



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO PROTEICA GESTACIONAL E LACTACIONAL SOBRE A
MORFOGÊNESE DA PRÓSTATA DE RATOS**

Cristiane Figueiredo Pinho

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biomédicas

BOTUCATU – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA RESTRIÇÃO PROTEICA GESTACIONAL E LACTACIONAL SOBRE A
MORFOGÊNESE DA PRÓSTATA DE RATOS**

Cristiane Figueiredo Pinho

Orientador: Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Aline Boer

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biomédicas

BOTUCATU – SP

2012

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

Pinho, Cristiane Figueiredo.

Influência da restrição proteica gestacional e lactacional sobre a morfogênese da próstata de ratos / Cristiane Figueiredo Pinho. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano
Capes: 20602006

1. Próstata. 2. Biologia do desenvolvimento. 3. Desnutrição na gravidez. 4.
Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Biologia do desenvolvimento; Interação epitélio-mesênquima;
Próstata; Restrição proteica.

Artigo Científico

Gestation and lactation protein restriction modify the prostate morphogenesis pattern in male rats

Cristiane Figueiredo Pinho¹, Patrícia Aline Boer¹, Wellerson Rodrigo Scarano^{1*}

¹Department of Morphology, Institute of Biosciences, University Est. Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970

Acknowledgements

This paper is part of the monograph presented by CFP to the Institute of Biosciences, UNESP, in partial fulfillment of the requirements for a Bachelor degree, and was supported by grants from the Brazilian agencies: CNPq – Brazilian National Research and Development Council (fellowship to WRS – Proc. Nr. 473529/2010-6) and FAPESP – Sao Paulo State Research Foundation (Proc. Nr. 2011/09061-7 for scholarship to CFP and ProPe-UNESP for fellowship to WRS and CFP).

Running title: Effects of the protein restriction on the prostate development

Key-words: prostate, morphogenesis, epithelium-mesenchyme interaction, gestational protein restriction, fetal programming.

*** Corresponding Author:**

Wellerson Rodrigo Scarano, PhD.
Departamento de Morfologia
Instituto de Biociências – UNESP
Botucatu-SP
CEP 18618-970

RESUMO

Nos últimos anos vem aumentando o reconhecimento mundial sobre a relevância da nutrição como pilar básico para o desenvolvimento econômico e social. Milhares de crianças têm seu crescimento retardado pela má nutrição, no entanto poucos trabalhos relacionam a desnutrição proteica materna e o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino. Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo investigar os possíveis efeitos da restrição proteica *gestacional e durante a lactação* sobre a morfogênese do complexo prostático, tendo em vista que a etiologia das doenças prostáticas relaciona-se com fatores epigenéticos, e dentre eles, fatores toxicológicos e nutricionais. Após o acasalamento e diagnóstico da prenhez, dois grupos de mães foram constituídos: Normoproteico (NP, 17% proteína, n=7) e Hipoproteico (LP, 6% proteína, n=7). No segundo dia pós-nascimento (DPN2), as ninhadas foram inspecionadas e reduzidas para no máximo oito animais (preferencialmente machos), a distância anogenital foi mensurada e, 2 machos por ninhada foram mortos por decapitação para coleta do broto prostático no dia do nascimento. Após o nascimento dos filhotes, um grupo de mães do grupo hipoproteico continuou recebendo a ração hipoproteica (n=3), enquanto as demais passaram a receber a ração normoproteica (n=3). No dia 22, dia do desmame, 2 machos de cada ninhada foram pesados, mortos por decapitação e o complexo prostático foi coletado para as análises morfológicas e imunoistoquímicas. Foram investigados a morfologia geral e o padrão de distribuição dos elementos celulares e da matriz extracelular por métodos citoquímicos e morfométricos, e a imunorreatividade para os seguintes marcadores: receptor de andrógeno (AR), Ki67, α -actina, EGF-R e P63. Os índices de proliferação e morte celular (TUNEL) foram calculados. A prole LP apresentou uma redução significativa do peso corporal e da distância anogenital no DPN2. A análise dos cortes semi-seriados nessa idade, mostrou que o número de brotos prostáticos foi menor em LP do que NP. As células mesenquimais em torno dos brotos prostáticos foram AR-positivas, porém no grupo LP, houve uma diminuição na

imunorreatividade e na ocorrência de marcação nessas células. O índice de proliferação celular nos brotos foi menor em LP, quando comparado com NP. A imunorreatividade à Alfa-actina e ao EGF-R foi maior em NP do que em LP. Nos brotos, as células periféricas apresentaram maior reatividade para o P63. As diminuições de EGF-R e Alfa-actina mostraram um importante ruptura na interação entre mesênquima e epitélio, provavelmente porque a via de sinalização associada ao AR tenha sido prejudicada. Nos animais analisados após o desmame, não foi observada diferença estatística entre os pesos corporais e da próstata ventral entre os grupos, apesar de uma tendência em ocorrer aumento do peso nos animais LP restritos somente na gestação. O índice proliferação celular epitelial foi maior nos animais LP restritos somente na gestação, assim como, a imunorreatividade para o AR, apontando para um *catchup* no crescimento, característico em animais que sofreram programação intrauterina. A imunorreatividade para o AR e o índice de proliferação nos animais restritos na gestação e amamentação foi semelhantes aos animais NP da mesma idade. Assim, este estudo demonstrou que a restrição proteica materna durante a organogênese prostática gestacional pode modificar a interação entre mesênquima e epitélio e, portanto, retardar o desenvolvimento da próstata. No entanto, a alteração dos parâmetros alimentares após o nascimento pode alterar o crescimento e a diferenciação da próstata, o que poderia comprometer sua função e predisposição a doenças na vida adulta.

INTRODUÇÃO

A desnutrição é um dos principais problemas mundiais de saúde coletiva e uma realidade altamente prevalente, sobretudo, nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Por conta disso, o reconhecimento sobre a relevância da nutrição como pilar básico para o desenvolvimento econômico e social vem aumentando. Milhares de crianças têm seu crescimento retardado pela má nutrição, no entanto, poucos trabalhos relacionam a desnutrição proteica materna e o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino.

O estado nutricional da mãe durante a gestação e lactação é essencial para o crescimento normal em seres humanos e em animais experimentais (da Silva Faria et al., 2004) pois o desenvolvimento nos períodos intra e pós-uterino recente são dependentes do ambiente nutricional, hormonal e metabólico provido por ela (Desai et al., 1997).

A desnutrição precoce pode alterar a programação original de órgãos, especialmente daqueles envolvidos no desenvolvimento, o que pode resultar em alterações a longo prazo no metabolismo (Lucas, 1998; Barker, 2000).

A morfogênese da próstata é um processo andrógeno-dependente decorrente das interações mesênquima-epitélio e modulado por fatores de crescimento (Cunha et al., 1995). Em roedores, o desenvolvimento da próstata tem início no final do período fetal, quando o mesênquima do seio urogenital induz a formação de brotos epiteliais que emergem do seio urogenital imediatamente abaixo da bexiga em desenvolvimento (Sugimura et al., 1986; Hayashi et al., 1991; Timms et al., 1994). Os brotos prostáticos crescem no mesênquima circundante, se alongam, e começam a bifurcar-se em ramos laterais, originando três lobos prostáticos distintos: o lobo ventral, o dorso-lateral e o anterior (Marker et al., 2003). Simultaneamente ao processo de ramificação ductal, ocorre sua canalização e a citodiferenciação epitelial e estromal (Wang et al., 2001; Vilamaior et al., 2006).

Durante a diferenciação do mesênquima em um estroma composto por células musculares lisas e fibroblastos (Hayward et al., 1996b), os andrógenos regulam a espessura e a continuidade da camada de músculo liso formada, de modo que a ausência de andrógenos em fetos femininos ocasiona a formação de uma camada muscular espessa e contínua. Em machos, na presença de andrógenos, a formação do músculo liso é inibida ou atrasada, e os brotos prostáticos emergem da uretra e podem penetrar no mesênquima ventral denso. Dessa forma, a interação parácrina epitélio-mesênquima é estabelecida, ocasionando a ramificação e expansão da próstata ventral (Thomson, 2001).

É durante o período inicial de desenvolvimento que a modulação hormonal pode ter um efeito irreversível permanente sobre a morfogênese da próstata, sua organização celular e função. Desbalanços hormonais androgênicos e estrogênicos nessa fase, ocasionados por fatores de origem metabólica e nutricional derivados do organismo materno, podem refletir em patologias prostáticas tardias incluindo inflamação, lesões pré-malignas e hiperplasia glandular (Prins et al., 2001; Woodham et al., 2003; Scarano et al., 2009), o que é comumente chamado de “imprinting hormonal”.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar os possíveis efeitos da desnutrição proteica durante a gestação e lactação sobre o desenvolvimento da parte pélvica do seio urogenital e a morfogênese inicial do complexo prostático, tendo em vista que a etiologia das doenças prostáticas relaciona-se com fatores epigenéticos, e dentre eles fatores toxicológicos e nutricionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Machos adultos (n=7) (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e fêmeas adultas (n=14) (60 dias de idade, pesando aproximadamente 200g), da linhagem Wistar, provenientes do CEMIB/Unicamp foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C) recebendo água e ração para roedores à vontade. Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (DG0) determinado pela presença de espermatozóides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro. Após a confirmação da prenhez as fêmeas foram divididas em 2 grupos experimentais:

- Grupo **NP** que recebeu ração normoproteica *ad libitum* (17%) (n=7)
- Grupo **LP** que recebeu ração hipoproteica *ad libitum* (6%) (n=7)

Ambos os grupos receberam estas rações até o dia do nascimento. O controle da ingestão de ração foi feito diariamente durante todo o período gestacional, sendo pesada a ração ofertada e aquela recusada.

No dia do nascimento a prole foi pesada e a medida anogenital foi verificada para a separação de machos e fêmeas. Selecionou-se 8 machos (2/ninhada) de cada grupo experimental. Os machos recém-nascidos foram decapitados (n=8) e o broto prostático (região pélvica da uretra) de cada um foi coletado com o auxílio de um estereomicroscópio, fixado e destinado às rotinas histotécnicas.

Após o nascimento, o grupo LP foi novamente subdividido em dois subgrupos:

- Grupo **LP1** que continuou recebendo ração hipoproteica *ad libitum* (6%)
- Grupo **LP2** que passou a receber ração normoproteica *ad libitum* (17%)

Vinte e dois dias após o nascimento (DPN22), após o término da lactação, 2 machos de cada ninhada foram pesados, mortos por decapitação e o complexo prostático foi coletado para as

análises (n=8/grupo).

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu – Protocolo 215/2010.

Microscopia de Luz

Os fragmentos do broto prostático (DPN1) e o lobo ventral da próstata (DPN22) foram fixados por imersão em solução fixadora de Metacarn (Putchler et al., 1970) durante 3 horas, desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e, então, incluídas em Paraplast. Cortes de 5 µm foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

Parte do material foi fixado, desidratado, incluído em historresina Leica e seccionado a 3µm em micrótomo rotativo automático.

Após microtomia, os cortes foram submetidos às seguintes colorações:

- 1- ***Hematoxilina-Eosina (HE)*** para estudo morfológico e morfométrico de ordem geral, análises dos tipos de lesão e frequências dessas lesões.
- 2- ***Impregnação pela prata para reticulina*** para evidenciar fibras reticulares segundo (Gomori, 1937).
- 3- ***Picrossírius-hematoxilina*** para evidenciar as fibras colágenas

As lâminas foram analisadas e os campos microscópicos digitalizados utilizando um sistema analisador de imagens (Image Pro-Plus) acoplado a fotomicroscópio Leica.

Análise morfométrico-estereológica

Realizou-se a análise morfométrico-estereológica segundo Weibel, (1963), na qual se utiliza um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 120 pontos e 60 linhas. Assim, obteve-se a

proporção ocupada para cada grupo (DPN22), para os seguintes componentes teciduais: epitélio e estroma.

Detecção de fragmentação de DNA associada a apoptose e determinação do índice de apoptose

Cortes em Paraplast dos animais no DPN22 foram submetidos à digestão por Proteinase K. Os cortes foram processados segundo as instruções do Kit apoptose (TdT-FragEl – Oncogene), o qual é baseado na reação de TUNEL. A marcação foi revelada pela diaminobenzidina e os cortes foram contracolorados com metil-green. O índice de apoptose foi determinado contando-se todos os núcleos de, pelo menos, 10 campos microscópicos em objetiva de 20X das próstatas de cada grupo experimental. A proporção de células apoptóticas foi expressa em relação ao número total de células contadas.

Análise Imunoistoquímica

Fragmentos do broto prostático (DPN1) e da próstata ventral (DPN22) dos animais provenientes da etapa II (180 dias) foram incluídos em paraplast conforme descrito anteriormente. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em ambiente úmido a 100°C em tampão Tris/EDTA, pH=9,0 por 30 minutos. Após a lavagem em água os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena (Peróxido de Hidrogênio a 3% em metanol) por 15 minutos. Em seguida os cortes foram cobertos com BSA 3% acrescido de soro não imunogênico de cabra (1%) para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após esses procedimentos foram realizadas as reações imunohistoquímicas para a identificação de:

- **Ki67** – ab-16667 (*Abcam Inc., Cambridge, MA - USA*) Detecção de células em proliferação.
- **AR**– SC-816 (*Santa Cruz Biotechnonology – USA*); Receptor de andrógeno.
- **EGF-R** – ab2430; (*Abcam Inc., Cambridge, MA – USA*). Receptor para o fator de crescimento epidermal;
- **α -Actina** – ab5694; (*Abcam Inc., Cambridge, MA – USA*).
- **P63** – MAB4135; (Millipore Corporation, USA). Células basais progenitoras.

Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram incubados por 30-45 minutos com um kit HRP-Polymer Detection (Biocare Medical, LLC, CA, USA) e, posteriormente a reação foi revelada com DAB.

Determinação do índice de proliferação celular

O índice de células epiteliais prostáticas Ki-67 positivas (DPN1 e DPN22) no tecido prostático foi determinada dividindo-se o número de células marcadas pelo número de células analisadas (~2000 células por animal, n=5/grupo) e, finalmente, o valor multiplicado por 100. Os dados foram comparados entre os grupos experimentais.

Análise Estatística

Para a comparação dos resultados quantitativos entre os grupos controle e tratados utilizou-se os testes não-paramétrico de Kruskal-Wallis (mais de dois grupos, DPN22) ou Mann-Whitney (2 grupos, DPN1). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

O peso dos animais e a distância anogenital no dia do nascimento (DPN1) foram menores no grupo LP comparado ao grupo NP (Tabela 1).

Nos animais recém-desmamados (DPN22), o peso corporal e o peso da próstata ventral foram menores nos animais LP1, enquanto que nos animais LP2 ambos os parâmetros foram semelhantes ao grupo NP (Tabela 1). Ainda com relação ao peso corporal, LP1 e LP2 foram semelhantes entre si (Tabela 1).

Análise Histopatológica e Imunoistoquímica

- Recém-nascidos (DPN1)-

A parte pélvica do seio urogenital é constituída pelos brotos prostáticos, cordões celulares com característica epitelial, que se diferenciam em ductos e ácinos prostáticos durante o desenvolvimento do indivíduo. Nos animais NP e LP observou-se a formação de cordões epiteliais (brotos prostáticos) logo abaixo do istmo da bexiga urinária (figs. 1a e 1b), e na porção inicial da uretra (futura uretra prostática), (figs. 1c e 1d). Em ambos os grupos, esses cordões se desenvolvem imersos num mesênquima, rico em células e pobre em elementos fibrilares, e se alongam em direção periférica para a formação dos lobos prostáticos. Nos animais LP, o número de brotos ao longo da porção proximal da uretra foi aparentemente menor (figs. 1c e 1d).

A imunomarcção para o receptor de andrógeno (AR) mostrou-se moderada na região do mesênquima nos animais do grupo NP (fig. 2a), enquanto que a marcação foi fraca e difusa nas células mesenquimais dos animais LP (fig. 2b).

A reatividade para a proteína Ki-67 apontou para altos índices de proliferação celular tanto nos cordões epiteliais como no mesênquima (figs. 2c e 2d). No entanto, notou-se que o número de

células em divisão em NP (fig. 2c) é maior do que em LP (fig. 2d), o que foi confirmado pelo índice de proliferação celular nos brotos prostáticos (Tabela 1).

A imunomarcação para α -actina e EGF-R foi mais evidente nos animais do grupo NP (figs. 2e e 2g) e, praticamente negativa, em LP (figs. 2f e 2h). A α -actina foi evidente na região adjacente ao cordão epitelial, evidenciando a diferenciação das células mesenquimais em células musculares lisas, que devem circundar os ductos e ácinos prostáticos no indivíduo adulto (figs. 2e e 2f). Já o receptor para o EGF (fator de crescimento epidérmico) apresentou marcação difusa no cordão epitelial (broto prostático) – (figs. 2g e 2h).

Células P63-positivas foram observadas na periferia dos brotos epitelias e apresentaram marcação moderada (figs. 2i e 2j). A diferenciação das células epitelias em células epiteliais basais e luminais é um processo inerente ao desenvolvimento dos ductos e ácinos prostáticos durante a morfogênese prostática. Nos animais LP essa marcação é menos intensa (fig. 2j).

- *Recém-desmamados (DPN22)* -

O lobo ventral da próstata dos animais no DPN22 apresentou os ácinos com diâmetro luminal variável, sendo que nos animais NP e LP1 esse diâmetro foi mais amplo, quando comparados aos animais LP2, onde o diâmetro do lume foi reduzido (figs. 3a, 3c e 3f). Além disso, de forma geral, o espaço interacinar foi menor nos animais LP2, onde os pequenos ácinos mostraram-se mais agrupados e com frequentes figuras de mitose no epitélio (fig. 3g).

O epitélio de todos os grupos apresentou característica secretora, com a região do Aparelho de Golgi (cromófoba) evidente (figs. 3b, 3c e 3g), apesar de pequena quantidade de secreção na luz dos ácinos.

Em 1/4 dos animais LP1, foi observado infiltrado inflamatório difuso no estroma e no lume dos ácinos com presença de células inflamatórias e predomínio de polimorfonucleares (figs. 3d e

3e). Em algumas dessas regiões, foram identificadas regiões de epitélio displásico, denominadas como atipias inflamatórias reativas (fig. 3e).

Em relação ao estroma, observou-se que não houve alterações severas na densidade e da compactação dos elementos colagênicos entre os grupos experimentais (figs. 4a-4i). As fibras reticulares apresentaram-se delicadas na membrana basal do epitélio e das células musculares lisas que circundam os ácinos (4a, 4d e 4g). No entanto, notou-se um discreto aumento na dispersão das fibras de colágeno nos animais LP1 no estroma interacinar (figs. 4e e 4f).

A imunorreatividade para o receptor de andrógeno foi predominantemente nuclear em todos os grupos experimentais no DPN22, no entanto, o grupo LP2 (fig. 5c) mostrou maior intensidade de marcação quando comparado aos outros dois grupos, que apresentaram intensidade de marcação semelhante (figs. 5a e 5b).

Da mesma forma, a frequência de células Ki-67 positivas nos ácinos dos animais LP2 foi significativamente maior do que nos outros grupos (Figs. 5d, 5e, 5f, tabela 1). Já a proporção de células TUNEL-positivas foi semelhante entre os grupos experimentais (tabela 1).

Com relação à imunorreatividade para a α -actina, no grupo LP1 a marcação mostrou-se mais espessa ao redor dos ácinos prostáticos (fig. 5h), enquanto que o padrão de marcação nos grupos NP e LP2 foi semelhante (figs. 5g e 5i).

A imunorreatividade para as proteínas P63 e EGF-R apresentou padrões de frequência e intensidade, respectivamente, semelhantes entre os grupos nessa idade (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento, crescimento e funcionamento da glândula prostática ao longo da vida são dependentes de andrógenos, que atuam em sinergia com outros hormônios moduladores como o estrogênio e prolactina (Prins et al., 2001). Em ratos, o desenvolvimento da próstata tem início no final do período fetal, seguido de extensa ramificação e diferenciação celular durante o período neonatal (Prins et al., 1995). É durante este período inicial de desenvolvimento que a modulação hormonal pode ter um efeito permanente e irreversível sobre a morfologia da próstata, sua organização celular e função. Sendo assim, o estado nutricional da mãe durante a gestação e lactação é fator essencial para o crescimento normal em seres humanos e animais experimentais (da Silva Faria, et al., 2004) pois o desenvolvimento nos períodos intra e pós-uterino recente são dependentes do ambiente nutricional, hormonal e metabólico provido por ela (Desai et al., 1997).

Os nossos resultados mostraram que a restrição proteica gestacional alterou o peso dos recém-nascidos e a distância anogenital nos animais LP. Além disso, também foi observada uma redução do peso corporal e da próstata ventral dos animais LP1 no DPN22, evidenciando uma redução no seu ganho de peso durante a lactação em relação aos animais NP, enquanto que o grupo LP2 teve o peso da próstata ventral e um ganho de peso semelhante ao NP e LP1. Esses dados corroboram com os achados de outros estudos que mostraram menor peso ao nascimento e diminuição da distância anogenital na prole de mães restritas na gestação (Fagundes et al., 2007; Gosby et al., 2008).

Alguns estudos mostraram que a privação de alimentos leva à diminuição na liberação do hormônio de crescimento (GH) e, conseqüentemente, os níveis de GH no soro, o que poderia facilmente explicar o ganho de peso baixo destes animais (Console et al., 2001). A distância anogenital tem sido utilizada como um biomarcador externo para a avaliação da exposição a

desreguladores endócrinos (andrógenos e anti-andrógenos) durante a gestação tendo em vista que a mesma é regulada pela testosterona fetal (Graham and Gandelman 1986; Scarano et al., 2010).

Os resultados deste trabalho apontaram para um retardo no crescimento dos brotos prostáticos nos animais recém-nascidos, onde foi verificada redução do número de brotos, do índice de proliferação celular, da expressão do AR nas células mesenquimais e de EGF-R nas células epiteliais dos brotos, além da baixa diferenciação de células mesenquimais em células musculares lisas. Também foi observada uma menor expressão da proteína P63 nas células epiteliais periféricas dos brotos prostáticos.

A morfogênese prostática é um processo andrógeno-sensível dependente das interações entre mesênquima e epitélio, modulado por fatores de crescimento (Cunha et al., 1995). A alteração na ativação dos receptores de andrógeno (ARs) nos animais LP, provavelmente, reduziu a produção de fatores parácrinos que agiriam sobre o desenvolvimento dos brotos epiteliais pela ativação de fatores de crescimento como o EGF, através do EGF-R. Essa disruptura na sinalização deve ter reduzido os sinais intracelulares de estímulo proliferativo, desencadeando a redução no índice de proliferação celular nos brotos. Além do que, fatores epiteliais parácrinos teriam deixado de estimular o mesênquima adjacente, o que pode ter interferido na diferenciação do mesênquima em células musculares lisas, retardando a diferenciação ductal da próstata.

Nas interações recíprocas entre mesênquima e epitélio, o mesênquima induz e direciona os padrões de morfogênese epitelial, regula sua proliferação e citodiferenciação (Cunha et al., 1992), enquanto o epitélio interage através da produção de fatores de diferenciação mesenquimal. Adicionalmente, os andrógenos estimulam os ARs das células mesenquimais atuando na sua diferenciação em músculo liso (Cooke et al., 1991; Prins et al., 1992) que se localiza adjacente aos brotos epiteliais e que são, provavelmente, mediadores chave da ação androgênica nos compartimentos estromal e epitelial (Prins et al., 1995).

Em relação aos animais LP1 e LP2 no DPN22, foi observada uma resposta diferencial no ganho de peso e no peso da próstata ventral entre esses dois grupos restritos em relação ao grupo NP. Os animais restritos durante a gestação e amamentação (LP1) continuaram apresentando ao final da lactação menor peso corporal e da próstata em relação ao NP, no entanto, no grupo LP2, restrito apenas na gestação, houve uma recuperação parcial no ganho de peso corporal e no peso da próstata em relação a NP. Esses dados corroboram com vários trabalhos que relatam que a reabilitação nutricional resulta em um período de crescimento acelerado, compensando total ou parcialmente a anterior taxa mais lenta de crescimento (gestação). Este crescimento acelerado é chamado de *catch-up*, e é comum em humanos e animais programados durante a gestação (Kay's et al., 2006; Hornick et al. 2000; Wit et al., 2002).

Outro aspecto que confirmou o *catch-up* nos animais LP2 foi o aumento no índice de proliferação celular em relação aos demais grupos. Isto porque, apesar dos níveis de andrógenos serem baixos durante o período pós-natal em roedores, o possível aumento na expressão dos ARs consequentemente aumentaria a resposta androgênica nos animais LP2, ativando vias de sinalização intracelular de crescimento, manutenção e proliferação celular, que são andrógeno-dependentes (Cooke et al., 1987; Donjacour e Cunha, 1988; Shima et al., 1990), induzindo aumento na proliferação epitelial.

Apesar de estabelecer índices de proliferação celular e imunorreatividade do AR semelhantes ao grupo NP, a permanência dos animais LP1 sob as condições hipoproteicas durante a lactação não permitiu um crescimento semelhante ao ocorrido nos animais do grupo LP2.

Provavelmente, as alterações histológicas observadas entre os grupos experimentais no DPN22 estejam relacionadas ao processo de crescimento pós-natal estabelecido pelas dietas adotadas durante a lactação, combinado ao conjunto de fatores nutricionais estabelecidos no ambiente intrauterino.

Segundo Ramos et al. (2010), o estado nutricional materno durante a lactação é equivalente e, possivelmente, ainda mais importante do que durante a gestação para alguns órgãos, como evidenciado por um estudo de Leonhardt et al. (2003), que mostrou que a prole cujas mães foram desnutridas durante a lactação teve consequências mais drásticas sobre o desenvolvimento gonadal, comparada com a prole cujas mães foram subnutridas só durante a gravidez, ou durante a gravidez e lactação.

Os resultados mostraram que alguns animais do grupo LP1 apresentaram alterações histopatológicas de natureza inflamatória, porém nestes animais, a histoarquitetura prostática apresentou um padrão misto entre os grupos NP e LP2, com presença de ácinos pequenos de lume reduzido e ácinos maiores de lume amplo, sem predomínio definido.

Ainda no grupo LP1, foi observado aumento na dispersão das fibras colágenas e na densidade da camada de células musculares lisas ao redor dos ácinos quando comparado aos outros grupos. Essa alteração no arranjo do estroma pode estar relacionada ao retardo na formação dos brotos prostáticos durante a gestação, obedecendo a um padrão de desenvolvimento diferenciado quando relacionado aos observados nos animais que não foram restritos durante a lactação.

Nossos resultados mostraram que a restrição proteica gestacional interferiu na morfogênese prostática alterando a interação epitélio-mesênquima por vias andrógeno-dependentes, e que, tanto a manutenção do ambiente hipoproteico como o reestabelecimento de um ambiente normoproteico pós-natal causaram alterações prostáticas estruturais em animais jovens, o que poderia proporcionar um ambiente favorável à ocorrência de doenças durante o envelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Segundo as normas da ABNT)

- BARKER D. J. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology*, v. 53, p. 555–74, 2000.
- CONSOLE G. M., JURADO S. B., OYHENART E., FERRESE C. PUCCIARELLI H., ET AL. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34, p. 65-74, 2001.
- COOKE P. S., YOUNG P. F., CUNHA O. R. Androgen dependence of growth and epithelial morphogenesis in neonatal mouse bulbourethral glands. *Endocrinology*, v. 121, p. 2153-2160, 1987.
- COOKE P. S., YOUNG P., CUNHA G. R. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology*, v. 128, p. 2867–2873, 1991.
- CUNHA, G. R., ALARID E. T., TURNER, T., DONJACOUR, A. A., BOUTIN, E. L., FOSTER, B. A., Normal and abnormal development of the male urogenital tract: Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *J. Androl.*, v. 13, p. 465-475, 1992.
- CUNHA, G. R., FOSTER, B., THOMSON, A., SUGIMURA, Y., TANJI, N., TSUJI, M., TERADA, N., FINCH, P. W., AND DONJACOUR, A. A. Growth factors as mediators of androgen action during the development of the male urogenital tract. *World J. Urol.*, v. 13, p. 264–276, 1995.
- DA SILVA FARIA T., DA FONTE RAMOS C., SAMPAIO F. J. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J Nutr Biochem*, v. 15, p. 123–7, 2004.

- DESAI M, CROWTHER NJ, LUCAS A, HALES CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Brith. J. Nutri.*, v. 76, p. 591-603, 1996.
- DONJACOUR A. A., CUNHA O. R. The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Dev Biol*, v. 128, p. 1-14, 1988.
- FAGUNDES A. T., MOURA E. G., PASSOS M. C. F., OLIVEIRA E., TOSTE F. P., BONOMO I. T., TREVENZOLI I. H., GARCIA R. M. G., LISBOA P. C. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *British Journal of Nutrition*, v. 98, p. 922-28, 2007.
- GOSBY A. K., STANTON L. M. L., MALONEY C. A., THOMPSON M. , BRIODY J., BAXTER R. C., BRYSON J. M., DENYER G. S., CATERSON I. D. Postnatal nutrition alters body composition in adult offspring exposed to maternal protein restriction. *British Journal of Nutrition*, p. 1-7, 2008.
- GRAHAM S, GANDELMAN R. The expression of ano-genital distance data in the mouse. *Physiol Behav*, v. 36, p. 103-4, 1986.
- HAYWARD, S. W., BASKIN, L. S., HAUGHNEY, P. C., CUNHA, A. R., FOSTER, B. A., DAHIYA, R., PRINS, G. S., AND CUNHA, G. R. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat.*, v. 155, p. 81–93, 1996a.
- HAYWARD, S. W., BASKIN, L. S., HAUGHNEY, P. C., FOSTER, B. A., CUNHA, A. R., DAHIYA, R., PRINS, G. S., AND CUNHA, G. R. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat.*, v. 155, p. 94–103, 1996b.
- HAYASHI, N., SUGIMURA, Y., KAWAMURA, J., DONJACOUR, A. A., AND CUNHA, G. R. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 308–321, 1991.

- HORNICK, J. L.; VAN EANAEME, C.; GÉRARD, O.; DUFRASNE, I.; ISTASSE, L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 19, p. 121–132, 2000.
- KAY'S, S. K.; HINDMARSH, P. C. Catch-up growth: An overview. *Pediatr. Endocrinol. Rev.*, v. 3, p. 365–378, 2006.
- LEONHARDT M.; LESAGE J.; CROIX D.; DUTRIEZ-CASTELOOT I.; BEAUVILLAIN J. C.; et al. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod.*, v. 68, p. 390–400, 2003.
- LUCAS A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr.*, v. 128, p. 401–408, 1998.
- MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA R, CUNHA GR. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biol.*, v. 253, p. 165-74, 2003.
- PRINS G. S., COOKE P. S., BIRCH L., DONJACOUR A. A. , YALCINKAYA T. M., SIITERI P. K., CUNHA G. R. Androgen receptor expression and 5 α -reductase activity along the proximal-distal axis of the rat prostatic duct. *Endocrinology*, v. 130, p. 3066–3073, 1992.
- PRINS G. S., BIRCH L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology*, v. 136, p. 1303–14, 1995.
- PRINS G. S., BIRCH L, HABERMANN H., CHANG W. Y., TEBEAU C., PUTZ O., BIEBERICH C. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 13, p. 241-52, 2001.
- RAMOS C. F.; BABINSKI M. A.; COSTA W. S.; SAMPAIO F. J. B. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian Journal of Andrology*, v. 12, p. 180–185, 2010.

- SCARANO W. R., TOLEDO F. C., GUERRA M. T., CAMPOS S. G. P., JUSTULIN JR. L. A., FELISBINO S. L., ANSELMO-FRANCI J. A., TABOGA S. R., KEMPINAS W. G. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicol.*, v. 262, n. 3, p. 215-23, 2009.
- SCARANO W. R., TOLEDO F. C., GUERRA M. T., PINHEIRO P. F. F., DOMENICONI R. F., FELISBINO S. F., CAMPOS S. G. P., TABOGA S. R., KEMPINAS W. G. Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (dbp) in utero and during lactation. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 73, p. 1–13, 2010.
- SHIMA H., TSUJI M., YOUNG P. F., CUNHA O. R. Postnatal growth of mouse seminal vesicle is dependent on Sa-dihydrotestosterone. *Endocrinology*, v. 127, p. 3222-3233, 1990.
- SUGIMURA, Y., CUNHA, G. R., AND DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol. Reprod.*, v. 34, p. 961–971, 1986.
- THOMSON, A. A., FOSTER, B. A., CUNHA, G. R. Analysis of growth factor and receptor mRNA levels during development of the rat seminal vesicle and prostate. *Development*, v. 124, p. 2431-2439, 1997.
- THOMSON, A. A., AND CUNHA, G. R. Prostatic growth and development are regulated by FGF10. *Development*, v. 126, p. 3693–3701, 1999.
- THOMSON A. A. Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, v.121, p. 187–195, 2001.
- TIMMS, B. G., MOHS, T. J., AND DIDIO, L. J. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J. Urol.*, v. 151, p. 1427–1432, 1994.

- TIMMS, B., LEE, C., AUMULLER, G., AND SEITZ, J. Instructive induction of prostate growth and differentiation by a defined urogenital sinus mesenchyme. *Microsc. Res. Tech.*, v. 30, p. 319–332, 1995.
- VILAMAIOR PSL, TABOGA S. R., CARVALHO H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. *Anatomical Record*, v. 288, p. 885-892, 2006.
- WANG Y., HAYWARD S., CAO M., THAYER K., CUNHA G. R.. Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, v. 68, p. 270-279, 2001.
- WIT, J. M.; BOERSMA, B. Catch-up growth: Definitions, mechanisms and models. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, v. 15, p. S1229–S1241, 2002.
- WOODHAM C., BIRCH L., PRINS G. S. Neonatal estrogen down-regulates prostatic androgen receptor through a proteosome-mediated protein degradation pathway. *Endocrinology*, v. 144, p. 4841-850, 2003.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Cortes histológicos da porção proximal da uretra dos animais experimentais no DPN1 (broto prostático) corados pelo picrossírius-hematoxilina. **Figs. a e c:** NP; **figs b e d:** LP.

Abreviações: **seta:** broto prostático; **mes:** mesênquima; **Ur:** uretra proximal; **B:** bexiga urinária.

Figura 2: Cortes histológicos da porção proximal da uretra dos animais experimentais no DPN1 (broto prostático) após reações imunoistoquímicas para: **a-b:** Receptor de andrógeno (AR); **c-d:** Ki67; **e-f:** α -actina; **g-h:** EGF-R; **i-j:** P63. **Figs. a, c, e, g e i:** NP; **figs b, d, f, h e j:** LP.

Abreviações: **seta:** marcações positivas; *****: broto prostático; **mes:** mesênquima; **Ur:** uretra proximal.

Figura 3: Cortes histológicos da próstata ventral dos animais experimentais no DPN22 corados pela hematoxilina-eosina. **Figs. a- b:** NP; **c-e:** LP1; **e-f:** LP2. **Abreviações:** **Ep:** epitélio; **St:** estroma; **L:** lume; **Inf:** inflamação; **At:** atipia inflamatória reativa; **seta:** figura mitótica. **Aumentos:** figs.: a, c, d, f: 200x; figs.: b, e, g: 400x.

Figura 4: Cortes histológicos da próstata ventral dos animais experimentais no DPN22 corados pela reticulina (figs.: a,d,g) e pelo picrossírius-hematoxilina em campo claro (figs.:b, e, h) e sob luz polarizada (figs.: c, f, i). **Abreviações:** **Setas:** fibras reticulares; **Col:** fibras colágenas. **Aumento:** 400x.

Figura 5: Cortes histológicos da próstata ventral dos animais experimentais no DPN22 após reações imunoistoquímicas para: **a-c:** Receptor de andrógeno (AR); **d-f:** Ki67; **g-i:** α -actina. As setas apontam as reações positivas para as proteínas testadas. **Aumento:** 400x.

Tabela 1. Dados quantitativos dos animais experimentais nos DPN1 e DPN22.

	NP	LP	LP1	LP2
DPN1				
<i>Peso Corporal (g)</i>	6,55±0,76	5,93±0,52*	-	-
<i>Distância Anogenital (mm)</i>	3,38±0,44	3,14±0,18*	-	-
<i>Índice de proliferação celular (brotos)- %</i>	80,9 [66,7-89,2]	35,6* [23,5-57,8]		
DPN22				
<i>Peso Corporal (g)</i>	27,52±2,53 ^a	-	22,74±1,63 ^b	26,37±1,87 ^{a,b}
<i>Peso da Próstata (mg)</i>	31,79±3,59 ^a	-	19,74±2,66 ^b	25,76±6,34 ^{a,b}
<i>Índice de proliferação celular epitelial- %</i>	17,4 ^a [15,3-21,0]		17,0 ^a [12,8-19,5]	26,0 ^b [22,2-29,4]
<i>Índice Apoptótico- %</i>	1,72 ^a [1,55-1,95]		1,69 ^a [1,45-1,98]	1,84 ^a [1,52-1,96]

Dados absolutos expressos pela média±DP; dados em porcentagem expressos pela mediana [Q1-Q3]. No DPN1, os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney e foram consideradas significativas as diferenças onde *p≤0,05. No DPN22, os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e valores seguidos de letras diferentes foram considerados estatisticamente diferentes com p≤0,05.

FIGURA 1

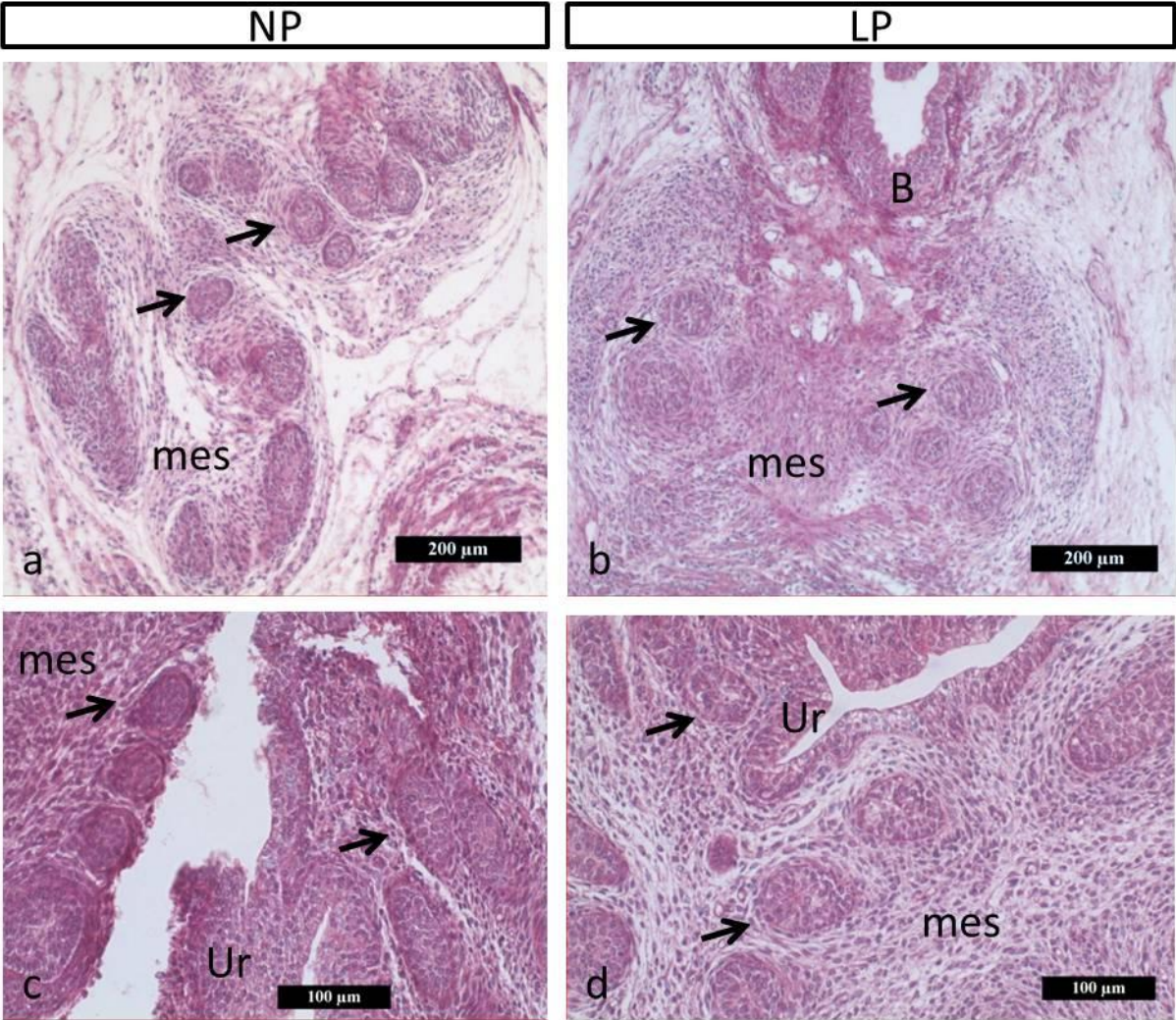


FIGURA 2

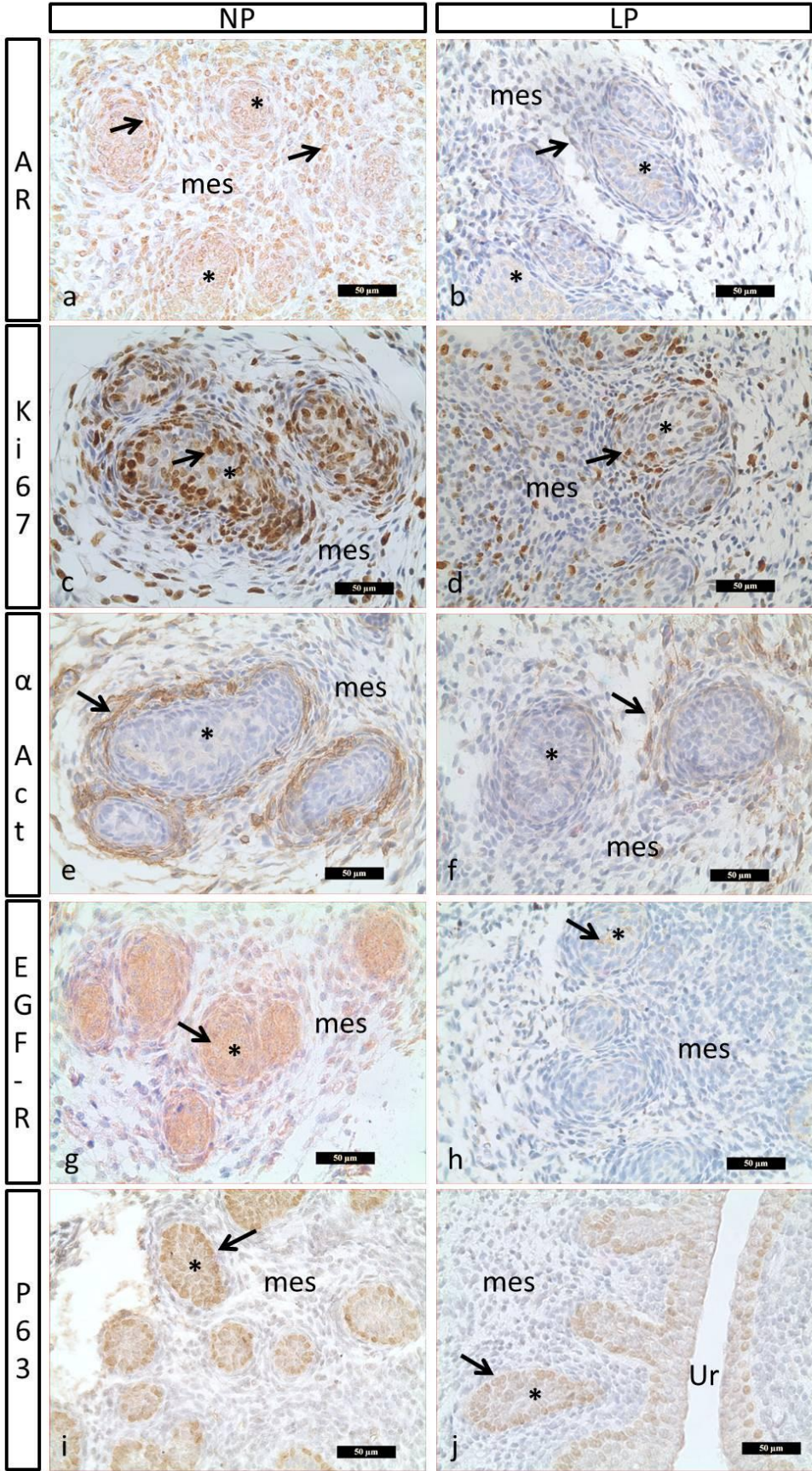


FIGURA 3

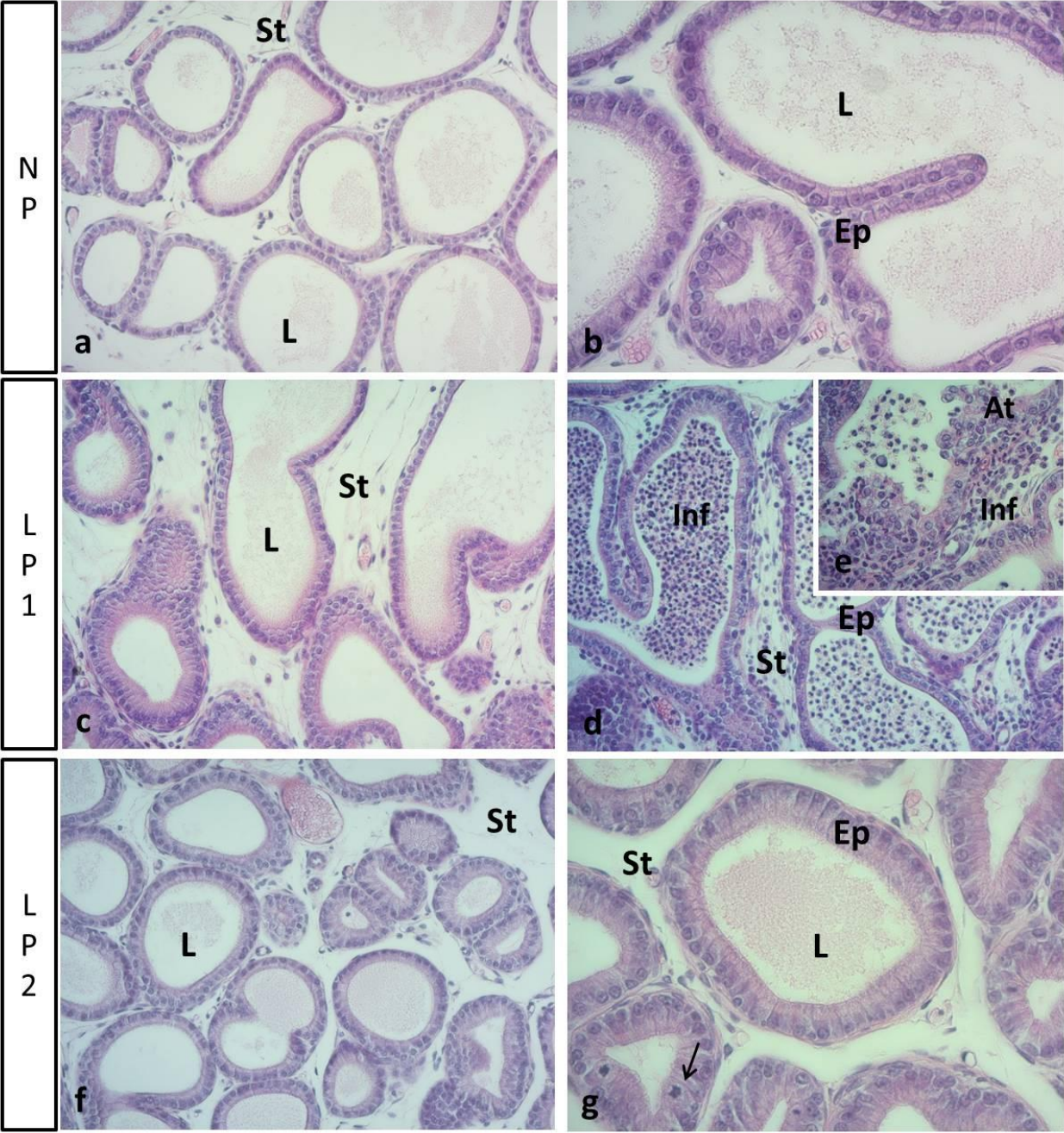


FIGURA 4

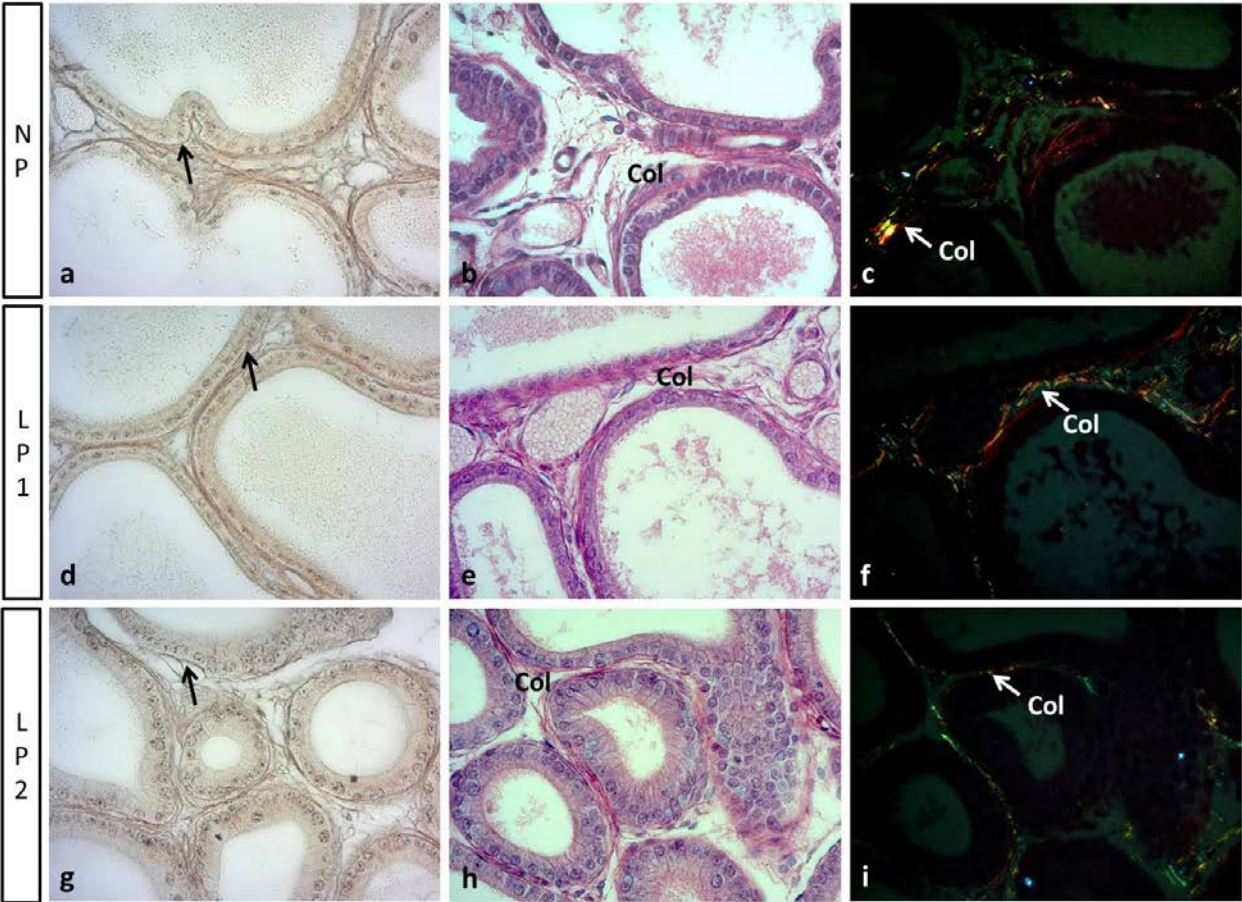
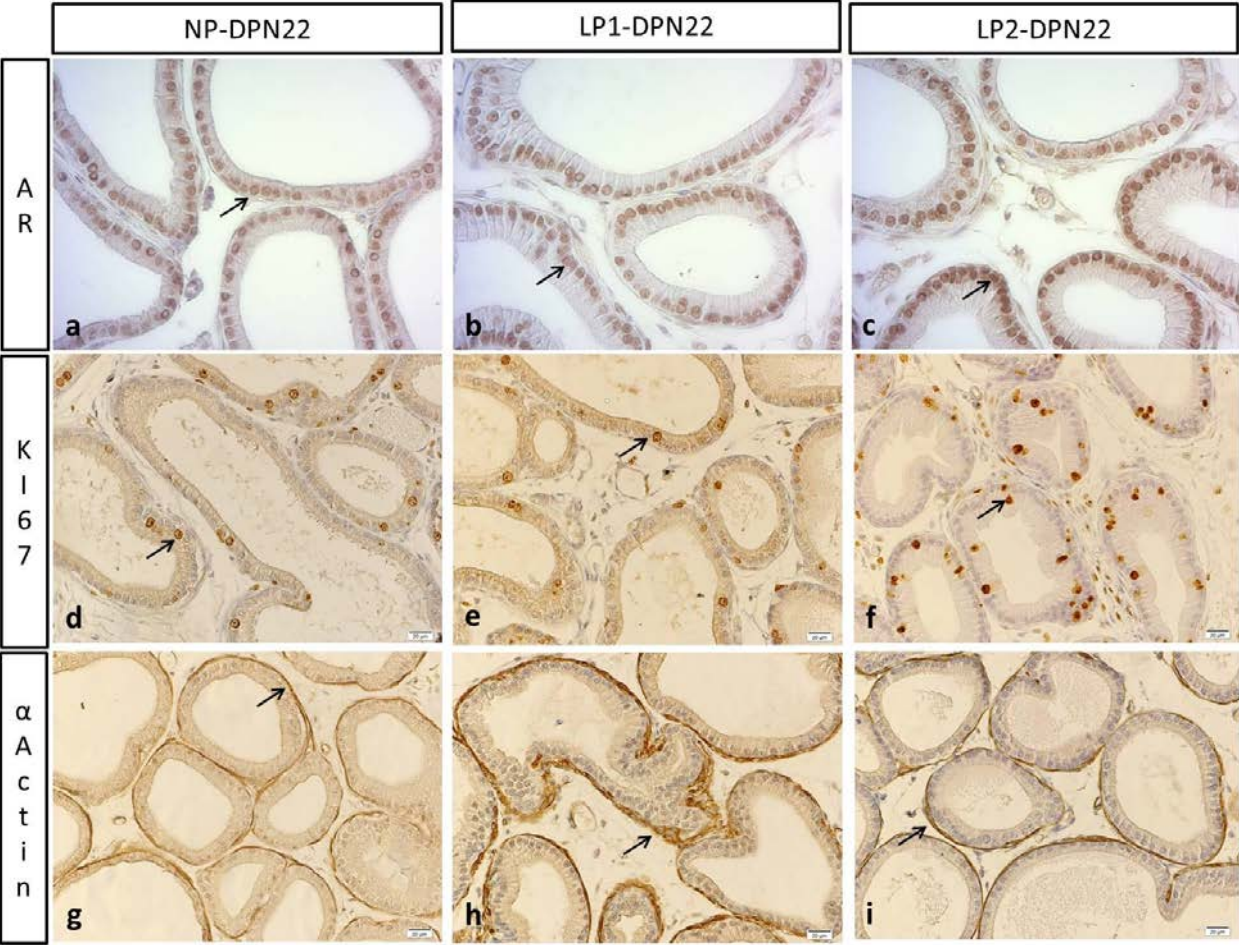


FIGURA 5





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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 215-CEEA, sobre "Influência da restrição protéica gestacional sobre o desenvolvimento do seio urogenital e a morfogênese inicial do complexo prostático de ratos machos", sob a responsabilidade de Wellerson Rodrigo Scarano, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de 09/04/2010.

Botucatu, 12 de abril de 2010.



Profª Drª PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO
Presidente - CEEA

Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br

