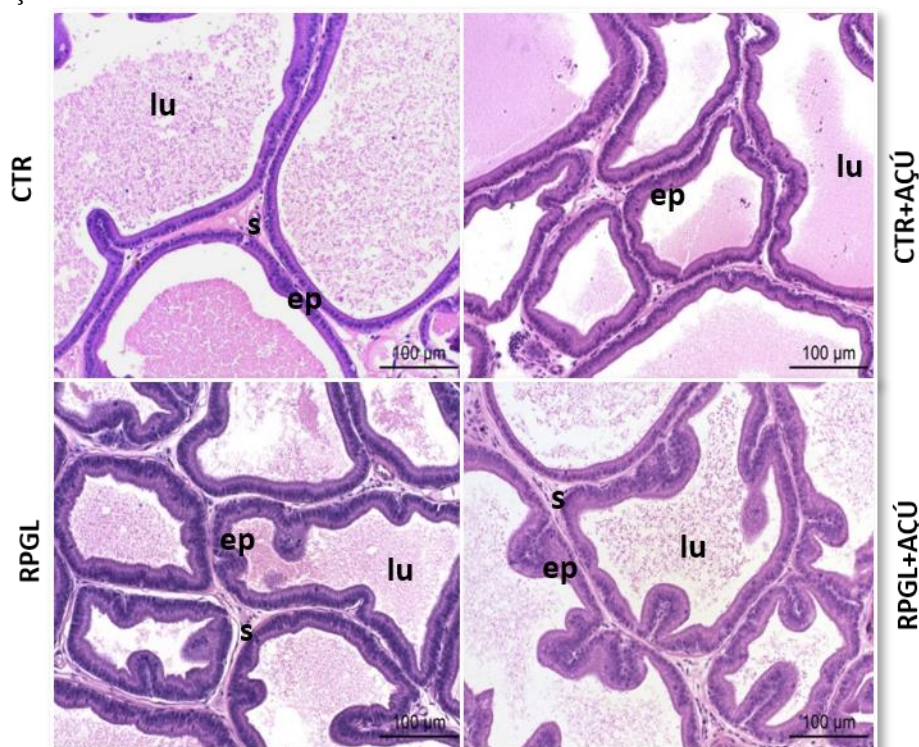
Observou-se alterações na frequência dos compartimentos glandulares em todos os grupos experimentais, CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ apresentaram aumento do compartimento epitelial e diminuição dos ácinos e do compartimento luminal em relação ao grupo CTR (Tabela 02). Estas alterações nestes compartimentos resultaram em aumento significativo da fração glandular em todos os grupos experimentais. O epitélio apresentou um aumento de pregas e da altura das células epiteliais nos grupos RPGL e RPGL+AÇÚ, adicionalmente os mesmos grupos apresentaram aumento do compartimento estromal em relação ao grupo CTR (Figura 2). Esse aumento de pregas visualizados nos grupos que consumiram o açúcar foram visualizados por Ribeiro et al. (2012) com ratos com 6 meses de idade com obesidade induzida pelo consumo da dieta rica em gordura.

Tabela 2. Parâmetros estereológicos morfológicos da próstata ventral dos diferentes grupos experimentais.

Frequência relativa dos compartimentos da PV (%)	Grupos Experimentais			
	CTR	CTR+AÇÚ	RPGL	RPGL+AÇÚ
Epitélio ¹	19.05 ± 0.87	25.00 ± 1.55*	31.55 ± 1.25*	29.17 ± 1.12*
Lumem	67.02 ± 8.53	56.63 ± 13.55*	50.10 ± 13.75*	51.38 ± 13.70*
Estroma ¹	11.90 ± 0.72	16.07 ± 0.74	16.96 ± 0.91*	15.48 ± 1.05*
Fração Glandular ¹	88.10 ± 0.72	83.33 ± 1.28*	83.04 ± 0.91*	84.52 ± 1.05*
Altura do epitélio (µm)	8.77 ± 1.08	10.23 ± 1.15	11.00 ± 0.82*	11.05 ± 0.80*

Dados são expressos como média ± DP. ¹ Dados são expressos com mediana ± EPM. * Demonstram diferença estatística dos diferentes grupos experimentais (CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) quando comparados com o

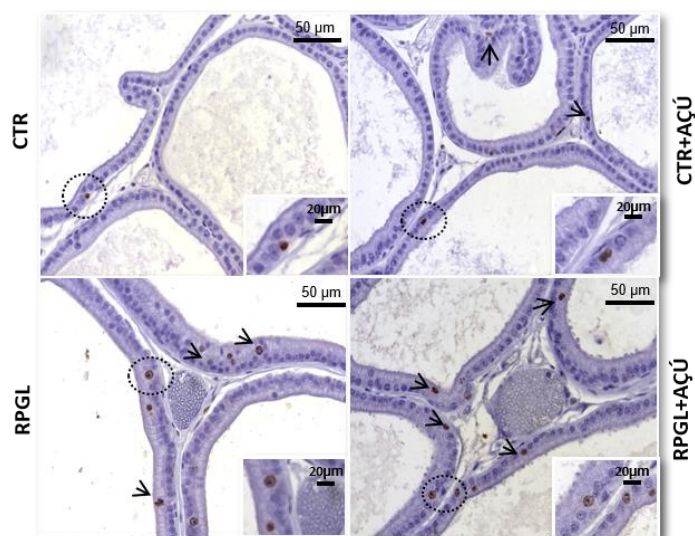
301 grupo controle quando $p < 0.05$. CTR- grupo Controle; CTR+AÇÚ- grupo Controle+açúcar; PV- Próstata Ventral;
 302 RPGL- grupo Restrição Proteica Gestacional e Lactacional; RPGL+AÇÚ- grupo Restrição Proteica Gestacional e
 303 Lactacional+Açúcar.



304 **Figura 2. Imagens representativas da próstata ventral (PV) dos diferentes grupos**
 305 **experimentais.** Grupo Controle (CTR), Grupo Controle+Açúcar (CTR+AÇÚ); Grupo RPGL
 306 (Restrição Proteica Gestacional e Lactacional) e Grupo Restrição Proteica Gestacional e
 307 Lactacional+Açúcar. (RPGL+AÇÚ). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento de 20x. Ep:
 308 Epitélio; S: Estroma; Lu: Lúmen.
 309

310
 311 A proliferação celular tecidual foi avaliada por imunomarcagem da proteína Ki67,
 312 somente o grupo RPGL teve aumento significativo (Figura 3). Rinaldi et al. (2013) demonstrou
 313 que os animais no DPN 120 não apresentam alteração na proliferação celular, o que nos indica
 314 que o desenvolvimento da glândula no DPN 90, em especial nos animais submetidos a RPM, está
 315 possivelmente atrasado.

A-



B-

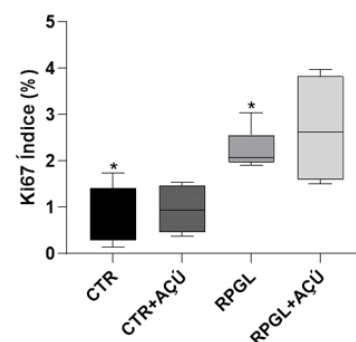
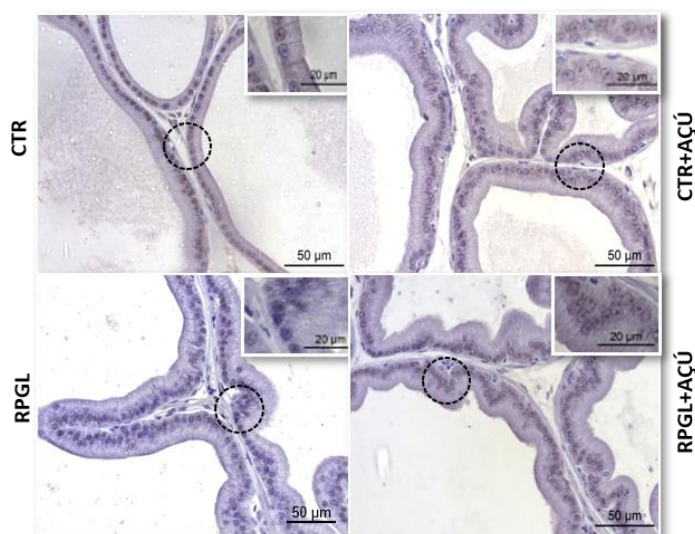


Figura 3. Imagens representativas de imunomarcção para proliferao celular por Ki67 e anlise de ndice proliferativo da prstata ventral no dia ps-natal 90. A- Imagens representativas para a imunomarcção de proliferao celular, Ki67. As setas e os crculos pontilhados mostram a imunomarcção das clulas que esto proliferando. Aumento de 40x. Imagem menores: Aumento de 100x. B- Quantificao do ndice de proliferao celular nos diferentes grupos experimentais. *Demonstra diferenas estatsticas entre RPGL e o grupo CTR quando $p < 0,05$. CTR- Controle; CTR+ AÇÚ- Controle+aoar; RPGL- Restrio Proteica Gestacional e Lactacional; RPGL+AÇÚ- Restrio Proteica Gestacional e Lactacional + Aoar.

Em relao aos parmetros funcionais, visualmente no tivemos alterao na imunomarcção para receptor de andrgeno (AR) e para a expresso proteica de prostateína (Figura 4- A e B, respectivamente). A prostateína é a principal proteína produzida e secretada no fluido seminal da PV de ratos (Maccioni et al., 2003; Chen et al., 2014; Heyns et al., 2015), esta é composta por um tetrmero com duas subunidades: a subunidade A que contm os polipeptídios C1 e C3 e a subunidade B que contm a C2 e C3. Os polipeptídios C2 e C3 foram descritas como ligantes de andrgenos, com funo importante na regulao e disponibilidade de andrgenos na prstata (Heyns et al., 2014; Chen et al., 2014). Rinaldi e colaboradores (2013) no visualizou alterao na expresso proteica de AR em animais no DPN 120 que foram submetidos a restrio proteica materna, apesar de no apresentarmos a anlise de expresso proteica de AR para os animais no DPN 90 podemos ver pela imunomarcção que visualmente no tivemos alterao neste parmetro o que diretamente pode estar relacionada com a no alterao visualizada na prostateína.

A-



B-

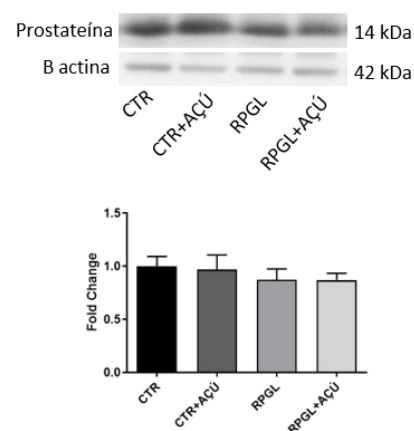
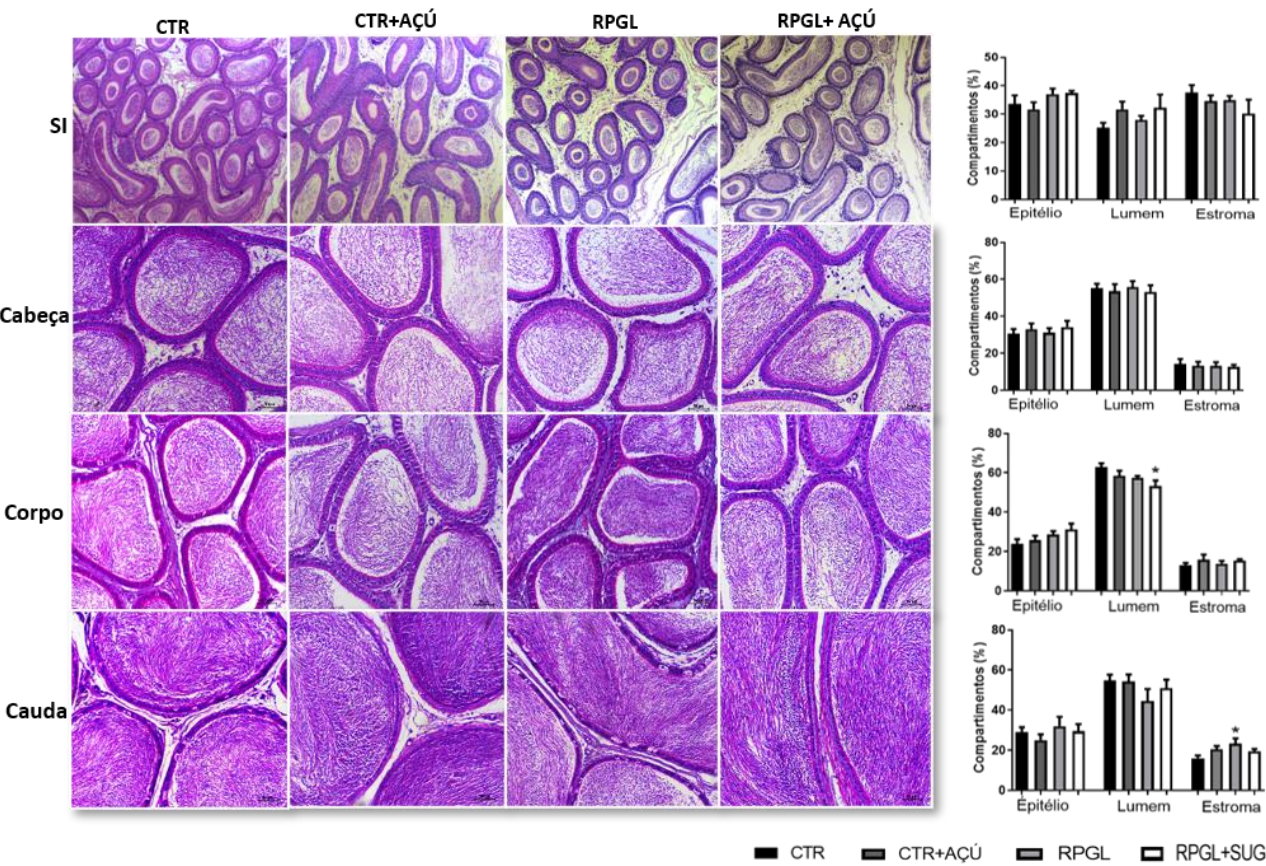


Figura- 4. Imagens representativas de imunomarcação para receptor de andrógeno (AR) e análise de expressão de prostateína por Western blotting. na próstata ventral no dia pós-natal 90. A-Imagem representativa para imunomarcação do receptor de andrógeno (AR). Círculos tracejados indicam áreas imunomarcadas para receptor de andrógeno. Aumento de 40x. Imagem menores: Aumento de 100x. B- Imagem representativa da expressão proteica de Prostateína na próstata ventral nos animais no DPN 90. CTR- Controle; CTR+ AÇÚ- Controle+açúcar; RPGL- Restrição Proteica Gestacional e Lactacional.; RPGL+AÇÚ- Restrição Proteica Gestacional e Lactacional + Açúcar.

O segmento inicial do epidídimo apresentou uma diminuição significativa do diâmetro do túbulo e da luz no grupo RPGL+AÇÚ em relação ao grupo CTR+AÇÚ. Na região da cabeça foi observado um aumento do diâmetro do lumem e diminuição da altura do epitélio no grupo RPGL+AÇÚ em relação ao grupo CTR+AÇÚ; e uma diminuição no diâmetro do lúmen e aumento da altura do epitélio no grupo CTR+AÇÚ em relação ao grupo CTR. Já na região de corpo tivemos apenas diminuição significativa do compartimento luminal no grupo RPGL+AÇÚ em relação ao grupo CTR. Na região da cauda houve aumento do compartimento estromal no grupo RPGL em relação ao grupo CTR, além de uma diminuição significativa na altura do epitélio em todos os grupos tratados (CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) em relação ao grupo CTR.

A partir da redução do peso do epidídimo, visualizada principalmente nos grupos restritos, e das alterações estereológicas pode se perceber que este órgão também é afetado pelas condições adversas materna. Estes resultados corroboram com os de Mello Santos et al., 2019 e Cavariani et al., 2019 que observaram atraso no desenvolvimento do epidídimo em diferentes idades pós-natais em ratos que sofreram restrição proteica materna gestacional e lactacional. Estes autores também observaram que a restrição proteica materna alterou a dinâmica de reabsorção do fluido e a vasculogênese do órgão, através da alteração de proteínas importantes para esse mecanismo, como aquaporina (AQP) 1, AQP9 e Fator de Crescimento do Endotélio

369 Vascular (VEGF), mostrando que a restrição proteica causa alteração na função epididimária em
370 ratos.



371
372 **Figura- 5. Imagens representativa coradas em hematoxilina-eosina e análise morfométrica dos segmento**
373 **inicial, cabeça, corpo e cauda dos epidídimos dos diferentes grupos experimentais. *** Demonstram diferença
374 estatística dos diferentes grupos experimentais (CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) quando comparados com o
375 grupo controle quando $p < 0.05$. CTR- grupo Controle; CTR+AÇÚ- grupo Controle+açúcar; DPN- Dia pós-natal;
376 RPGL- grupo Restrição Proteica Gestacional e Lactacional; RPGL+AÇÚ- grupo Restrição Proteica Gestacional e
377 Lactacional+Açúcar. Aumento de 100x.

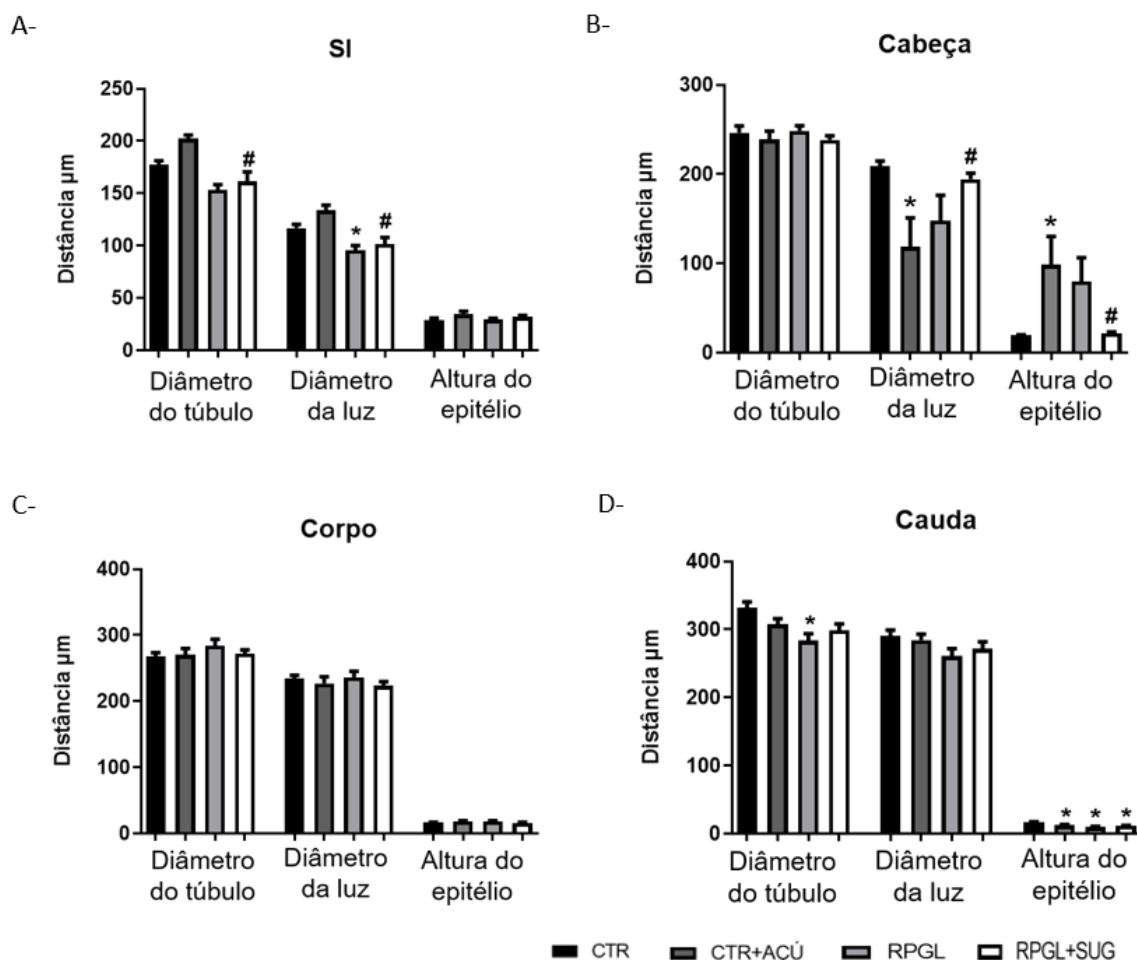


Figura 6. Imagens representativas das análises de diâmetro de túbulo, diâmetro do lumem e altura do epitélio nos segmento inicial, cabeça, corpo e cauda dos diferentes grupos experimentais no dia pósnatal 90. * Demonstram diferença estatística dos diferentes grupos experimentais (CTR+AÇÚ, RPGL e RPGL+AÇÚ) quando comparados com o grupo controle quando $p < 0.05$. # Representa diferença estatística entre os grupos CTR+AÇÚ e RPGL+AÇÚ quando $p < 0.05$. CTR- grupo Controle; CTR+AÇÚ- grupo Controle+açúcar; DPN- Dia pós-natal; RPGL- grupo Restrição Proteica Gestacional e Lactacional; RPGL+AÇÚ- grupo Restrição Proteica Gestacional e Lactacional+Açúcar.

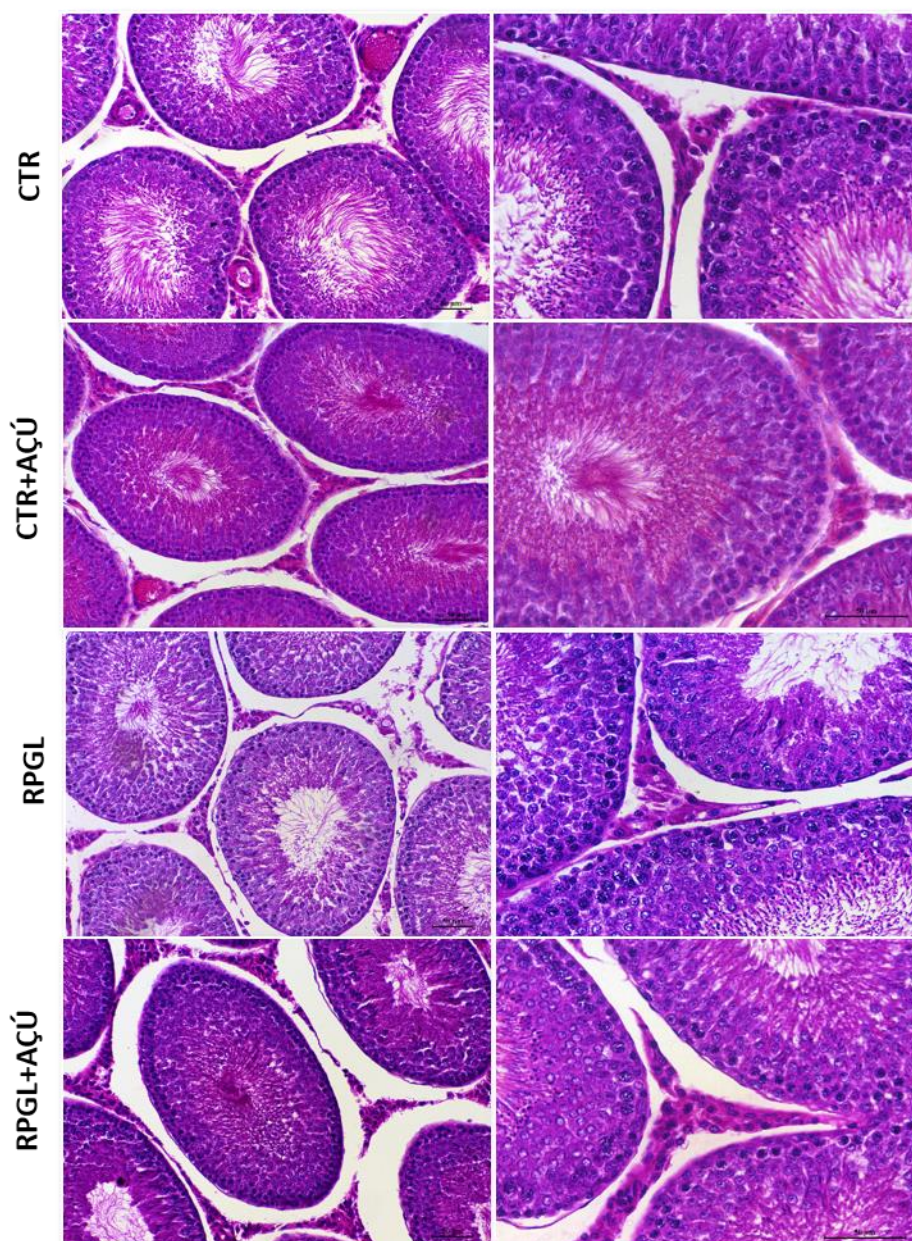
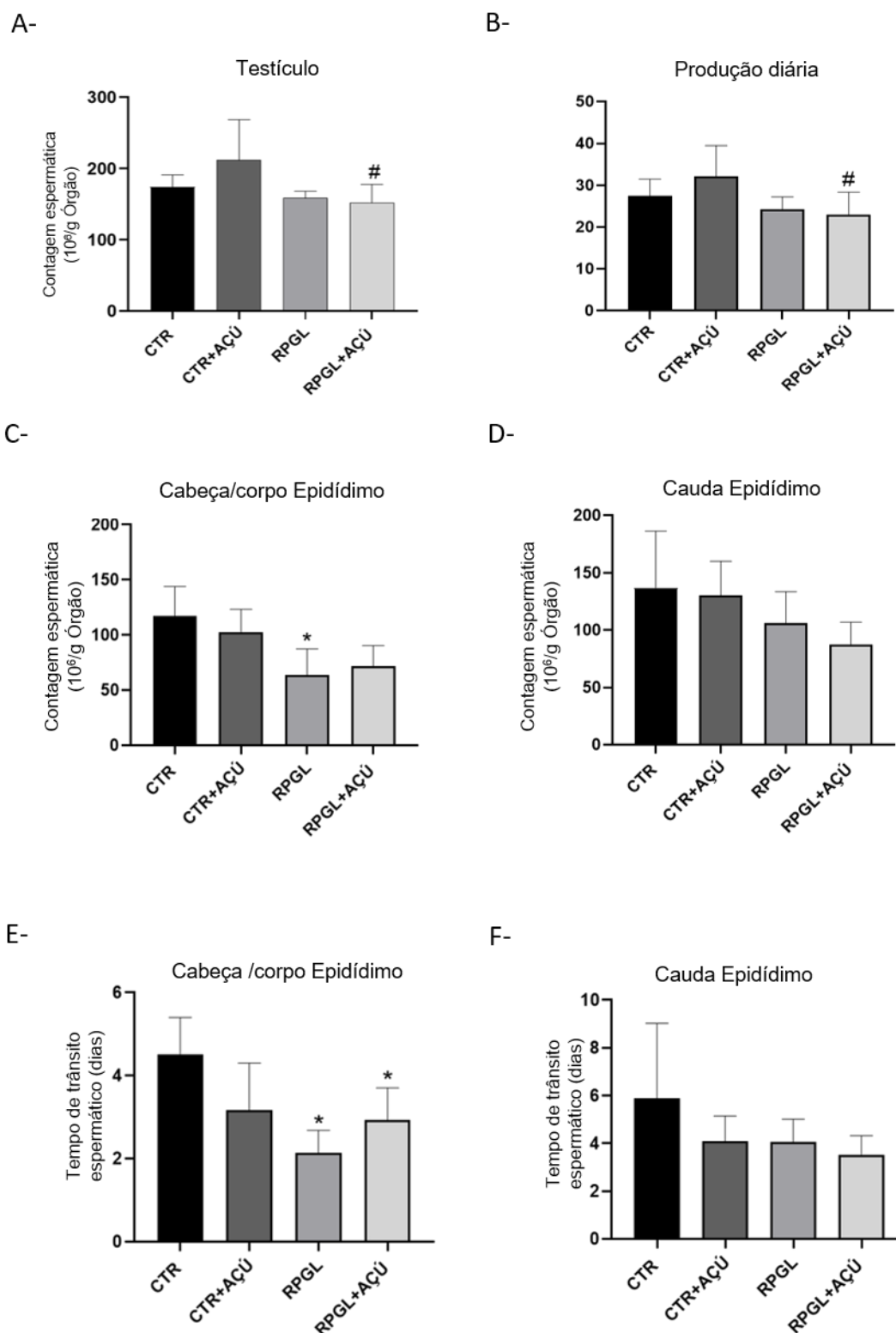


Figura 7. Imagem representativa corada em hematoxilina-eosina dos testículos dos diferentes grupos experimentais. CTR- Controle; CTR+ AÇÚ- Controle+açúcar; RPGL- Restrição Proteica Gestacional e Lactacional.; RPGL+AÇÚ- Restrição Proteica Gestacional e Lactacional + Açúcar. Aumento de 20x e 40x.

3.3 A RPM o consumo de açúcares pós-natal afeta a quantidade e a produção diária de espermatozoide e o tempo de trânsito em regiões específicas

Os animais do grupo RPGL+AÇÚ tiveram uma redução significativa em relação ao grupo CTR+AÇÚ na contagem espermática e na produção diária de espermatozoides (Figura 07-A e B). Nota se que no epidídimo no segmento da cabeça tivemos uma redução na contagem espermática somente no grupo RPGL e um menor tempo de trânsito dos espermatozoides nos grupos RPGL e RPGL+AÇÚ, ambos em relação ao grupo CTR. Já no segmento da cauda para os mesmos parâmetros não tivemos alterações significativas (Figura 07- C e D). Resultados semelhantes já foram descritos pela literatura tanto com a RPM durante a gestação e lactação e

401 pelo consumo de açúcares a uma concentração de 30% de açúcar (Zambrano et al., 2005; Ajuogu
402 et al., 2021; León-Ramírez et al., 2021).



403
404 **Figura 8. Imagens representativas dos parâmetros espermáticos dos testículos e epidídimos** A- Contagem
405 espermática do testículo dos diferentes grupos experimentais. B- Tempo de produção diária dos espermatozoides. C
406 e D- Contagem espermática dos segmentos de cabeça e corpo (C) e cauda (D) do epidídimo. E e F- Tempo de trânsito
407 espermático dos segmentos de cabeça e corpo (E) e cauda (F) do epidídimo. *Significa diferença estatística entre os
408 grupos tratados (CTR+AÇÚ, RPGL ou RPGL+AÇÚ) em comparação ao grupo CTR quando $p < 0.05$. # Significa
409 diferença estatística entre o grupo CTR+AÇÚ em comparação ao RPGL+AÇÚ quando $p < 0.05$. CTR- Controle;

CTR+ AÇÚ- Controle+açúcar; RPGL- Restrição Proteica Gestacional e Lactacional.; RPGL+AÇÚ- Restrição Proteica Gestacional e Lactacional + Açúcar.

4. Conclusão

A partir destas análises parciais apresentadas pode se visualizar que a RPM nos períodos de gestação e lactação juntamente com o consumo de açúcar pós-natal afetam o morfofisiologia do testículo, próstata e epidídimo, o que podem levar a um possível desencadeamento da infertilidade.

Referências Bibliográficas

- AGARWAL, A. et al. **Male infertility**The LancetLancet Publishing Group, , 23 jan. 2021.
- AJUOGU, P. K. et al. A low protein maternal diet during gestation has negative effects on male fertility markers in rats – A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 157–166, 1 jan. 2021.
- BAUTISTA, C. J. et al. Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 2, p. 141–151, 28 jul. 2019.
- BERNARDIS, L. L. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee’s “nutritive ratio” in rats with hypothalamic obesity. **Experientia**, v. 26, n. 7, p. 789–90, 1970.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579–591, 2004.
- CARPINELLO, O. J.; DECHERNEY, A. H.; HILL, M. J. Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 36, n. 3–4, p. 177–182, 13 maio 2018.
- CAVARIANI, M. M. et al. Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019.
- CHEN, H.; NEMBARD, W. N.; STOCKWELL, H. G. Sex-Specific Effects of Fetal Exposure to the 1959–1961 Chinese Famine on Risk of Adult Hypertension. **Maternal and Child Health Journal**, v. 18, n. 3, p. 527–533, abr. 2014.
- CHEN, J. H. et al. Maternal protein restriction affects postnatal growth and the expression of key proteins involved in lifespan regulation in mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 24 mar. 2009.
- COLOMBELLI, K. T. et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and Comparative Endocrinology**, v. 246, 2017.
- DAVIES, M. J.; NORMAN, R. J. **Programming and reproductive functioning**Trends in Endocrinology and MetabolismTrends Endocrinol Metab, , nov. 2002.
- DE LEÓN-RAMÍREZ, Y. M. et al. Histomorphological testicular changes and decrease in the sperm count in pubertal rats induced by a high-sugar diet. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 235, p. 151678, 1 maio 2021.
- DEARDEN, L.; OZANNE, S. E. **The road between early growth and obesity: New twists and turns**American Journal of Clinical NutritionAmerican Society for Nutrition, , 1 jul. 2014.
- FERLAY, J. et al. **Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods**International Journal of CancerWiley-Liss Inc., , 15 abr. 2019.
- 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. **Journal of Nutrition**, v. 117, n. 11, p. 1967–1975, 1987.
- GIOVANNUCCI, E. Diabetes and Cancer: A Consensus Report Edward. **American Diabetes Association and the American Cancer Society**, v. 60, n. 1, p. 15, 2010.
- HEYNS, W. et al. Secretion of Prostatic Binding Protein by Rat Ventral Prostate: Influence of Age

- and Androgen*. v. 103, n. 4, p. 1090–1095, 2015.
- KENDIG, M. D. et al. Metabolic Effects of Access to Sucrose Drink in Female Rats and Transmission of Some Effects to Their Offspring. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131107, 2 jul. 2015.
- KUMAR, N.; SINGH, A. **Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature**Journal of Human Reproductive SciencesMedknow Publications, , 1 out. 2015.
- LEE, C. et al. Prostatic Ductal System in Rats: Regional Variation in Morphological and Functional Activities1. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 6, p. 1079–1086, 1990.
- MACCIONI, M.; CABEZAS, L. E.; RIVERO, V. E. Effect of Prostatein, the Major Protein Produced by the Rat Ventral Prostate, on Phagocytic Cell Functions. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, n. 6, p. 473–480, dez. 2003.
- MADSEN, H. , T. P. **Introduction to General and Generalized Linear Models**. 1. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- MALIK, V. S.; HU, F. B. **Fructose and Cardiometabolic Health What the Evidence from Sugar-Sweetened Beverages Tells Us**Journal of the American College of CardiologyElsevier USA, , 6 out. 2015.
- MARCINIAK, A. et al. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 133–138, 2017.
- MCKERRACHER, L. et al. Translating the Developmental Origins of Health and Disease concept to improve the nutritional environment for our next generations: a call for a reflexive, positive, multi-level approach. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 10, n. 4, p. 420–428, 1 ago. 2019.
- MELLO SANTOS, T. et al. Maternal Protein Restriction Modulates Angiogenesis and AQP9 Expression Leading to a Delay in Postnatal Epididymal Development in Rat. **Cells**, v. 8, n. 9, 17 set. 2019.
- MERICQ, V. et al. Long-term metabolic risk among children born premature or small for gestational age. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 50–62, jan. 2017.
- MITCHELL, R. T. et al. Anogenital distance plasticity in adulthood: Implications for its use as a biomarker of fetal androgen action. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 24–31, 1 jan. 2015.
- NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 2007.
- OZANNE, S. E. **Epigenetics and metabolism in 2014: Metabolic programming-knowns, unknowns and possibilities**Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, fev. 2015.
- PORTELA, L. M. et al. Increased oxidative stress and cancer biomarkers in the ventral prostate of older rats submitted to maternal malnutrition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 523, 1 mar. 2021.
- PUCHTLER, H. et al. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation - Practical and theoretical considerations. **Histochemie**, v. 21, n. 2, p. 97–116, 1970.
- RAHBAN, R.; NEF, S. **Regional difference in semen quality of young men: a review on the implication of environmental and lifestyle factors during fetal life and adulthood**Basic and Clinical AndrologyBioMed Central Ltd, , 1 dez. 2020.
- RAKVAAG, E. et al. Effects of Different Fasting Durations on Glucose and Lipid Metabolism in Sprague Dawley Rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 51, n. 8, p. 546–553, 2019.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet | The Journal of Nutrition | Oxford Academic. **The Journal of**

- Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.
- RHIND, S. M.; RAE, M. T.; NIGEL BROOKS, A. **Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis** *Reproduction* Journals of Reproduction and Fertility Ltd, , 2001.
- RIBEIRO, D. L. et al. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 577–588, 2 jun. 2012.
- RINALDI, J. C. et al. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v. 92, n. 13, p. 763–774, 19 abr. 2013.
- ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103–107, 1978.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L. et al. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 3, n. 05, p. 321–326, out. 2012.
- RUFF, J. S. et al. Human-relevant levels of added sugar consumption increase female mortality and lower male fitness in mice. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 13 ago. 2013.
- RUTKOWSKA, J. et al. Mapping the past, present and future research landscape of paternal effects. **BMC Biology**, v. 18, n. 1, 1 dez. 2020.
- SABRA, M. S.; M; AL-HARBI, M. S. An Influential Relationship of Seminal Fluid Microbial Infections and Infertility, Taif Region, KSA. **World Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 32–37, 2014.
- SADOWSKA, J.; RYGIELSKA, M. The effect of high fructose corn syrup on the plasma insulin and leptin concentration, body weight gain and fat accumulation in rat. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 28, n. 7, p. 879–884, 2019.
- SALAS-HUETOS, A.; BULLÓ, M.; SALAS-SALVADÓ, J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: A systematic review of observational studies. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 4, p. 371–389, 1 jul. 2017.
- SANTOS, A. M. DE S. et al. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 36, n. 1, p. 27–33, jan. 2004.
- SANTOS, S. A. et al. Identification of potential molecular pathways involved in prostate carcinogenesis in offspring exposed to maternal malnutrition. **Aging**, v. 12, n. 20, p. 19954–19978, 1 jan. 2020.
- SANTOS, S. A. A. et al. Maternal low-protein diet impairs prostate growth in young rat offspring and induces prostate carcinogenesis with aging. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 74, n. 6, 2019.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis** *Nature Methods* Nature Publishing Group, , 28 jul. 2012.
- SCHULZ, L. C. **The Dutch hunger winter and the developmental origins of health and disease** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* National Academy of Sciences, , 28 set. 2010.
- SHARPE, R. M. **Androgens and the masculinization programming window: human–rodent differences** *Biochemical Society Transactions* Portland Press Ltd, , 1 ago. 2020.
- SILVA, E. J. R. et al. Lipopolysaccharide and lipotheicoic acid differentially modulate epididymal cytokine and chemokine profiles and sperm parameters in experimental acute epididymitis.

- Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- THE LANCET. **GLOBOCAN 2018: counting the toll of cancer**The LancetLancet Publishing Group, , 22 set. 2018.
- TOLEDO, F. C. et al. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 9, n. 1, p. 94, jun. 2011.
- VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. **The role of the prostate in male fertility, health and disease**Nature Reviews UrologyNature Publishing Group, , 1 jul. 2016.
- WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of cell biology**, v. 30, n. 1, p. 23–38, 1966.
- WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1479–90, abr. 2008.
- YARMOLINSKY, J. et al. Artificially Sweetened Beverage Consumption Is Positively Associated with Newly Diagnosed Diabetes in Normal-Weight but Not in Overweight or Obese Brazilian Adults. **The Journal of Nutrition**, v. 146, n. 2, p. 290–297, 2016.
- ZAMBRANO, E. et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **The Journal of Physiology**, v. 563, n. 1, p. 275–284, fev. 2005.

Informação Suplementar:

Tabela Suplementar 1. Composição das dietas normoproteica (AIN-76A) e hipoproteica (AIN-93).

Ingredientes (g/Kg)	Normoproteica (17% de proteína)	Hipoproteica (6% de proteína) ^a
Amido	397	480
Caseína (84% proteína)	202	71,5
Dextrina (90-94%)	130,5	159
Sacarose	100	121
Óleo de Soja	70	70
Fibras	50	50 ^b
Mistura de sais AIN93G ^c	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G ^c	10	10
L-Cistina	3	1
Bitartarato de colina	2.5	2.5
Energia metabólica (Kcal/g ⁻¹)	3.96	3.96

^a A dieta hipoproteica foi preparada pela PragSoluções (PragSoluções,SP, Brasil). Dieta foi suplementada com L-Cistina como aminoácido sulfúrico.

^b Mistura de vitaminas e minerais foram formuladas pelo Instituto Americano de Nutrição AIN-93G recomendado para dieta de roedores (Reeves et al., 1993).

^c Fosfato de Potássio, monobásico, foi adicionado à mistura de sais desta dieta para manter o fósforo nos níveis encontrados na dieta de caseína controle (3g/kg da dieta) e a relação de cálcio: a taxa de fósforo foi mantida em 1.3 em ambas as dietas.

Tabela Suplementar 2. Anticorpos específicos usados para análises de imunohistoquímica e *Western blotting*.

Nomes	Companhia	Número do Catálogo	Diluição IH/WB
AR (N-20)	Santa cruz	sc-816 R	1:100/1:1000
KI 67	Abcam	ab16667	1:100
Prostatein	AbDsorotec	7821-1009	1:1000
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa cruz	sc-2030	1:100/1:2000
Bovine Anti-Goat IgG-HRP	Santa cruz	sc-2378	1:100/1:2000

CAPÍTULO IV - Considerações finais

A partir dos resultados apresentados nos dois capítulos anteriores pode se perceber que a restrição proteica materna (RPM) durante a gestação e lactação associada ao consumo de açúcar pós-natal causam alterações no perfil proteômico da próstata ventral nos animais adultos (dia pós-natal- DPN 90) e ao envelhecimento (DPN 540). O consumo de açúcar enriqueceu vias relacionadas a autofagia e metabolismo de açúcar e a RPM alterou vias de ciclo celular, proliferação e estrógeno. Estes termos enriquecido pelas proteínas diferencialmente expressas podem refletir nas alterações morfofisiológicas visualizadas no DPN 90 e 540. Além disso, a RPM e o consumo de açúcar podem impactar a funcionalidade dos órgãos reprodutivos (próstata ventral, testículo e epidídimo) na idade adulta o que podem levar a um possível desencadeamento da infertilidade, e que em especial na próstata ventral estes podem contribuir para o desenvolvimento de lesões prostáticas.

Portanto não somente as condições das mães durante os períodos de gestação e lactação são essenciais para a prole, mas também a vida pós-natal. Como podemos ver nesta imagem, que exemplifica que tanto os ambientes materno e paterno na pré-concepção, durante a formação do indivíduo (gestação e lactação) e na vida pós-natal são essenciais para o indivíduo (Figura 1).

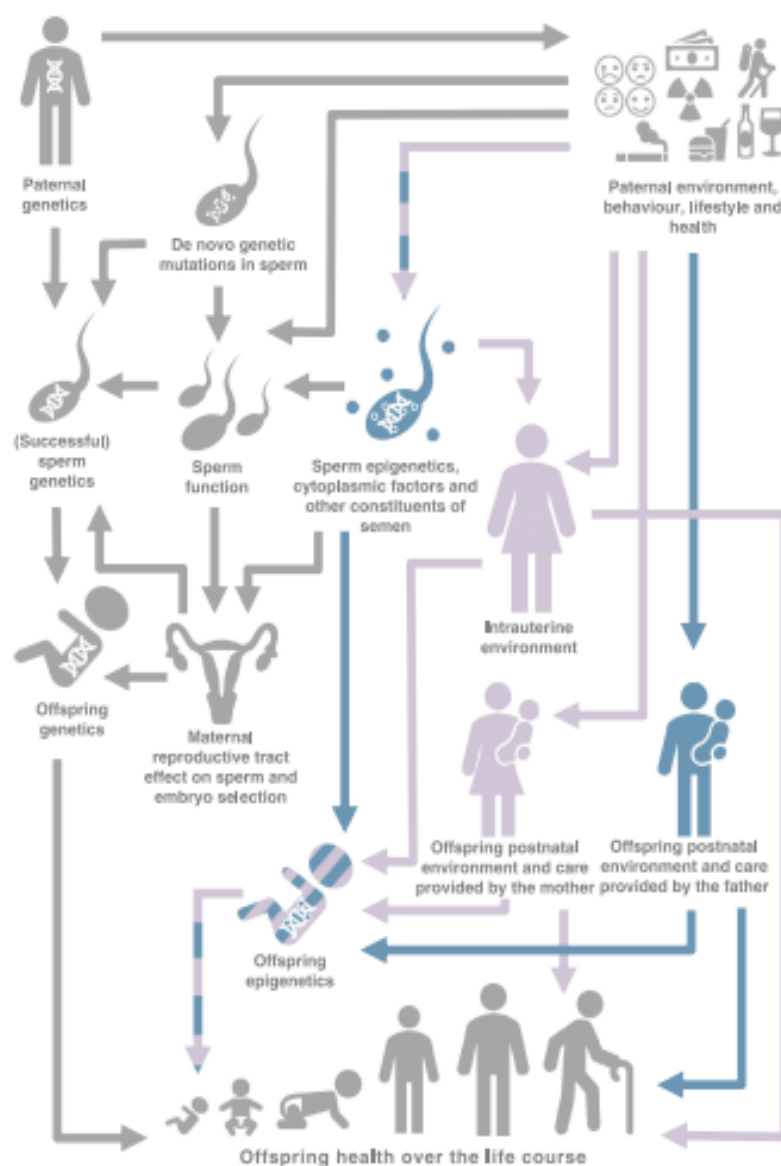


Figura 1. Esquema representativo da relevância das condições adversas maternas e paternas no sucesso da prole ao longo da vida (Sharp;Lawlor, 2019).

Anexos



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

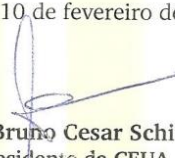


Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos da restrição proteica perinatal associado ao consumo do açúcar sobre o metabolismo, parâmetros reprodutivos e morfofisiologia prostática na prole de ratos", Protocolo nº 951-CEUA, sob a responsabilidade de **Luis Antônio Justulin Junior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 01/4/2017	Término: 01/4/2018
Espécie/linhagem:	Rato Sprague Dawley	
Nº de animais:	450	
Peso:	200-450g	Idade: 90 e 540 dias
Sexo:	Macho	
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP – Campinas/SP	

Botucatu, 10 de fevereiro de 2017.


Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: seccta@ibb.unesp.br

