

***PROGRAMAÇÃO FETAL POR RESTRIÇÃO PROTEICA: AVALIAÇÃO
ESTRUTURAL DA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS WISTAR***

SELMA DE BASTOS ZAMBELLI FREITAS

*Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP como parte da
Defesa de Tese do curso de doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e
Aplicada, Área de concentração Biologia Celular
Estrutural e Funcional*

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

***PROGRAMAÇÃO FETAL POR RESTRIÇÃO PROTEICA: AVALIAÇÃO
ESTRUTURAL DA PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS WISTAR***

SELMA DE BASTOS ZAMBELLI FREITAS

PROFA. DRA. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO

*Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP como parte da
Defesa de Tese do curso de doutorado do
Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e
Aplicada, Área de concentração Biologia Celular
Estrutural e Funcional*

Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

***BOTUCATU – SP
2020***

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

Freitas, Selma de Bastos Zambelli.

Programação fetal por restrição proteica : avaliação estrutural do lobo ventral da próstata de ratos Wistar / Selma de Bastos Zambelli Freitas. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Patricia Fernanda Felipe Pinheiro

Capes: 20100000

1. Desenvolvimento fetal. 2. Nutrição - Pesquisa.
3. Deficiência de proteína. 4. Próstata. 5. Ratos Wistar.

Palavras-chave: Desenvolvimento fetal; Eixo hormonal reprodutivo; Nutrição materna.

Dedicatória

Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.”

(Cora Coralina)

A Deus, que ilumina e abençoa sempre meu
caminho;

Aos meus pais (in memoriam) que me ensinaram
que honestidade, humildade, gratidão e
conhecimento são os bens mais valiosos; como
diriam eles... “Ouro de mina”

Ao meu amado esposo, Carlos Eduardo, meus filhos
Rafael e Estephânia, meu neto Heitor, que sempre
me apoiaram e estimularam a prosseguir com o
amor e paciência incondicionais.

Minhas irmãs, Soraia e Solange, meu cunhado
Carlos e meus sobrinhos, presentes em todos os
momentos da minha vida.

A Profa. Dra. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro,
meu grande exemplo. É uma imensa honra tê-la
como orientadora e amiga. Seus ensinamentos, seus
preciosos conselhos e confiança estão gravados em
meu coração. Não tenho palavras que expressem
minha gratidão.

Agradecimentos

*“Não podemos acrescentar dias a nossa vida, mas
podemos acrescentar vida aos nossos dias”*

Cora Coralina

Tenho hoje a feliz oportunidade de agradecer a todos aqueles que me ajudaram de alguma forma para a conclusão de mais uma etapa da minha vida, me sinto abençoada por isso.

Nenhum trabalho é feito por apenas uma pessoa, sempre tem a colaboração direta ou indireta de outras pessoas. Minha eterna gratidão e profundo respeito a todas essas pessoas, em especial para Elaine Nunes de Lima, Alana Rezende Godoi, Luiz Antônio Lupi Junior, Margarete Jardimetti de Oliveira, Francis Lopes Pacagnelli, Gelson Rodrigues, Cristiane Abe e outros que não citei, mas estão no meu coração.

Cada um de vocês ajudaram de alguma forma para realização desse trabalho, serei eternamente grata.

Deixo aqui minha gratidão a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências de Botucatu – Programa Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – PG-BGA.

Minha gratidão a todos Professores, Funcionários e Amigos do Departamento de Anatomia/IBB/UNESP.

Aos animais de laboratório utilizados nessa
pesquisa.

Aos órgãos de fomento, Fapesp e CNPq.

Meus respeitosos agradecimentos pela rica
contribuição da banca de exame de qualificação e
pela participação dos membros da banca
examinadora de defesa.

Deixo aqui também meus mais sinceros e profundos
agradecimentos a Unoeste, Universidade do Oeste
Paulista, local onde eu, meu marido e meus filhos
nos graduamos. Meu amado local de trabalho, que
me apoiou, sem restrições, durante a minha
jornada.

Muito obrigada a família Oliveira Lima, Pró-reitor
Acadêmico José Eduardo Creste, aos coordenadores
de curso, Carlos Eduardo Assumpção de Freitas,
Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues, Maria Nilda
Camargo de Barros Barreto, Bruna Corral Garcia de
Araújo, Marilda Moreira da Silva, Vitor José Bazzo,
Luís Nascimento Ortega, Claudia de Oliveira Lima
Coelho e Eliane Cristina Gava Pizi por me
ajudarem de diferentes formas durante essa jornada.

Agradeço meus amigos e professores de departamento
que durante minhas ausências, ministravam as
minhas aulas, me apoiavam ou simplesmente me
ouviam, o que me fazia muito bem. Muito obrigada
Rodrigo Metzker Pereira Ribeiro, Luciana Alvares
Calvo, Felipe Viegas Rodrigues, Marcelo Ferreira de
Almeida, Eloisa Ferreira de Almeida Costa,
Margarete Jardimetti de Oliveira, Celso Sawaya
Neves e Marcelo Conrado.

“Não podemos, nunca, de jeito nenhum...

Amar mais ou menos,

Sonhar mais ou menos,

Ser amigo mais ou menos,

Ter fé mais ou menos,

E acreditar mais ou menos.

Senão, corremos o risco de nos tornarmos uma
pessoa mais ou menos’

Chico Xavier

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Hipótese sobre a influência da restrição alimentar materna sobre o desenvolvimento da próstata (Adaptado Rinaldi et al., 2018)06
- Figura 2:** Morfogênese da próstata ventral de rato (Adaptada de Prins & Putz, 2008).....10
- Figura 3:** Desenvolvimento pós-natal da próstata de cobaia (*Guinea pig*). Caracterização fenotípica das células epiteliais da próstata. Legenda: lúmen (L), estroma (E ou ES), célula intermediária (CI), célula basal (B), célula secretora (S), célula mióides (M), célula neuroendócrina (estrela ou NE), processo citoplasmático da célula NE (PC), célula basal (seta fina), célula intermediária (seta curva e cabeça de seta). Coloração marrom representa marcação dos antígenos estudados (p63, CK19, CK18, CgA, AR) p63 (proteína 63), citoqueratina 19 (CK19), citoqueratina 18 (CK18), cromogranina A (CgA), receptor de andrógeno (AR). Fonte: acervo particular da Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro.....11
- Figura 4:** Modelo de ação da grelina e da leptina sobre o eixo hipotálamo-hipófise-testículo. A leptina secretada pelos adipócitos estimula a liberação de GnRH no hipotálamo e inibe a estereidogênese nos testículos. A grelina secretada pelo sistema digestório inibe a secreção de LH (Adaptado de Barreiro & Tena-Sempere, 2004).....15
- Figura 5:** Ação dos andrógenos na diferenciação, formação e crescimento do sistema genital masculino de ratos durante a janela de programação masculinizante (15,5 e 18,5 dias do

desenvolvimento fetal). GT, tubérculo genital; VP, próstata ventral; WD, duto de Wolff; AGD, distância anogenital (Adaptado de Welsh et al., 2008).....18

Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos NP (a) e HP (b).....21

Figura 7: Filhotes do grupo NP (normoproteica) e do grupo RP (restrição proteica) aos 21 dias de idade.....27

FIGURA 8: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP imunomarcadas com p63. Imunomarcação das células p63⁺ (marrom) A, B, C e D) (21 dias de idade) e E e F (120 dias). Note a localização basal das células p63⁺ e as formas ovais e triangulares. (A e C) Barra = 100µm. (B, D, E e F) Barra = 10µm.....30

Figura 9: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP imunomarcadas com PCNA. Imunomarcação das células PCNA⁺ (marrom) A e B (21 dias de idade) e C e D (120 dias). Observe a marcação positiva nas células epiteliais e estromais. (A e B) Barra = 100µm e (C e D) Barra = 20µm.....31

Figura 10: Estudo estatístico da avaliação da população de células p63 e PCNA positivas nos grupos estudados. População de células p63 aos 21 dias de idade (NP=13,07±1,49; RP=17,94±1,90) (A) e aos 120 dias de idade (B). População de células PCNA positivas nos

grupos estudados aos 21 dias de idade NP=58,30±8,63; HP=47,53±9,12) (C) e aos 120 dias de idade (NP= 1,76±1,50; HP= 1,35±1,40) (D). Valores apresentados em média±desvio-padrão. *p <0.05, significância estatística comparada como grupo NP. Teste T foi aplicado para a verificação da significância de diferenças em dados paramétricos..... 32

Figura 11: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas com AR e com ER- α . Imunomarcação das células AR⁺ (marrom) (A e B). Barra = 20 μ m. Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas com Imunomarcação das células ER- α ⁺ (marrom) (C e D). Observe a marcação positiva nas fibras estromais. Note a marcação mais intensa no grupo NP (C). (C e D) Barra = 20 μ m.....33

Figura 12: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (120 dias de idade) imunomarcadas com AR e ER- α . Imunomarcação das células AR⁺ (marrom) (A e B). Note a marcação negativa em uma célula luminal (seta tortuosa) em (A) e em uma célula basal em (B) (seta tortuosa). Imunomarcação das células ER- α ⁺ (marrom) (C e D). Observe a marcação mais intensa no estroma em (C) e marcação na matriz citoplasmática de uma célula luminal (cabeça de seta) em (D). (A, B, C e D) Barra = 20 μ m.....34

Figura 13: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas co Ob-R. Imunomarcação das células Ob-R⁺ (marrom) (A e B). Note a marcação mais intensa no grupo NP (A). (A e B) Barra = 20 μ m. Figura 19:

Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas com GHRS-1a. Imunomarcação das células GHRS-1a⁺ (marrom) (C e D). Observe a marcação mais intensa no estroma do lobo ventral do grupo NP (C). (C e D) Barra = 20µm.36

Figura 14: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (120 dias de idade) imunomarcadas com Ob-R e GHRS-1a. Imunomarcação das células Ob-R⁺ (marrom) (A, B, C e D). Compare a imagem (A) com a imagem (C). A marcação é mais intensa no grupo RP (C) e há menos células marcadas (chave) no grupo NP (A). Em (B) célula luminal Ob-R⁺ (seta curva); célula luminal Ob-R- (seta tortuosa). Em (D) célula basal Ob-R⁺ (seta). Imunomarcação das células GHRS-1a⁺ (marrom) (E, F, G e H). Observe a marcação positiva no estroma do lobo ventral dos grupos NP e RP. Em (F) núcleos de células estromais marcadas. Em (H) célula luminal GHRS⁺ (seta curva); célula luminal GHS-R- (seta tortuosa). (A e C) Barra = 200µm. (B, D, F e H) Barra = 20µm. (E e G) Barra = 100µm. (F e H).....37

Figura 15: Avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona (ng/dL) e estradiol (pg/dL) nos grupos estudados. Concentração plasmática de testosterona nos grupos estudados aos 21 dias de idade (NP=120,05±30,68; RP=138,33±27,47) (A) e aos 120 dias de idade (NP=265,66±73,53; RP=218,00±71,84) (B). Concentração de estradiol (C) nos grupos estudados aos 21 dias de idade (NP=27,44±7,69; RP 6,66±8,73) (A) e aos 120 dias de idade (NP = 43,37±7,40; RP=28,12,00±6,17) (B). Valores apresentados em média±desvio-padrão. *p <0.05, significância estatística comparada como grupo NP. Teste Mann-Whitney foi

aplicado para a avaliação de significância para dados não paramétricos.....	39
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas isocalóricas.....	22
---	----

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos pesos absolutos e relativos do corpo, de órgãos e de gorduras e índices de adiposidade e gonadossomático dos grupos NP (normoproteica) e HP (restrição proteica) aos 21 e 120 dias de idade.	28
---	----

Tabela 3 - Sumário dos resultados sobre a intensidade da imunomarcção dos receptores de hormônios sexuais (AR e ER- α) e dos hormônios relacionados ao balanço energético (Ob-R e GHRS-1a), da frequência de células epiteliais p63 ⁺ e PCNA ⁺ do lobo ventral da próstata de ratos <i>Wistar</i> e concentrações plasmáticas da testosterona e do estradiol.....	53
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -Similaridades entre o modelo de restrição proteica para ratos e a síndrome metabólica humana	07
---	----

Quadro 2 – Características dos anticorpos.	25
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AGD – distância ano-genital	RP – restrição proteica
AR – receptor de andrógeno	SUG – seio urogenital
DHT – diidrotestosterona	T – testosterona
EGF – fator de crescimento epidermal	
ER-α – receptor de estrógeno alfa	
FGF – fator de crescimento de fibroblasto	
FP – programming fetal	
FSH – hormônio folículo estimulante	
GH – hormônio do crescimento	
GHSR-1a – receptor de grelina	
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina	
HPB – hiperplasia prostática benigna	
Insulin-like/IGF-I – fator de crescimento ligado à insulina	
KGF – fator de crescimento de queratinócito	
LH – hormônio luteinizante	
LNCaP – linhagens de células de carcinoma prostático dependente	
MPW – janela de programação masculinizante	
NP –normoproteica	
Ob-R – receptor de leptina	
P.A. – para análise	
PBS - phosphate buffered saline	
PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular	
PF – programação fetal	
PSA – antígeno prostático específico	

SUMÁRIO

RESUMO.....	02
ABSTRACT.....	03
INTRODUÇÃO.....	04
<i>Nutrição materna versus Programação fetal - Modelos experimentais.....</i>	<i>05</i>
<i>A restrição alimentar e suas influências na reprodução.....</i>	<i>07</i>
<i>Desenvolvimento da próstata.....</i>	<i>09</i>
<i>Leptina e Grelina: Ações sistêmicas no estado energético e o eixo hormonal reprodutivo.....</i>	<i>13</i>
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

A programação fetal (PF) é o resultado permanente do organismo na presença de estímulos ocorridos durante os períodos críticos de desenvolvimento. Vários fatores ambientais podem levar à PF. Entre eles, podemos citar a restrição alimentar materna ou a deficiência específica de nutrientes. De acordo com a janela de programação fetal masculinizante (MPW), os andrógenos agem para assegurar o desenvolvimento normal dos órgãos reprodutores do macho, assim, foram estudados os efeitos da restrição proteica materna durante a gestação e lactação sobre o desenvolvimento da próstata ventral de ratos Wistar. Para isto, dois grupos de ratas gestantes foram alimentadas com dietas isocalóricas, sendo um grupo normoproteico (NP) e o outro grupo hipoproteico (RP). Os grupos NP e RP tiveram livre acesso à dieta durante os períodos de gestação e lactação. Após o desmame, metade da prole de machos foi eutanasiada. A outra metade da prole de machos recebeu dieta padrão de animais de laboratório até os 120 dias de idade. A próstata ventral foi estudada por imuno-histoquímica para a avaliação da localização do antígeno de proliferação celular (PCNA), da proteína p63, dos receptores de andrógeno (AR), de estrógeno alfa (ER- α), de grelina (GHSR-1a), de leptina (Ob-R). Os pesos corpóreo, da próstata ventral, dos testículos e do tecido adiposo e os níveis de testosterona e estradiol foram obtidos. A PF determinou atraso no crescimento somático dos animais do grupo RP e diminuição do estradiol plasmático dos animais adultos do grupo RP. Aos 21 dias de idade, os animais do grupo RP apresentaram imunomarcção menos intensa para o ER- α , GHSR- 1a e Ob-R comparada aos animais do grupo NP. Aos 120 dias, os animais do grupo NP apresentaram imunomarcção menos intensa para o ER- α e AR, e imunomarcção mais intensa para o GHSR- 1a e Ob-R comparada aos animais do grupo NP. A análise dos índices de proliferação celular indicou não haver diferenças entre os grupos estudados de acordo com as duas idades. O estudo da frequência de células p63⁺ no lobo ventral da próstata dos animais dos grupos NP e RP mostrou que a PF interferiu somente na população de células basais aos 21 dias de idade. O grupo RP apresentou mais células basais p63⁺. Neste estudo observou-se que a exposição do feto ao baixo teor de proteínas durante o desenvolvimento pré-natal e perinatal programou o atraso no crescimento somático da prole dos 21 aos 120 dias e alterou o fenótipo epitelial das células do lobo ventral da próstata que expressam os receptores AR, ER- α , Ob-R e GHSR-1a e p63.

Palavras-chave: programação fetal, receptor de andrógeno (AR), receptor de leptina (Ob-R), receptor de grelina (GHS-R 1a), receptor de estrógeno, proliferação celular (PCNA), próstata.

ABSTRACT

Fetal programming (FP) is the permanent result of the organism in the presence of stimuli during the periods of development. Several environmental factors can lead to FP. Among them, we can mention the maternal food restriction or deficiency of specific nutrients. According to the masculinization programming window (MPW) in which androgens act to ensure normal development of the male reproductive organs, we studied the effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation period on the development of the Wistar rat ventral prostate. Dams of the group (NP) were fed diet containing 17% protein; Dams of the group (RP) were fed diet containing 8% protein. The NP and RP groups had free access to diet during pregnancy and lactation period. After weaning, half of the male pups was killed. The other half of male pups received a standard laboratory diet until 120 days old. The ventral prostate was studied immunohistochemically to evaluate the expression of cell proliferation antigen (PCNA), p63 protein, androgen (AR), alpha estrogen (ER- α), ghrelin (GHSR-1a), leptin (Ob -R) receptors. The body, ventral prostate, testes and adipose tissue weights, testosterone and estradiol levels were determined. FP determined a delay somatic growth of the RP group and decrease of the plasmatic estradiol of the adult animals of the RP group. At 21 days of age, the RP group presented less intense immunostaining for ER- α , GHSR-1a, and Ob-R when compared to the NP group. At 120 days, the RP group showed less intense immunostaining for ER- α and AR, and more intense immunostaining for GHSR-1a and Ob-R when compared to the NP group. Analysis of cell proliferation rates does not indicate differences between the groups studied. The study of the frequency of p63⁺ cells in the ventral prostate showed that a FP interfered only in the population of basal cells at 21 days of age. The RP group presented more p63⁺ cells. This study showed that protein restriction during pregnancy and lactation delays the somatic growth from 21 to 120 days the postnatal development and alters the plasmatic estradiol and the epithelial phenotype of the rat ventral prostate epithelium, which express the AR, ER- α , Ob-R and GHSR-1a and p63.

Key-words: fetal programming, androgen receptor (AR), leptin receptor (Ob-R), ghrelin receptor (GHS-R 1a), alpha estrogen receptor (ER- α) antigen cell proliferation (PCNA), prostate.

INTRODUÇÃO

O evento da programação fetal (PF), segundo Lucas (1991), é considerado como o resultado permanente do organismo na presença de estímulos ocorridos durante períodos críticos do desenvolvimento pré-natal. O feto ou neonato exposto a um ambiente não usual, durante o seu desenvolvimento, pode apresentar resposta adaptativa duradoura, que se expressa fenotipicamente durante a vida adulta. Nesta fase, os efeitos da PF podem ser refletidos por adaptações irreversíveis que acarretam inadequado funcionamento de órgãos, bem como o comprometimento de sua longevidade. A PF é, portanto, uma resposta adaptativa às condições intrauterinas que, de maneira geral, são adversas e ocorrem em um momento de elevada vulnerabilidade (Pôrto, 2003; Ross & Desai, 2005).

Seguindo os princípios da teoria da PF, a hipótese do fenótipo econômico (“*the thrifty phenotype*”) lançada por Hales & Barker (1992) propõe que alterações metabólicas surgem durante o período fetal, quando esse é privado de um ambiente intrauterino saudável, tornando necessário priorizar o uso dos nutrientes que se encontram escassos para assim completar da melhor forma o desenvolvimento. Com isso, duas consequências relacionadas à disponibilidade de nutrientes no período pós-natal podem ser observadas: uma vantajosa, caso o aporte de nutrientes continue abaixo do recomendado no período pós-natal, ou, prejudicial, se após o nascimento fosse ofertado ao conceito uma dieta com quantidades adequadas de calorias ou mesmo uma dieta hipercalórica. Nessa condição, o indivíduo pode ter o seu crescimento e desenvolvimento ocorrendo em velocidade mais rápida, acima dos limites normais considerados para a idade. Esse fenômeno denomina-se “*catch-up growth*”, podendo o indivíduo desenvolver um quadro de alterações metabólicas sistêmicas e até mesmo a obesidade precoce, sendo que a última pode evoluir para uma morte prematura devido ao dano telomérico no DNA renal (Kay's & Hindmarsh, 2006; Ozane, 2001)

Segundo as observações de Everttts et al. (2010), a epigenética é o fator determinante para o entendimento das alterações funcionais relacionadas à PF. A epigenética é o estudo das alterações hereditárias no fenótipo que não envolvem mutações na sequência do DNA, tais como a metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e RNAs não-codificantes. Assim, alterações fenotípicas quanto ao número de células, à estrutura de órgãos, aos níveis hormonais, à expressão gênica de proteínas, entre outras manifestações estruturais e funcionais têm sido relacionadas a programação fetal e são explicadas pela epigenética. (Ross & Desai, 2005; Everttts et al., 2010; Wang et al., 2012).

Nutrição materna versus Programação fetal

Modelos experimentais

A Organização Mundial de Saúde considera haver desnutrição quando se tem falhas, aumento ou desproporção na ingestão de energia ou no consumo de determinados micronutrientes. A desnutrição inclui quadros funcionais de perda de peso, baixa estatura, excesso de peso, obesidade e doenças não transmissíveis relacionadas à dieta (como doença cardíaca, acidente vascular cerebral, diabetes e alguns tipos de câncer) (WHO, Disponível em: <<https://www.who.int/features/qa/malnutrition/en/>> Acesso em: 01 de abril de 2019).

É fato que fatores genéticos e ambientais, como nutrição materna, têm papel fundamental na plasticidade da PF (Guoyao et al., 2012). Para o crescimento e desenvolvimento normal de humanos e animais experimentais, é imprescindível que haja boa condição nutricional da mãe durante a gestação e a lactação (Ramos, 2009). O feto fica desnutrido quando a taxa e composição de nutrientes ofertado pela mãe, para seu crescimento e desenvolvimento, é inferior às suas necessidades (Roseboom, 2001; Rinaldi et al., 2018).

O estado nutricional materno deficiente durante a gestação, altera o processo de desenvolvimento e adaptações fisiológicas ocorrem no feto para assegurar o suprimento de nutrientes para os órgãos mais vitais à custa de outros, levando a consequências irreversíveis

na formação e diferenciação dos tecidos. Além disso, a restrição alimentar durante o desenvolvimento fetal altera direta ou indiretamente a síntese e liberação dos principais hormônios como estrógenos e andrógenos, a expressão e a distribuição dos receptores hormonais (Figura 1) (Rinaldi, et al. 2018).

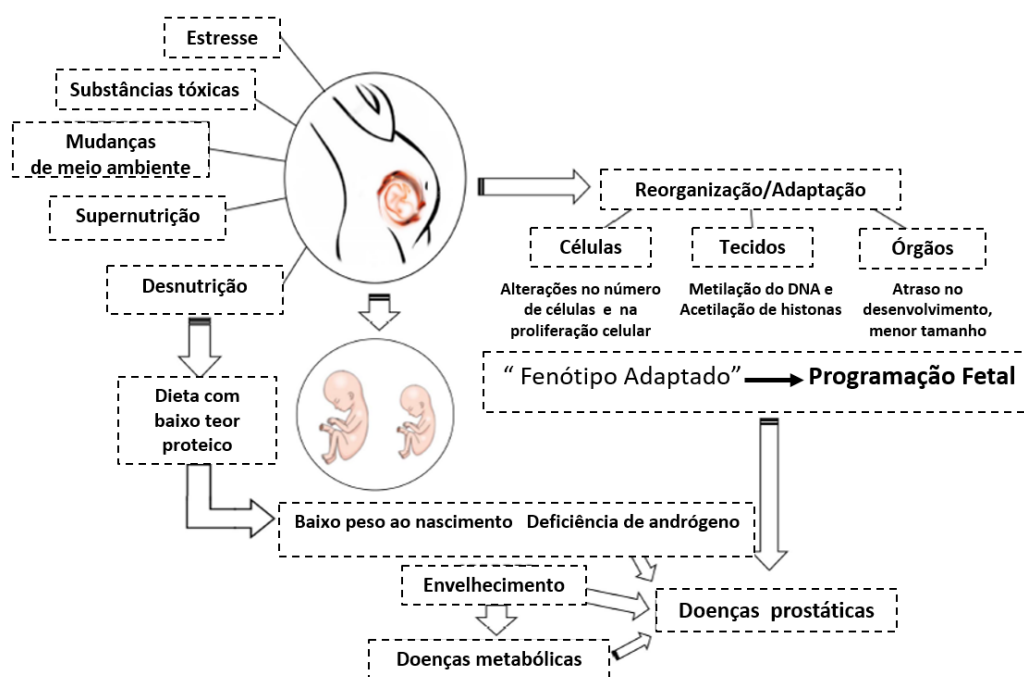


Figura 1: Hipótese sobre a influência da restrição alimentar materna sobre o desenvolvimento da próstata (Adaptado Rinaldi et al., 2018).

Os principais modelos experimentais de animais utilizados para investigar o impacto da dieta materna sobre a programação a longo prazo têm sido os ratos e as ovelhas. A vantagem de utilizar ratos baseia-se, principalmente, no curto período gestacional e no número de filhotes por ninhada (McMillen & Robinson, 2005).

Nos estudos experimentais com restrição alimentar, a restrição com reduzida quantidade de proteínas é a condição mais utilizada. Este modelo induz nos ratos alterações físicas, metabólicas e teciduais similares às encontradas na síndrome metabólica humana (Quadro 1) (Ozanne, 2001). Lucas et al. (1996) relataram, que em longo prazo, houve redução

nos níveis plasmáticos de triglicerídeos, HDL (*High Density Liproteins* – Lipoproteína de alta densidade) e colesterol total de ninhadas de ratas tratadas com dieta de baixo teor de proteína.

Quadro 1: Similaridades entre o modelo de restrição proteica para ratos e a síndrome metabólica humana:

<i>Alterações</i>	<i>Características e/ou Descrição</i>
Físicas	Baixo peso ao nascimento
Metabólicas	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2, resistência à insulina e hipertensão arterial
Teciduais	Alteração na regulação hepática de glicose

Ratas alimentadas, durante a gestação, com dietas contendo teores proteicos de 5 a 8% produziram proles com restrição de crescimento. Porém, após 21 dias de idade a prole recuperou o peso corpóreo em relação à prole controle e, na vida adulta, desenvolveram obesidade precoce (“*catch-up growth*”). Essa obesidade parece ter efeito deletério na longevidade, resultando na morte prematura que está associada à perda do DNA telomérico no rim (Ozanne, 2001).

A restrição alimentar e suas influências na reprodução

A desnutrição é conhecida por ter uma grande variedade de efeitos no sistema endócrino (Teixeira, 2002). Chen et al. (2005) relataram que a restrição alimentar calórica oferecida a ratas provoca elevada expectativa de vida, retardo no envelhecimento dos órgãos genitais e redução da taxa de reprodução. No desenvolvimento da prole, esses autores também observaram atraso na puberdade e aumento no intervalo entre as ninhadas.

A reprodução é essencial para a sobrevivência das espécies, mas é suprimida quando o balanço energético é negativo, especialmente em fêmeas devido altas demandas energéticas durante a gravidez e lactação. (Rhinehart, 2016).

O balanço energético é conceituado como um equilíbrio entre ganhos e gastos energéticos. A competência reprodutiva é definida como capacidade de gerar gametas viáveis e manutenção da gravidez e lactação, eventos esses coordenados pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Para sobrevivência e manutenção das espécies, é fundamental o equilíbrio entre balanço energético e competência reprodutiva. (Repaci, et al., 2011).

A restrição alimentar prejudica o *status* reprodutivo, além diminuir a expressão do receptor de andrógeno (AR) nos testículos de ratos adultos. Nos ratos adultos, a restrição alimentar pode reduzir as massas do corpo, dos testículos, do epidídimo e da próstata. Na desnutrição observa-se que a redução nas concentrações dos hormônios luteinizante (LH), folículo-estimulante (FSH) e testosterona (T) está associada a modificações estruturais dos órgãos genitais. (Grewal et al., 1971, Howland, 1975; Herbert, 1980; Chik et al., 1985, 1989; Dong et al., 1994; Young et al. 2000; Ramos et al., 2009)

Estudos mostram que a incidência de distúrbios metabólicos e a diminuição da fertilidade masculina na vida adulta estão relacionadas com a desnutrição materna por dieta de baixa proteína, impactando conjuntamente no crescimento, morfogênese tecidual e incidência de lesão da próstata conforme o crescimento (Shappell et al., 2004; Ramos et al., 2009; Rinaldi et al., 2013).

Em estudo realizado com ratas tratadas com dieta hipoproteica (6% de proteína) durante a gestação e dieta com teor normal de proteínas na lactação, Rinaldi et al. (2013) observaram que a prole apresentou baixo peso no nascimento, redução na distância ano-genital (AGD) e nos níveis plasmáticos de andrógenos dos filhotes machos. Além disso, os lobos prostáticos apresentaram menor peso, menor altura da célula epitelial e diâmetro

alveolar. Houve o aumento do índice de proliferação celular do epitélio e na deposição de colágeno, notando-se também maiores incidências de displasia epitelial e prostatite. A diminuição nos pesos dos testículos e dos epidídimos também foi registrada pelos pesquisadores (Rinaldi et al., 2013).

Anormalidades morfológicas nos espermatozoides, redução na motilidade espermática, no número de células de Sertoli e na contagem de espermatozoides no testículo e na cauda do epidídimo são características também observadas na prole de ratas que sofreram restrição proteica durante a gestação (Toledo et al., 2011).

Segundo Skakkebaek (2007), alterações no desenvolvimento sexual masculino podem ter como mecanismo a epigenética, no qual temos como papel central os genes encontrados no zigoto e os fatores ambientais que diretamente interferem na diferenciação das gônadas, da genitália externa e das glândulas sexuais acessórias.

Desenvolvimento da próstata

Em ratos, o desenvolvimento e o crescimento da próstata têm início na vida fetal e são concluídos durante a maturidade sexual. Durante este período, a modulação hormonal pode apresentar efeito permanente e irreversível na morfologia prostática, refletindo na sua organização celular e funcional (Ramos et al., 2009).

A próstata desenvolve-se do seio urogenital (SUG), uma subdivisão da cloaca. Nos camundongos, o SUG desenvolve-se aproximadamente 13 dias pós-concepção; em humanos, aproximadamente em 7 semanas de gestação. O SUG de camundongos machos e fêmeas é morfológicamente indistinguível até 17,5 dias pós-concepção e nos humanos entre 10^a a 12^a semanas de gestação. Após essa idade, começa a morfogênese prostática com a circulação de andrógenos produzidos pelos testículos fetais (Marker et al., 2003).

Em estudos comparativos entre roedores e humanos, indicaram a morfogênese e o desenvolvimento prostático ocorre de maneira análoga. Tal fato favorece estudos morfofuncionais prostáticos entre essas espécies (Camargo, 2017).

Nos ratos, entre a segunda e terceira semanas pós-natal ocorre a diferenciação das células epiteliais e mesenquimais/estromais, simultaneamente ao processo de morfogênese e ramificação ductal (Figura 2) (Prins & Putz, 2008).

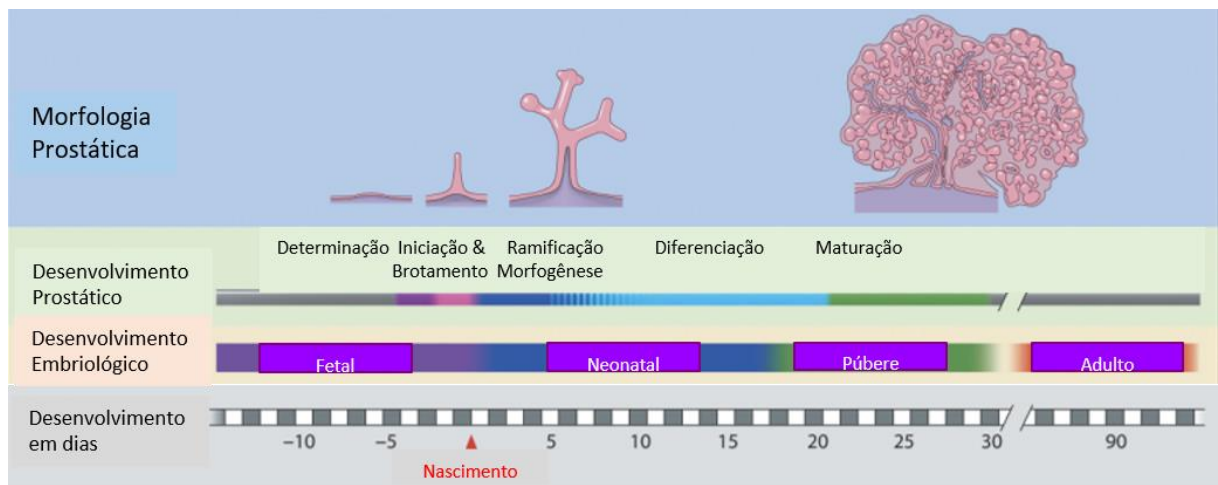


Figura 2: Morfogênese da próstata ventral de rato (Adaptada de Prins & Putz, 2008).

Nesta etapa, as células epiteliais em desenvolvimento formam botões prostáticos sólidos, caracterizados fenotipicamente pela co-expressão das citoqueratinas 5, 8, 14 e 18, p63 e AR (Wang et al., 2001). Após o processo de ramificação ductal, o epitélio prostático se reorganiza em dois estratos de células distintas, o estrato basal e o luminal. As células epiteliais basais formam uma camada descontínua que expressam citoqueratinas 5 e 14, e a proteína p63. As células luminiais colunares altas alinham-se formando o lúmen ductal e se caracterizam por expressarem citoqueratinas 8 e 18 (Hayward et al., 1996a) (Figura 3).

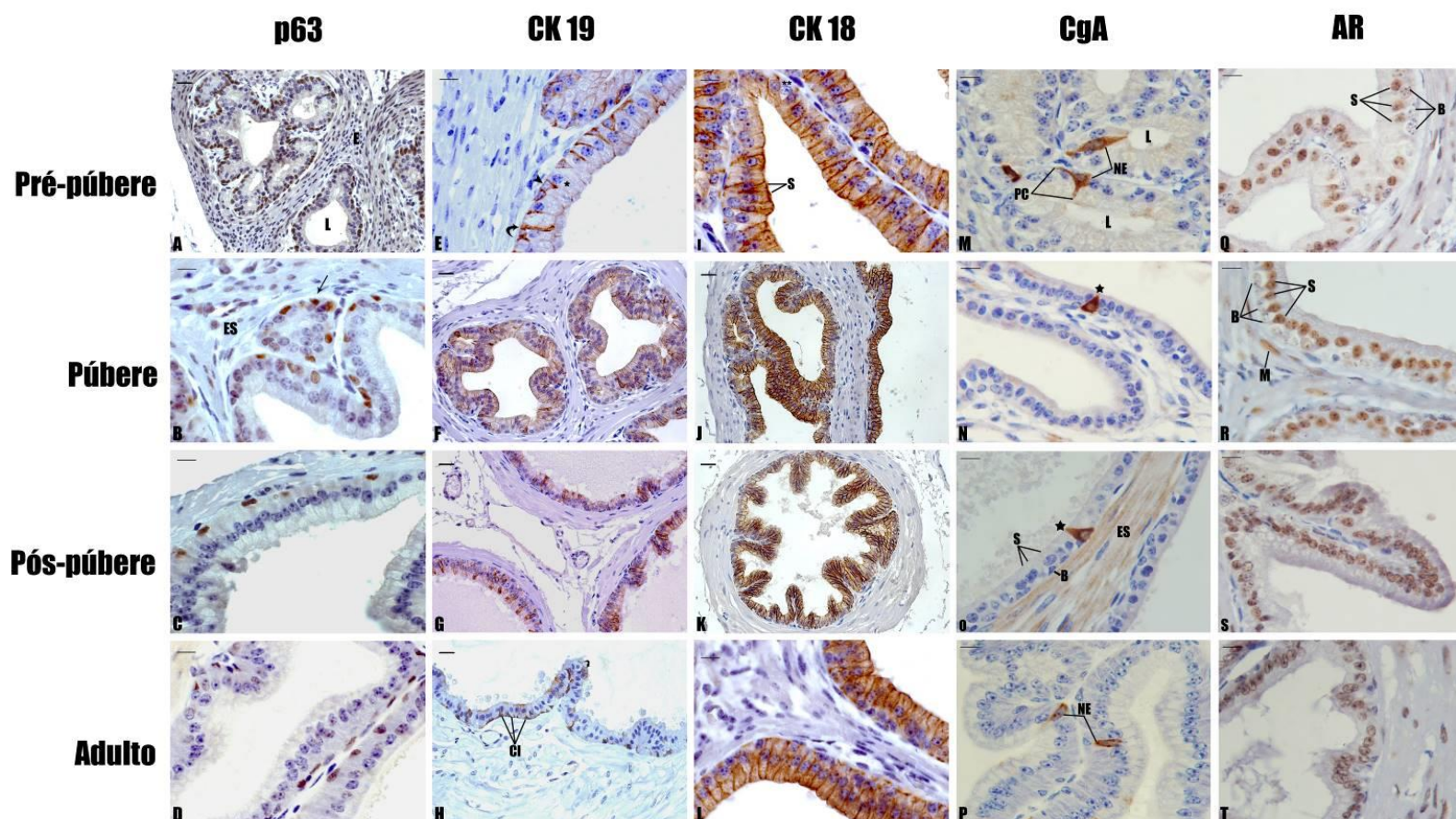


Figura 3: Desenvolvimento pós-natal da próstata de cobaia (*Guinea pig*). Caracterização fenotípica das células epiteliais da próstata. Legenda: lúmen (L), estroma (E ou ES), célula intermediária (CI), célula basal (B), célula secretora (S), célula mióides (M), célula neuroendócrina (estrela ou NE), processo citoplasmático da célula NE (PC), célula basal (seta fina), célula intermediária (seta curva e cabeça de seta). Coloração marrom representa marcação dos antígenos estudados (p63, CK19, CK18, CgA, AR) p63 (proteína 63), citoqueratina 19 (CK19), citoqueratina 18 (CK18), cromogranina A (CgA), receptor de andrógeno (AR). Fonte: acervo particular da Profa. Dra. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro.

Concomitantemente ao processo de diferenciação celular do epitélio prostático, o estroma de origem mesenquimal se diferencia em uma camada de células musculares lisas que circunda os ductos prostáticos (Hayward et al., 1996b).

O desenvolvimento, o crescimento normal, a diferenciação e a manutenção morfofuncional da próstata, bem como o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (HPB) e do câncer prostático dependem do eixo hipotálamo-hipófise-testículo-adrenal que inclui: (1) síntese de testosterona (T) pelos testículos e glândulas adrenais, (2) conversão da T em diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α redutase, (3) transporte da DHT aos tecidos alvos e (4) ligação da DHT ao receptor com consequente modulação dos genes (Buchanan et al., 2001). A DHT torna-se fisiologicamente ativa pela ligação com o receptor de andrógeno (Griffiths et al., 1997). A ligação resulta em uma cascata de eventos necessária para a formação de fatores de sinalização que regulam o crescimento celular. Essa ligação causa a produção do antígeno prostático específico (PSA) e de proteínas reguladoras que modulam o crescimento e a função celular (Gnanapragasam et al., 2000).

No adulto, a DHT e outros andrógenos contribuem para a manutenção da homeostase entre o processo de proliferação e morte celular por apoptose. A proliferação celular e a apoptose são mecanismos andrógenos dependentes na próstata. A DHT indiretamente regula a expressão de genes que controlam a proliferação e a morte celular pelo controle da expressão e secreção de fatores de crescimento (Niu et al., 2001). Nos humanos, a DHT pode estimular a produção do fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), fator de crescimento ligado à insulina (insulin-like/IGF-I), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e outros (Kim et al., 1996; Carson III & Rittmaster, 2003).

Estudos demonstraram que o estrógeno, juntamente com outros fatores endógenos associados ou não ao balanço energético do organismo, pode estimular o aparecimento da

HPB e do câncer prostático. Segundo Santti et al., (1994), esse hormônio induziria a transformação maligna em células da próstata durante o desenvolvimento do animal.

Com relação aos fatores endógenos associados ao balanço energético do organismo, a leptina e a grelina possuem relevante atuação na manutenção e nas alterações estruturais e funcionais do sistema genital masculino.

Leptina e Grelina: Ações sistêmicas no estado energético e o eixo hormonal reprodutivo

Os avanços no conhecimento do controle do sistema neuroendócrino sobre as diferentes funções do corpo têm ajudado a identificar a estreita relação entre os sistemas responsáveis pelo crescimento somático, balanço energético e reprodução. A importante relação entre os estoques de energia suficientes para o adequado crescimento, desenvolvimento púbere e manutenção da fertilidade são bem conhecidos (Casanueva & Dieguez, 1999). Entretanto, somente recentemente, houve a descoberta dos sinais moleculares responsáveis pelo controle integrado dos sistemas somáticos (Teerds et al., 2011).

Neste contexto, a leptina é provavelmente o mais importante hormônio integrador neuroendócrino. A leptina é produzida principalmente no tecido adiposo e atua como fator indicador de saciedade. Ela sinaliza aos centros hipotalâmicos controladores da ingestão de alimentos a quantidade de reserva de energia do organismo. Portanto, a leptina constitui um elemento essencial na homeostase do peso corporal (Casanueva & Dieguez, 1999; Ahima et al., 2000).

Após a sua descoberta, tornou-se evidente que além do seu envolvimento no balanço energético, a leptina apresenta funções neuroendócrinas relacionadas ao crescimento e ao eixo reprodutivo (Wauters & Considine, 2000). Os hormônios leptina, FSH e LH são considerados os fatores neuroendócrinos mais importantes na regulação do sistema genital (Teerds et al., 2011).

Na próstata reconhece-se a síntese de leptina e a expressão de seus receptores (Malendowicz, et al., 2006; Kim, et al., 2008). Este hormônio tem sido associado a doenças da próstata, mas o seu papel na próstata normal ou alterada ainda não foi completamente esclarecido. Vários trabalhos mostram que há uma ligação entre a obesidade, a hiperplasia prostática benigna e o câncer prostático (Ribeiro et al., 2006; Parsons et al., 2009). O aumento na expressão de leptina na próstata está relacionado com a progressão e o grau de malignidade do câncer. É também conhecido que a leptina estimula proliferação celular na hiperplasia prostática benigna (Saglam et al., 2003).

A leptina e a grelina possuem papéis opostos na homeostase do peso corpóreo. A leptina é o fator de saciedade que indica os sinais de abundância de energia. A grelina é o fator orexígeno, ou seja, indica os sinais de insuficiência de energia (Zigman & Elmquist, 2003).

A grelina é considerada um dos mais poderosos agentes orexígenos da fisiologia de mamíferos (Muccioli et al., 2002; Kojima & Kangawa, 2005;). Trata-se de um peptídeo produzido predominantemente, pelo estômago, sendo também expresso no pâncreas, intestino, rins, testículo, pulmão e hipotálamo (Kojima & Kangawa, 2005).

No núcleo arqueado do hipotálamo, especificamente nos neurônios que co-expressam os peptídeos orexigênicos NPY e peptídeo relacionado Agouti (AGRP), os receptores de grelina, GSHR-1a, são ricamente expressos, favorecendo o ganho de peso. (Repaci et al., 2011).

Alguns estudos em animais mostraram que a grelina é capaz de suprimir a secreção do LH *in vivo* e diminuir a resposta do LH ao estímulo do hormônio liberador de gonadotrofina (GRH) *in vitro* (Furuta et al., 2001; Fernandez-Fernandez et al., 2004; Vulliemoz et al., 2004; Iqbal et al., 2006).

A grelina e seu receptor foram identificados nas gônadas do homem e do rato (Tena-Sempere et al., 2002; van der Lely et al., 2004), atuando de forma inibitória sobre a secreção de testosterona testicular (Iqbal et al., 2006). Em ratos, a administração repetida de grelina induz a um atraso parcial no início da puberdade (Fernandez-Fernandez et al., 2005).

O envolvimento da grelina no câncer de próstata foi demonstrado apenas nos últimos anos. Foi demonstrado que a grelina e seus receptores são expressos em carcinomas prostáticos humanos, na hiperplasia prostática benigna e em linhagens de células de carcinoma prostático dependente (LNCaP) e independente (DU-145 e PC-3) de andrógenos.

Em suma, pode-se concluir que a grelina e a leptina são moduladores neuroendócrinos envolvidos no controle de um amplo espectro de funções biológicas, incluindo equilíbrio energético. A figura 4 ilustra a atuação da grelina e da leptina no controle integrado do equilíbrio da energia e da reprodução.

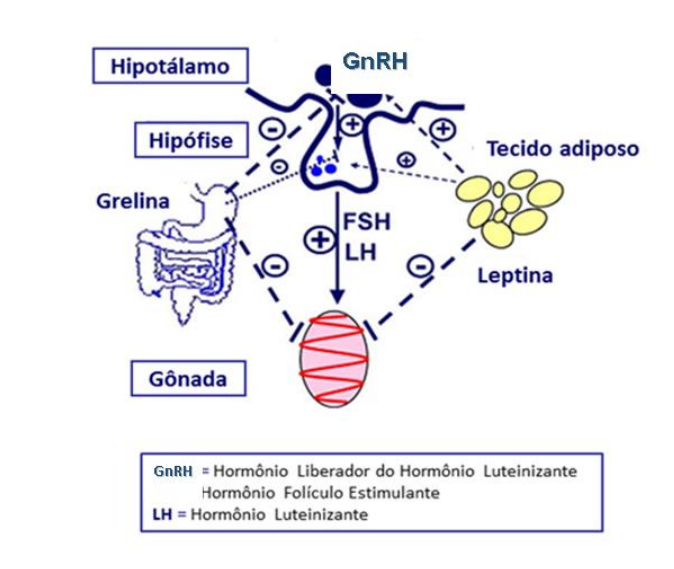


Figura 4: Modelo de ação da grelina e da leptina sobre o eixo hipotálamo-hipófise-testículo. A leptina secretada pelos adipócitos estimula a liberação de GnRH no hipotálamo e inibe a estereoidogênese nos testículos. A grelina secretada pelo sistema digestório inibe a secreção de LH (Adaptado de Barreiro & Tena-Sempere, 2004).

Observa-se que tem havido uma significativa mudança no pensamento sobre a nutrição, desde uma procura de alimentos que satisfaçam as necessidades nutricionais dos indivíduos, até seus efeitos sobre a saúde, incluindo doenças degenerativas, câncer e perda da função cognitiva (Barker 1993; Iarc, 1990; Lucas, 1994; Lucas, 1998).

O câncer de próstata é uma das maiores causas de mortalidade entre os homens. A busca do conhecimento sobre uma dieta capaz de prevenir e controlar a progressão desse tipo de câncer torna-se cada vez mais necessária (Bosland et al., 1999). Sabe-se que dietas com elevado teor de gordura induzem o aparecimento de câncer em cobaias; já as dietas hipocalóricas são capazes de inibi-los (Tannenbaum, 1942; 1944; 1945; Bosland et al., 1999).

Em estudo experimental, Mukherjee et al. (1999) relataram a relação entre a gordura, a energia e os riscos de câncer de próstata em cobaias submetidas à dieta de restrição de consumo de energia. Neste estudo, os autores observaram significativa redução na atividade proliferativa das células cancerígenas (Mukherjee et al., 1999).

Muitas anomalias no desenvolvimento sexual masculino podem ser atribuídas ao genótipo do zigoto e ao impacto dos fatores ambientais que influenciam a diferenciação das gônadas, das glândulas sexuais acessórias e da genitália externa (Skakkebak et al., 2001, 2007).

A restrição alimentar ocorrida durante os períodos pré-natal e de lactação pode, por exemplo, provocar alterações no desenvolvimento tecidos, na secreção de hormônios ou sensibilidade tecidual a eles ao longo da vida (Drake & Walker, 2004; McMillen & Robinson, 2005; McArdle, 2006; Barker, 2007; Leandro et al., 2009).

No período de desenvolvimento do rato conhecido como “janela de programação fetal masculinizante” (MPW), os andrógenos atuam influenciando a formação, a proliferação e o crescimento normal do sistema genital masculino (Figura 5) (Welsh et al., 2008). Portanto, com base na relação direta entre o balanço energético (dieta alimentar), o desenvolvimento, o

crescimento e a manutenção da próstata, bem como o surgimento de doenças como câncer prostático, torna-se imprescindível considerar a atuação da leptina, da grelina e de seus respectivos receptores no estudo do desenvolvimento pós-natal da próstata.

A complexa rede do controle funcional da próstata envolve também hormônios associados ao estado energético do indivíduo. A leptina e a grelina são exemplos desses hormônios que concorrem para garantir a manutenção da homeostasia e dos estados patológicos da próstata (Malendowicz, et al., 2006; Cassoni, 2004; Habib et al., 2015). Neste sentido, optou-se por estudar os possíveis efeitos da PF por restrição proteica sobre o lobo ventral da próstata de ratos desmamados e adultos avaliando, principalmente, a imunorreatividade do lobo ventral da próstata aos receptores AR, ER- α , Ob-R e GHSR-1a.

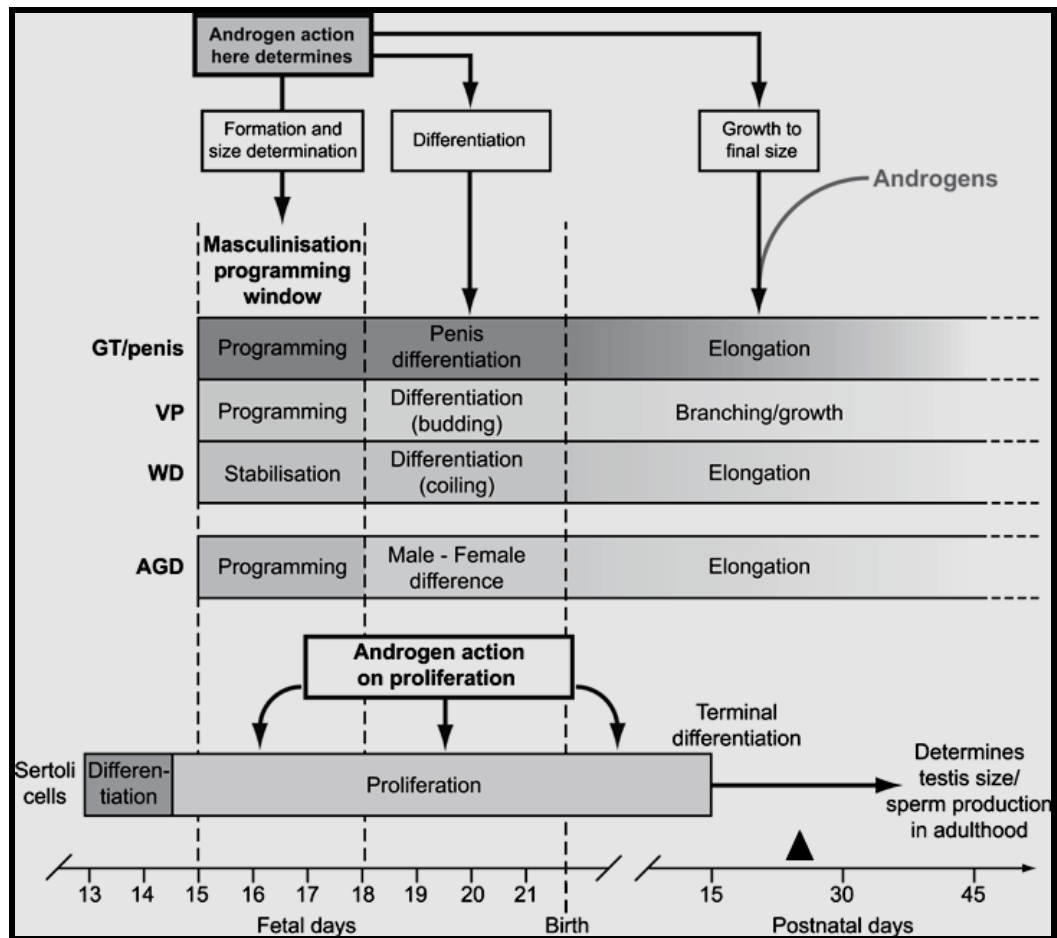


Figura 5: Ação dos andrógenos na diferenciação, formação e crescimento do sistema genital masculino de ratos durante a janela de programação masculinizante (15,5 e 18,5 dias do desenvolvimento fetal). GT, tubérculo genital; VP, próstata ventral; WD, duto de Wolff; AGD, distância anogenital (Adaptado de Welsh et al., 2008).

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar a resposta adaptativa estrutural da próstata ventral da prole de ratos de mães submetidas à restrição proteica no período gestacional e de lactação.

Objetivos Específicos

Avaliar a possível influência da PF por restrição proteica em ratos desmamados e adultos sobre:

- Parâmetros biométricos (avaliação dos pesos corpóreo, do lobo ventral da próstata, das gorduras visceral, retroperitoneal e epididimária);
- A distribuição e a frequência das células epiteliais prostáticas basais;
- A imunolocalização dos receptores AR, ER α , Ob-R, GHS-R-1a;
- A imunolocalização do PCNA;
- A determinação do índice de proliferação celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

No presente estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar, dos machos (n=8) e fêmeas (n=16), provenientes do Biotério do Central da UNESP - Câmpus de Botucatu.

Para o acasalamento das matrizes, duas ratas e um macho, com três meses de idade, foram alojados em caixas durante o ciclo escuro para o acasalamento. Nas manhãs seguintes ao pareamento das matrizes, realizou-se o esfregaço vaginal para a verificação da presença de espermatozoides e da fase de estro, determinando assim o dia 0 da gestação. Durante o experimento, as ratas prenhez permaneceram isoladas em caixas individuais e constituíram os grupos maternos experimentais.

Delineamento Experimental

A partir do dia 0 da gestação (DG0) as ratas foram distribuídas em dois grupos:

Grupo Normoproteico (NP): recebeu durante a gestação e lactação com dieta normoproteica *ad libitum* (17%) (n=8) (Figura 6a);

Grupo Restrição Proteica (RP): recebeu durante a gestação e lactação com dieta hipoproteica *ad libitum* (6%) (n=8) (Figura 6b).

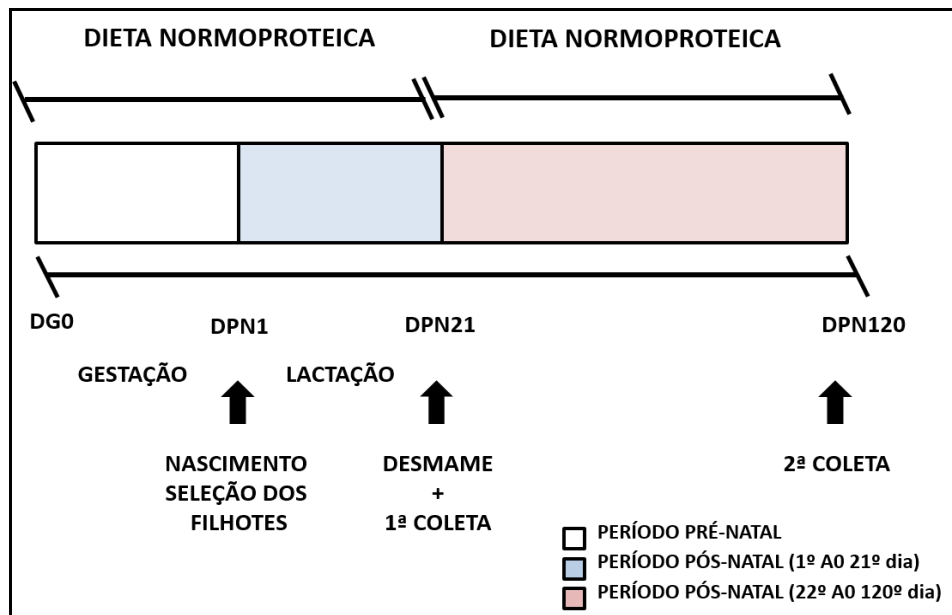
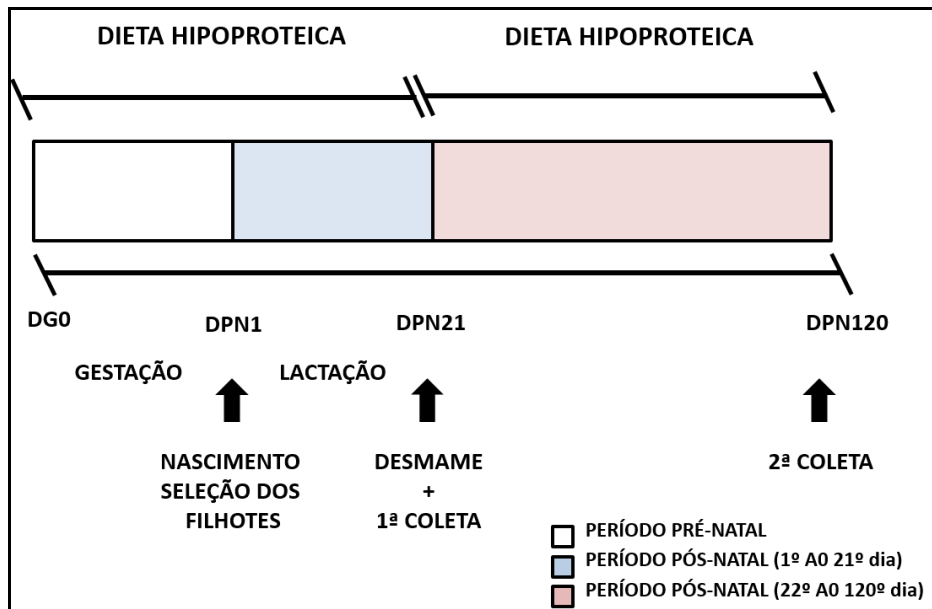
(a) GRUPO NORMOPROTEICO**(b) GRUPO RESTRIÇÃO PROTEICA**

Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental dos grupos NP (a) e RP (b).

As dietas normoproteica e hipoproteica *ad libitum* foram administradas até o dia do desmame da prole e, após esse período, foi fornecida a dieta padrão para roedores (Tabela 1).

No dia do nascimento, foi realizada a sexagem e pesagem da prole. Para haver o mesmo cuidado materno e a mesma oferta de leite materno entre todos os indivíduos da prole, optou-se por fixar a ninhada em 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas) até o desmame. Aos 21 dias de idade, dois ratos machos de cada matriz foram submetidos à eutanásia. Os demais ratos receberam dieta sólida padrão para roedores *ad libitum* até o DPN120, quando, então, foram mortos para a coleta de órgãos, tecidos e sangue. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, conforme a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) (Protocolo 264/11-CEUA/IBB).

Tabela 1 – Composição das dietas isocalóricas

Componentes (gramas)*	Normoproteica (17% de proteína)	Hipoproteica (6% de proteína)
Caseína (84% de proteína)**	202,00	71,50
Amido de Milho	397,00	480,00
Dextrina	130,50	159,00
Sacarose	100,00	121,00
Óleo de Soja	70,00	70,00
Fibra (microcelulose)	50,00	50,00
Mistura de Minerais ***	35,00	35,00
Mistura de Vitaminas ***	10,00	10,00
L – cistina	3,00	1,00
Cloreto de Colina	2,50	2,50

*Dieta para a fase de gestação em roedores - AIN-93G;

** Valores corrigidos de acordo com o conteúdo de proteína na caseína;

*** Segundo AIN-93G (American Institute of Nutrition Rodent Diets, Reeves et al., 1993).

Parâmetros biométricos e índice de adiposidade

Os ratos foram anestesiados em câmara de CO₂ e mortos por decapitação. Posteriormente, realizou-se a laparotomia e o complexo uretro-prostático (DPN21) ou lobo ventral da próstata (DPN120) e os testículos dos ratos foram coletados, dissecados e pesados. As gorduras visceral, retroperitoneal e epididimária foram coletadas e pesadas. Os ratos no DPN21 não apresentaram depósito de gordura retroperitoneal. O índice de adiposidade foi calculado pela relação da soma das gorduras corpóreas sobre o peso corpóreo X 100 $[(\sum \text{gorduras corpóreas} / \text{peso corpóreo}) \times 100]$.

Análise Histológica

As amostras do complexo prostático ou lobo ventral da próstata foram fixadas por imersão em solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 24 horas, lavados em água corrente e colocados em álcool 70%. Na sequência, os materiais foram desidratados em solução crescente de álcoois, diafanizados, incluídos em paraplastico e cortados com 4µm de espessura. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). Em seguida, as lâminas foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio BX 41 – 2 com câmera digital, modelo SIS-SC30, Olympus.

Análise imuno-histoquímica

As secções histológicas foram desparafinizadas em xilol e álcool e lavadas em tampão fosfato (PBS). Na sequência, para a recuperação do epítipo, as lâminas histológicas foram colocadas em tampão citrato de sódio a 0,01M, pH 6,0 e submetidas ao calor do forno de micro-ondas a 700-800W, durante 15 minutos, divididos em 3 ciclos. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em solução de água oxigenada a 3% em metanol (97mL metanol: 3mL de H₂O₂ P.A.) durante 15 minutos. Para o bloqueio de reações inespecíficas optou-se

pela incubação das lâminas em solução a 2% de leite desnatado (Molico[®]) em tampão PBS durante 1 hora. Na sequência, as secções foram incubadas com anticorpos primários (Quadro 2) em câmara úmida durante a noite a 4°C em geladeira. As lâminas que foram incubadas com anticorpos anti-AR, anti-ER- α (Quadro 2) foram colocadas em tampão citrato de sódio a 0,01M, pH 6,0 em uma panela de pressão durante 40 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em tampão PBS e durante 1h, à temperatura ambiente e as secções foram incubadas com anticorpos secundários (Quadro 2). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS e colocadas em solução de avidina-biotina-peroxidase (Strept ABComplex DAKO CYT. INC.[®]) por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com diaminobenzidina (DAB) (di-amino-benzidine-Sigma[®]) por 5 minutos. Na finalização da técnica, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris. A análise das lâminas foi realizada em fotomicroscópio BX 41 – 2 com câmera digital, modelo SIS-SC30, Olympus.

Análise quantitativa.

Três diferentes secções histológicas do lobo ventral da próstata de cada animal, cinco por grupo, submetidas à imunomarcação para o PCNA e para a proteína p63, foram avaliadas para a determinação do índice de células positivas para cada antígeno pesquisado. Um total de 2000 células foram contadas. As variáveis descritas foram analisadas através do programa de análise de imagens *Cellsens Standard* (Olympus) do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP, Câmpus de Botucatu.

Quadro 2 – Características dos anticorpos.

Anticorpos	Especificidade	Espécie hospedeira	Fonte
Primário			
Antígeno de Proliferação Celular (PCNA)	Proliferação Celular	Camundongo (monoclonal)	PC-10 Novocastra®/Vector Laboratories®
Receptor de Andrógeno (AR)	Células luminais	Coelho (policlonal)	AR N-20 Santa Cruz Biotechnology Inc.®
Receptor de estrógeno alfa (ER- α)	Células epiteliais e estromais	Coelho (policlonal)	Millipore®
Receptor de Grelina (GHSR-1a)	Epitélio prostático	Coelho (policlonal)	Millipore®
Receptor de Leptina (Ob-R)	Epitélio prostático	Coelho (policlonal)	Biorbyt®
p63	Células basais (epitélio prostático)	Camundongo (monoclonal)	4A4 Dako Cyt. Inc.®
Secundário			
	Anti-camundongo	Coelho (policlonal)	Dako Cyt. Inc.®
	Anti-coelho	Cabra (policlonal)	Dako Cyt. Inc.®

Análise Hormonal

Amostras de sangue de dez animais de cada grupo foram coletadas após anestesia em câmara de CO₂ seguida de decapitação. As concentrações plasmáticas de T e E foram determinadas por radioimunensaio utilizando conjuntos de reagentes comerciais (Maia, BioChem Immuno Systems, Itália S.P.A). Os limites mínimos de detecção foram 0,3 pg/ml para o estradiol e 2,0 ng/ml para a testosterona. As amostras foram dosadas num mesmo ensaio e os coeficientes de variação intra-ensaio foram 4% e 3,2%. O estudo estatístico foi apresentado em médias e desvios-padrão. As concentrações hormonais foram expressas em ng/dL para testosterona total e em pg/dL para estradiol.

Análise Estatística

A análise estatística das variáveis descritas foi realizada pelo programa GraphPad Prism (version 5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Valores foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão. O teste *T* foi aplicado para a verificação da significância de diferenças em dados paramétricos; O teste *Mann-Whitney* foi aplicado para a avaliação de significância

para dados não paramétricos. Os resultados foram apresentados em tabelas e figuras. Todas as conclusões estatísticas foram realizadas em nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Dados biométricos

A dieta hipoproteica oferecida às ratas durante a gestação e lactação determinou a redução significativa ($p < 0,0001$) no peso corpóreo dos filhotes do grupo RP em relação ao peso dos filhotes de ratas submetidas à dieta normoproteica (Tabela 2). A figura 7 ilustra os filhotes do grupo NP e RP aos 21 dias de idade.

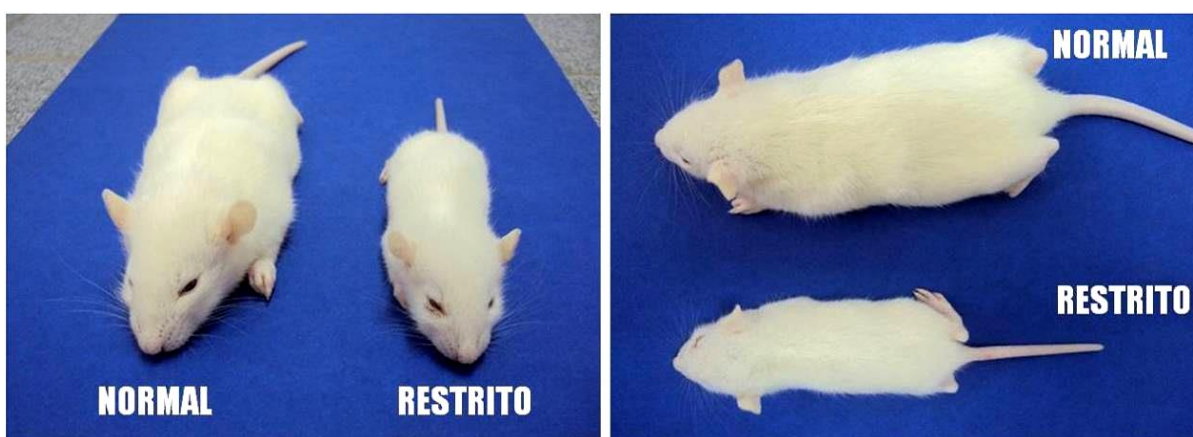


Figura 7: Filhotes do grupo NP (normoproteica) e do grupo RP (restrição proteica) aos 21 dias de idade.

Os pesos do lobo ventral da próstata, do testículo, das gorduras epididimária e visceral, dos índices gonadossomático e de adiposidade dos filhotes do grupo RP apresentaram valores significativamente menores quando comparados aos valores dos filhotes do grupo NP (Tabela 2).

Aos 120 dias de idade, verificou-se que as diferenças significativas observadas nos animais do grupo RP aos 21 dias foram mantidas para os pesos corpóreo, das gorduras e do índice de adiposidade. Para estes parâmetros, o grupo RP apresentou valores reduzidos em relação aos descendentes das ratas submetidas à dieta NP ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2: Média e desvio padrão dos pesos absolutos e relativos do corpo, de órgãos e de gorduras e índices de adiposidade e gonadossomático dos grupos NP (normoproteica) e RP (restrição proteica) aos 21 e 120 dias de idade.

Parâmetros	Grupos experimentais/ idade			
	21 dias de idade		120 dias de idade	
	NP	RP	NP	RP
Peso corpóreo (g)	47,94±7,52	22,77±3,01*	491,98±50,32	399,86±25,38*
Peso do complexo prostático/ Lobo ventral da próstata (g)**	0,01924± 0,008	0,009060± ,001*	0,9285±0,24	0,7698±0,21
Peso do testículo (g)	0,118± 0,016	0,050±0,016*	1,8406±0,2086	1,4943±0,1417
Peso da gordura epididimária (g)	0,1226±0,026	0,0243±0, 104*	4,212±0,8286	2,305±0,4247*
Peso da gordura visceral (g)	0,2941±0,062	0,1068±0,034*	5,151±0,6641	3,070±1,066*
Peso da gordura retroperitoneal (g)***	-	-	7,2842±2,605	4,387±1,096*
Índice de adiposidade	0,994±0,067	0,7170± 0,192*	3,636±0,8538	3,053± 0,6012
Peso relativo da próstata	0,3674±0,059	0,3982±0,067	0,2198±0,1070	0,1995±0,0602
Peso relativo do testículo	0,438± 0,049	0,498±0,074*	0,008±0,001	0,008±0,0005

Valores apresentados em média±desvio padrão;

Teste T foi aplicado para a verificação da significância de diferenças em dados paramétricos;

Teste Mann-Whitney foi aplicado para a avaliação de significância para dados não paramétricos;

*p<0,05; significância estatística comparada como grupo NP;

**Avaliação do peso do complexo prostático aos 21 dias de idade. Avaliação do peso do lobo ventral da prósta aos 120 dias de idade;

*** Gordura não coleta aos 21 dias de idade. Motivo: Ausência ou pouca quantidade de gordura retroperitoneal.

Análises Morfológicas, Hormonais e Semi-quantitativas

O antígeno nuclear de proliferação celular, dos receptores de hormônios esteroides (AR e ER α), da proteína p63 e dos receptores de leptina (Ob-R) e de grelina tipo 1a (GHSR-1a) foram detectados no epitélio e no estroma da próstata ventral de ratos dos grupos NP e RP aos 21 dias e 120 dias de idade.

De modo geral, a localização da proteína p63 foi restrita ao compartimento basal do epitélio prostático. As células basais imunomarcadas apresentaram formas variando de oval a triangular. Topograficamente, as células basais localizaram-se dispersas entre as células luminais e apoiadas na membrana basal (Figuras 8 A-D). A frequência de células basais p63⁺ diferiu estatisticamente entre os grupos NP (13,07 $\pm$ 1,49) e RP (17,94 $\pm$ 1,90) com 21 dias de idade (Figura 10 A). Nos animais com 120 dias de idade não houve diferenças estatísticas entre os animais dos grupos NP (Figura 8 E-F) (11,17 $\pm$ 3,26) e RP (13,94 $\pm$ 2,14) (Figura 10 B).

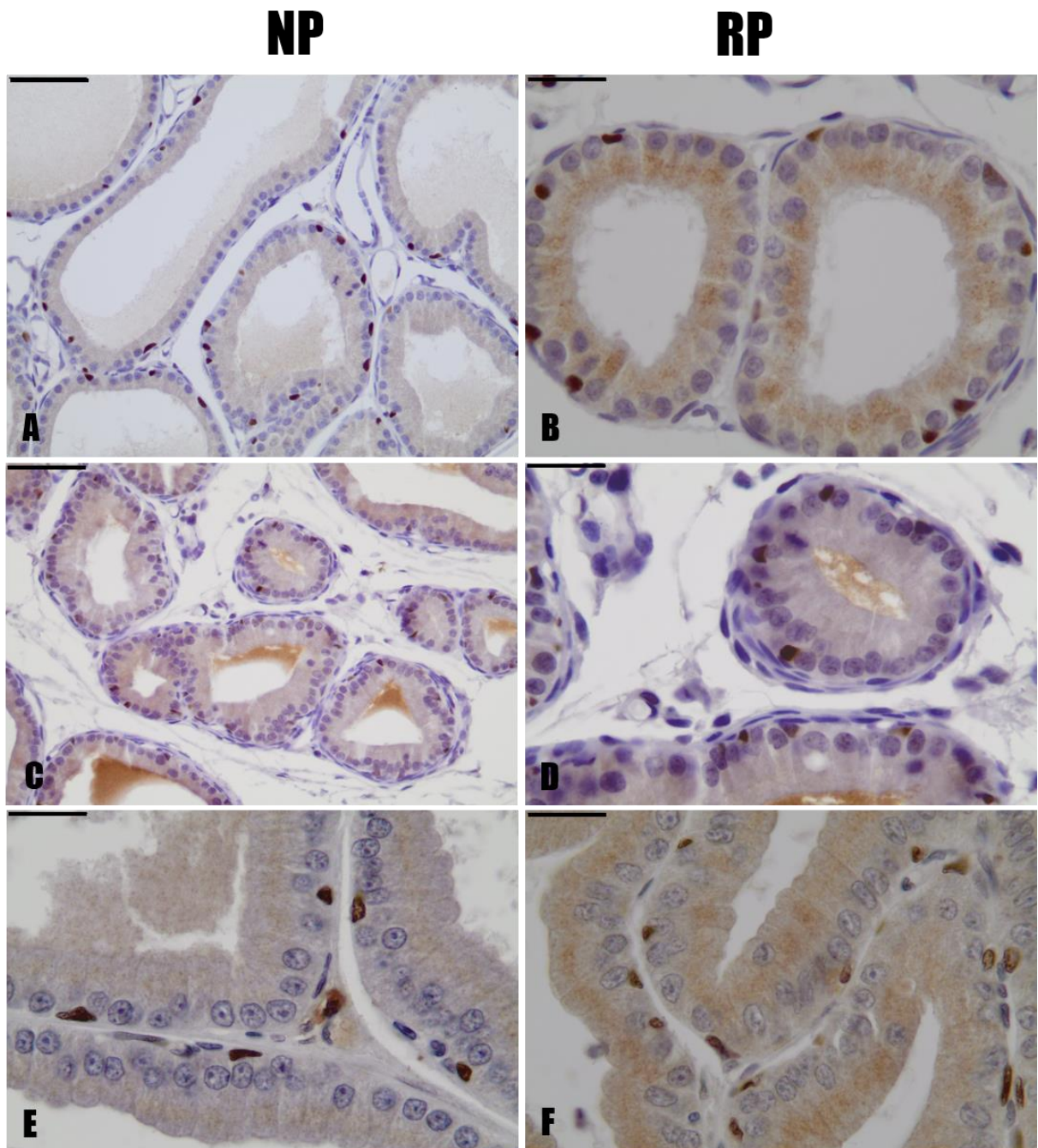


FIGURA 8: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP imunomarcadas com p63. Imunomarcacão das células p63⁺ (marrom) A, B, C e D) (21 dias de idade) e E e F (120 dias). Note a localização basal das células p63⁺ e as formas ovais e triangulares. (A e C) Barra = 100µm. (B, D, E e F) Barra = 10µm.

A avaliação da frequência das células positivas para o PCNA indicou não haver diferenças estatísticas em relação entre os animais do grupo NP ($58,30 \pm 8,63$) e RP ($47,53 \pm 9,12$) aos 21 (Figuras 9 A-B, 10 C) e aos 120 dias de idade (NP= $1,76 \pm 1,50$; RP= $1,35 \pm 1,40$) (Figuras 9 C-D, 10 D).

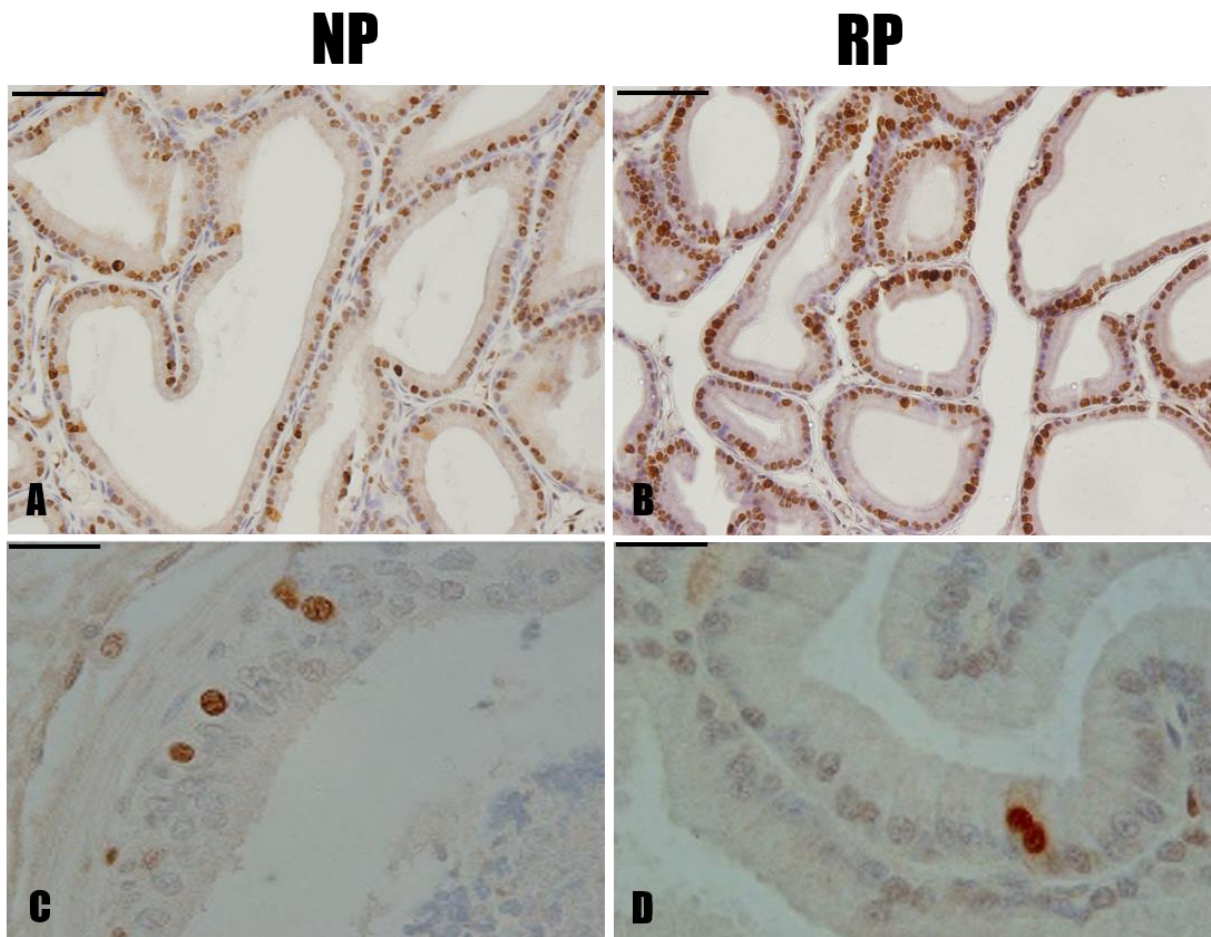


Figura 9: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP imunomarcadas com PCNA. Imunomarcagem das células PCNA⁺ (marrom) A e B (21 dias de idade) e C e D (120 dias). Observe a marcação positiva nas células epiteliais e estromais. (A e B) Barra = 100µm e (C e D) Barra = 20µm.

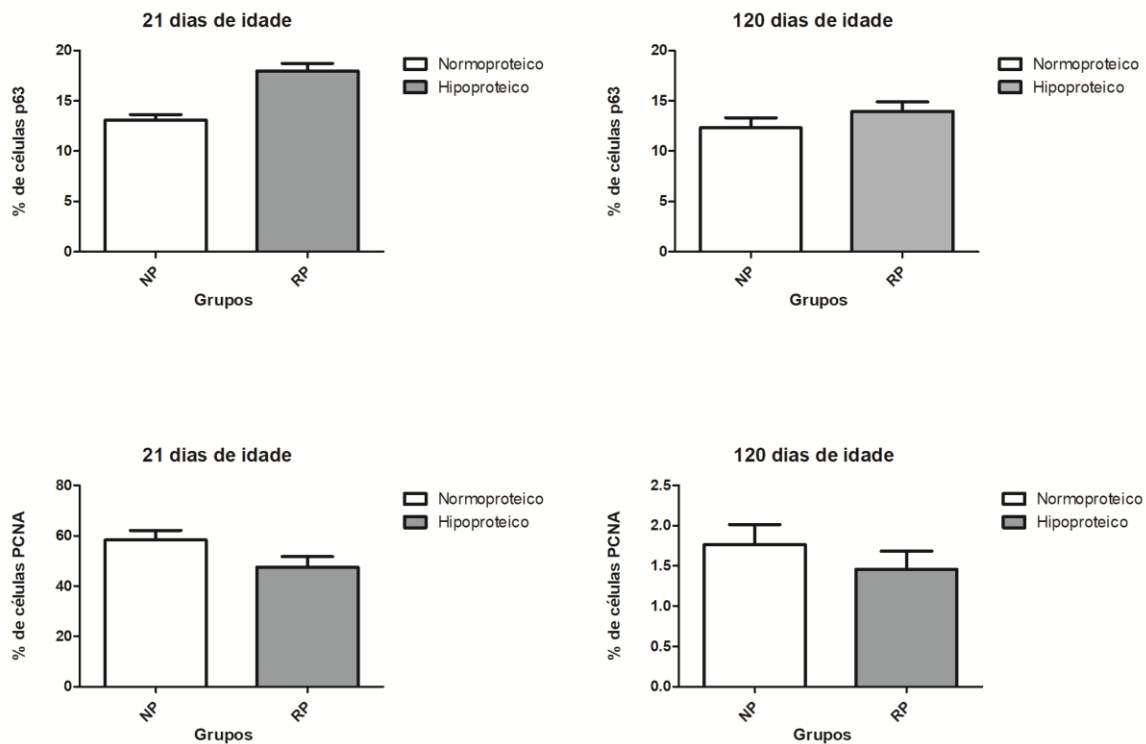


Figura 10: Estudo estatístico da avaliação da população de células p63 e PCNA positivas nos grupos estudados. População de células p63 aos 21 dias de idade (NP=13,07±1,49; RP=17,94±1,90) (A) e aos 120 dias de idade (B). População de células PCNA positivas nos grupos estudados aos 21 dias de idade NP=58,30±8,63; RP=47,53±9,12) (C) e aos 120 dias de idade (NP= 1,76±1,50; RP= 1,35±1,40) (D). Valores apresentados em média±desvio-padrão. *p <0.05, significância estatística comparada como grupo NP. Teste T foi aplicado para a verificação da significância de diferenças em dados paramétricos.

A maior parte das células epiteliais (basais e secretoras) e estromais (musculares lisas) do lobo ventral da próstata dos animais dos grupos NP e RP aos 21 dias de idade apresentou imunorreatividade para o receptor de andrógeno (AR). A imuno-histoquímica demonstrou que o lobo ventral do grupo NP apresentou marcação mais intensa em relação ao grupo RP (Figura 11 A-B).

Aos 120 dias de idade, a localização do AR esteve restrita às células secretoras e às células musculares lisas do estroma nos lobos ventrais dos ratos dos grupos NP e RP (Figura 12 A-B).

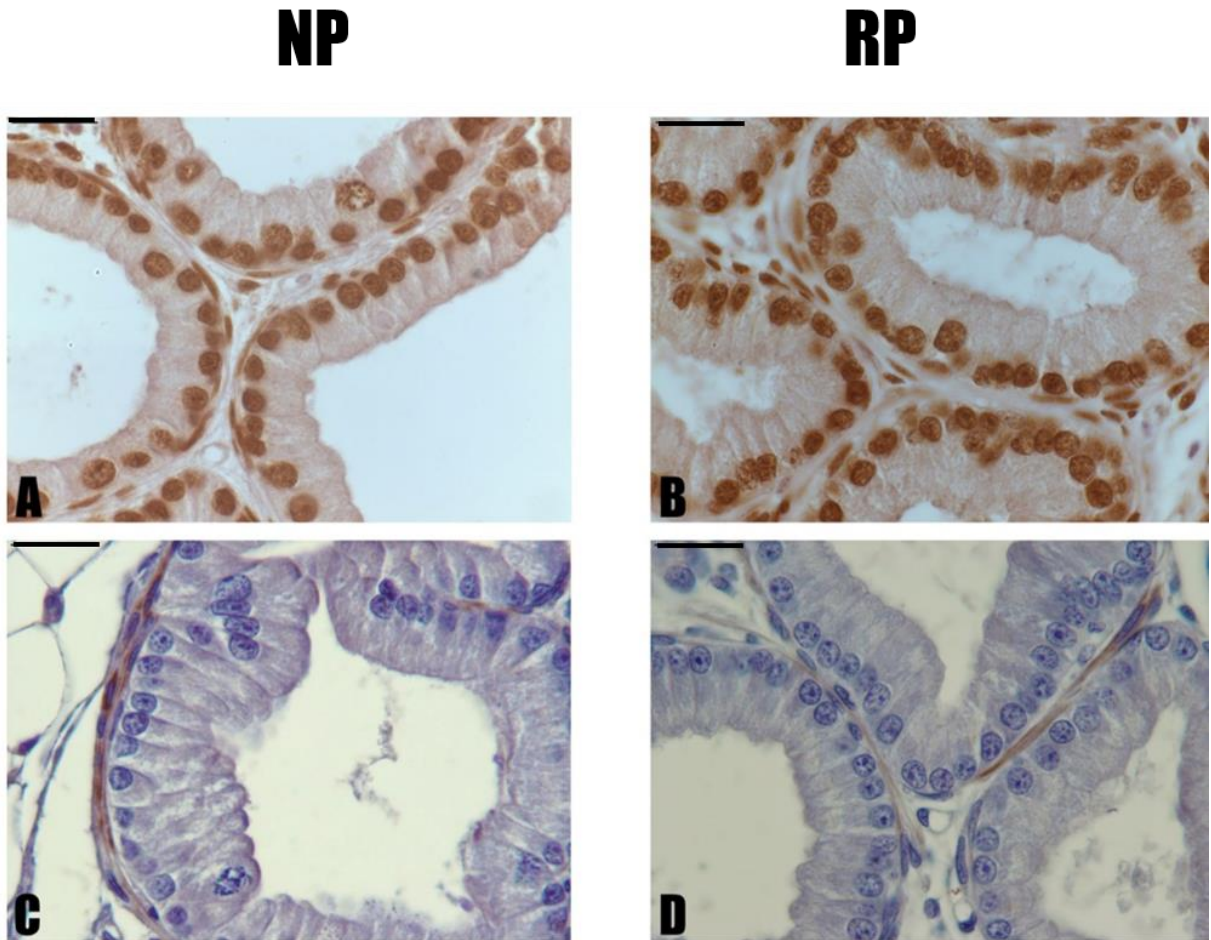


Figura 11: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas com AR e com ER- α . Imunomarcagem das células AR⁺ (marrom) (A e B). Barra = 20 μ m. Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas com Imunomarcagem das células ER- α ⁺ (marrom) (C e D). Observe a marcação positiva nas fibras estromais. Note a marcação mais intensa no grupo NP (C). (C e D) Barra = 20 μ m.

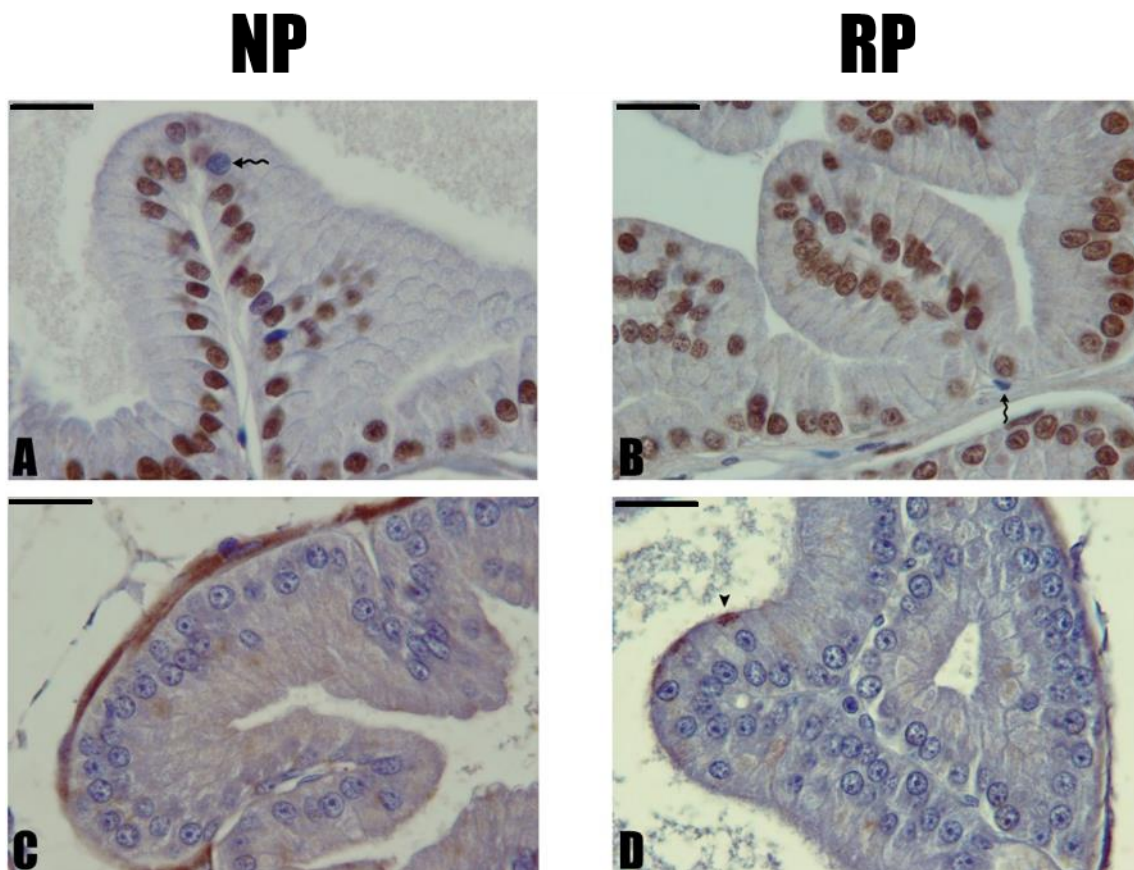


Figura 12: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (120 dias de idade) imunomarcadas com AR e ER- α . Imunomarcagem das células AR⁺ (marrom) (A e B). Note a marcação negativa em uma célula luminal (seta tortuosa) em (A) e em uma célula basal em (B) (seta tortuosa). Imunomarcagem das células ER- α ⁺ (marrom) (C e D). Observe a marcação mais intensa no estroma em (C) e marcação na matriz citoplasmática de uma célula luminal (cabeça de seta) em (D). (A, B, C e D) Barra = 20 μ m.

O ER- α foi detectado nas células epiteliais e estromais. Nas células epiteliais, sua localização foi observada somente no polo apical das células luminas (matriz citoplasmática) dos grupos NP e RP nas idades estudadas (Figuras 11 C-D e 12 C-D). No estroma, o ER- α foi localizado nas células musculares lisas periductais e periacinares (Figuras 11 C-D e 12 C-D).

O padrão de marcação do ER- α foi mais intenso nos animais adultos do grupo NP (Figura 12 C). No entanto, foi observado um número maior de células epiteliais do lobo

ventral da próstata dos animais do grupo RP com marcação evidente na matriz citoplasmática (Figura 12 D) quando comparado ao grupo NP.

A investigação da localização do receptor de leptina (Ob-R) indicou imunorreatividade positiva nas células luminais do epitélio prostático. Notou-se que os animais do grupo NP com 21 dias de idade apresentaram marcação mais forte para o Ob-R. (Figura 13 A-B).

Nos animais adultos, a imunorreatividade positiva para o Ob-R foi observada nas células epiteliais (basais e luminais) e no endotélio dos vasos sanguíneos do estroma (Figura 14 A-D). O lobo ventral prostático dos animais do grupo RP apresentou maior intensidade de marcação em uma população maior de células epiteliais quando comparado ao lobo ventral dos animais do grupo NP (Figura 14 C-D).

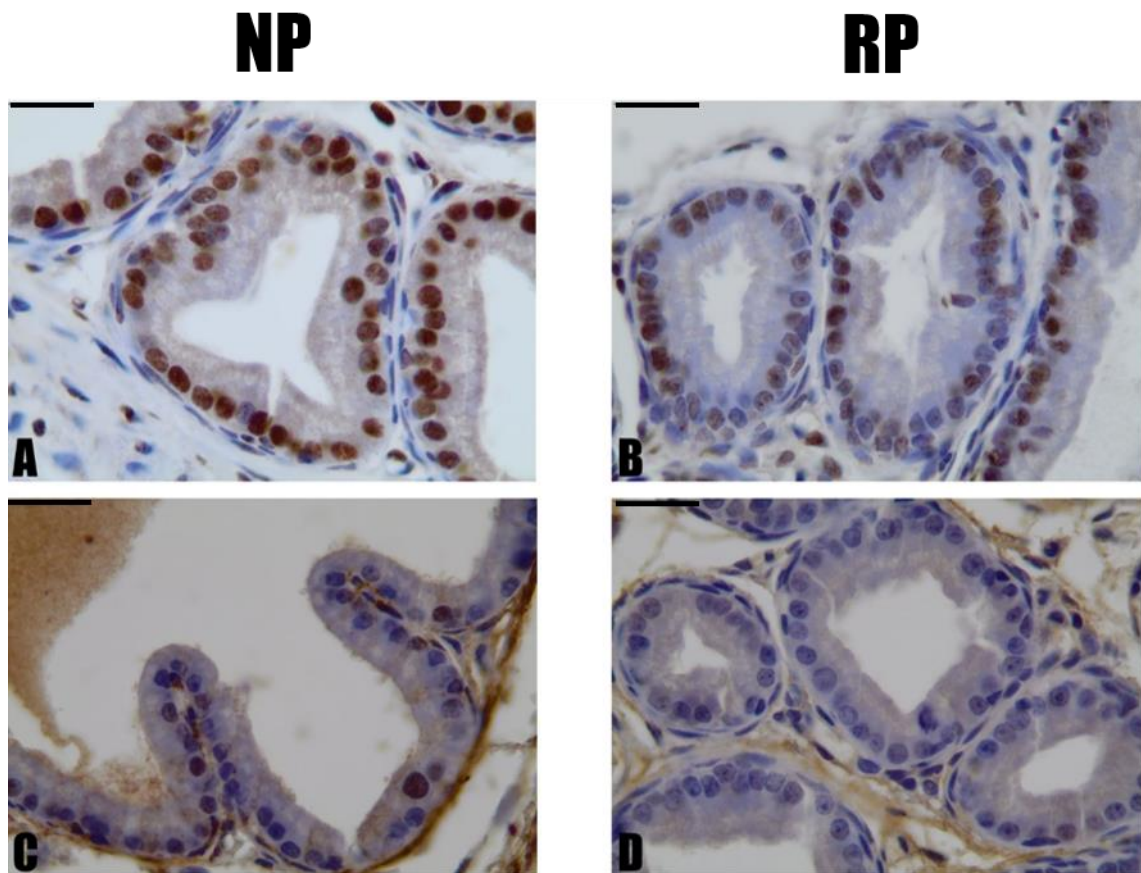


Figura 13: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas co Ob-R. Imunomarcção das células Ob-R+ (marrom) (A e B). Note a marcação mais intensa no grupo NP (A). (A e B) Barra = 20µm. Figura 19: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (21 dias de idade) imunomarcadas com GHSR-1a. Imunomarcção das células GHSR-1a+ (marrom) (C e D). Observe a marcação mais intensa no estroma do lobo ventral do grupo NP (C). (C e D) Barra = 20µm.

NP

RP

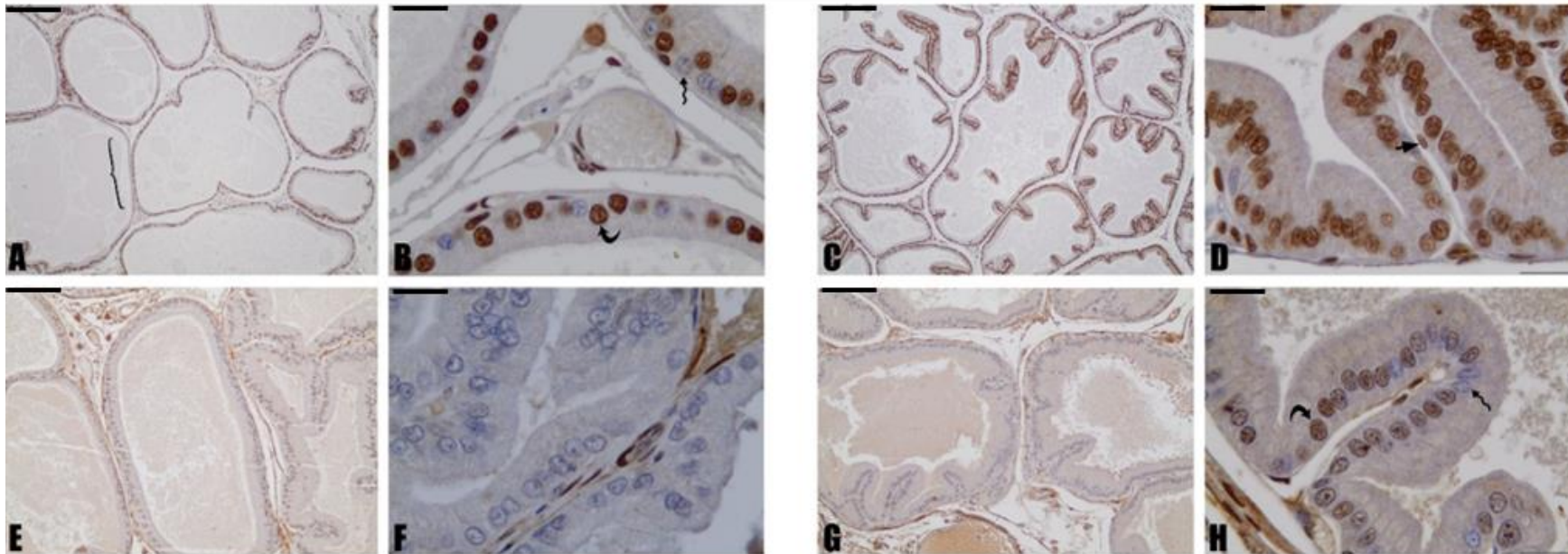


Figura 14: Secções transversais do lobo ventral da próstata de ratos dos grupos NP e RP (120 dias de idade) imunomarcadas com Ob-R e GHRS-1a. Imunomarcagem das células Ob-R⁺ (marrom) (A, B, C e D). Compare a imagem (A) com a imagem (C). A marcação é mais intensa no grupo RP (C) e há menos células marcadas (chave) no grupo NP (A). Em (B) célula luminal Ob-R⁺ (seta curva); célula luminal Ob-R⁻ (seta tortuosa). Em (D) célula basal Ob-R⁺ (seta). Imunomarcagem das células GHRS-1a⁺ (marrom) (E, F, G e H). Observe a marcação positiva no estroma do lobo ventral dos grupos NP e RP. Em (F) núcleos de células estromais marcadas. Em (H) célula luminal GHRS⁺ (seta curva); célula luminal GHS-R⁻ (seta tortuosa). (A e C) Barra = 200µm. (B, D, F e H) Barra = 20µm. (E e G) Barra = 100µm. (F e H).

Quanto à avaliação do GHSR-1a, foi observada reação positiva nos ácinos e no estroma prostático (Figuras 14 C-D e E-H). No estroma, a marcação esteve presente nas fibras conjuntivas e nas musculares lisas que circundam os ácinos e os vasos sanguíneos. O lobo ventral da próstata do grupo NP com 21 dias de idade apresentou marcação mais intensa em relação ao grupo RP (Figura 14 C-D). No epitélio prostático do adulto, o GHSR-1a foi localizado no núcleo das células, sendo observada marcação mais forte nos lobos prostáticos dos animais do grupo RP (Figura 14 G-H).

A avaliação da investigação hormonal indicou alta variabilidade no estudo dos níveis plasmáticos de testosterona e estradiol. Houve diferenças observadas somente no nível de estradiol nos indivíduos adultos. O grupo NP apresentou maior concentração de estradiol (Figura 15).

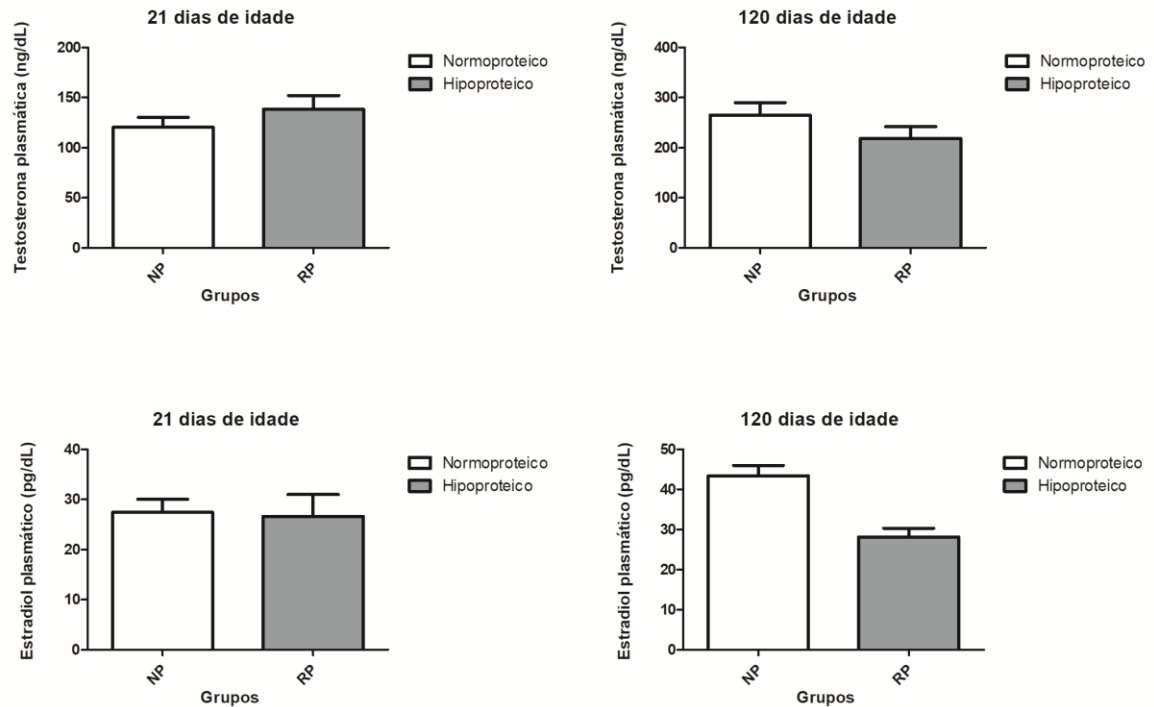


Figura 15: Avaliação dos níveis plasmáticos de testosterona (ng/dL) e estradiol (pg/dL) nos grupos estudados. Concentração plasmática de testosterona nos grupos estudados aos 21 dias de idade (NP=120,05±30,68; RP=138,33±27,47) (A) e aos 120 dias de idade (NP=265,66±73,53; RP=218,00±71,84) (B). Concentração de estradiol (C) nos grupos estudados aos 21 dias de idade (NP=27,44±7,69; RP=26,66±8,73) (A) e aos 120 dias de idade (NP=43,37±7,40; RP=28,12±6,17) (B). Valores apresentados em média±desvio-padrão. *p <0.05, significância estatística comparada como grupo NP. Teste Mann-Whitney foi aplicado para a avaliação de significância para dados não paramétricos.

DISCUSSÃO

A PF é capaz de causar alterações no número de células, na estrutura de órgãos, nos níveis hormonais, na expressão gênica de proteínas, entre outras manifestações estruturais e funcionais (Ross & Desai, 2005). O estudo proposto avaliou a repercussão da PF por restrição proteica materna no desenvolvimento somático e da próstata de ratos desmamados e adultos. De modo geral, a avaliação dos parâmetros corporais (pesos absolutos corpóreo, da próstata, dos testículos e dos depósitos de gorduras corporais) indicou atraso no crescimento somático dos animais do grupo RP. O período de desenvolvimento pós-natal compreendido entre a fase juvenil (21 dias) e a fase adulta (120 dias) foi insuficiente para a retomada do crescimento somático regular dos animais do grupo RP quando comparados aos animais do grupo NP. O peso corpóreo dos animais do grupo RP aos 21 dias de idade foi 52,50% menor quando comparado ao peso corpóreo dos animais do NP. Aos 120 dias de idade, não houve recuperação no ganho de peso dos animais do grupo RP. Esses animais apresentaram 18,72% de redução no peso em relação aos animais do grupo NP. No entanto, notou-se que a gordura visceral do grupo RP aumentou dos 21 dias aos 120 dias de idade cerca de 28,74 vezes, enquanto que a gordura visceral do grupo NP aumentou cerca de 17,51 vezes no mesmo período. Portanto, os animais do grupo RP apresentaram no mesmo intervalo de tempo e nas mesmas condições nutricionais aumento do peso absoluto da gordura visceral de 164% maior em relação aos animais do grupo NP. Com base no comportamento do desenvolvimento somático dos animais RP, acredita-se que em idade avançada esses animais talvez pudessem desenvolver obesidade (“*catch-up growth*”) e a síndrome metabólica (Mattos, 2006; Wattez, 2013).

Nossos resultados são coincidentes com o estudo desenvolvido por Garofano et al. (1998). Esses autores avaliaram o crescimento somático pós-natal em ratos submetidos à restrição alimentar e constataram que o retardo no crescimento dos ratos é irreversível até a

idade de 12 meses, apesar da oferta nutricional normal após o desmame (Garofano et al., 1998). De acordo com a literatura científica especializada, o crescimento pós-natal é regulado principalmente pelo eixo endócrino constituído pelo hormônio de crescimento (GH) e pelo fator de crescimento ligado à insulina (IGF-I) (Gluckman et al., 1991). Além da ação do eixo GH-IGF-I no crescimento somático, estudos demonstraram que alterações nas expressões do RNAm da somatostatina e do neuropeptídeo Y sob condições experimentais de subnutrição alteram a regulação central do GH levando à falta de crescimento (Huizinga et al., 2000 e 2001). Adicionalmente, sob condições de restrição calórica ou proteica, observa-se uma diminuição dos níveis séricos de IGF sérico determinando alterações no crescimento (Martinelli Jr., Custódio & Aguiar-Oliveira, 2008).

O impacto da PF sobre a proliferação celular no lobo ventral da próstata foi avaliado por meio da análise e determinação semi-quantitativa das células epiteliais PCNA positivas. O PCNA é altamente expressado no núcleo das células durante a fase S (síntese de DNA) do ciclo celular (Bravo & Macdonald-Bravo 1987; Kelman 1997; Gulbahar et al. 2005). A análise dos índices de proliferação celular indicou não haver diferenças entre os grupos estudados segundo as duas idades.

Considerando a reconhecida importância das células basais no desenvolvimento e na manutenção da população das células epiteliais prostáticas, foi realizada a investigação da localização da proteína p63 nos grupos NP e RP. Segundo Signoretti et al. (2000), o marcador de células basais p63 é essencial para o desenvolvimento normal da próstata de camundongos, sendo útil também para diferenciar lesões prostáticas benignas das malignas. Na próstata, esta proteína mantém a população de células-tronco prostáticas e a população de células basais. Tal fato foi comprovado por meio do estudo do desenvolvimento da próstata do camundongo p63 (-/-). A inativação do gene p63 neste modelo experimental apresentou agenesia da próstata (Signoretti et al., 2000).

O estudo da frequência de células p63⁺ no lobo ventral da próstata dos animais dos grupos NP e RP mostrou que a PF interferiu somente na população de células basais aos 21 dias de idade. A expressão do gene p63 nas células basais garante a integridade morfológica e funcional da próstata por meio da regulação do processo de diferenciação dessas células ao fenótipo de células epiteliais luminais (Kurita et al., 2004). Em condições experimentais, a restrição proteica materna induz a maiores taxas de morte celular (Ramadan, Alshiraihi, Alkarim, 2013). Sendo assim, o aumento da população de células p63⁺ observado no grupo RP pode estar relacionado a uma adaptação da próstata para assegurar o seu desenvolvimento da próstata em ambiente adverso. O aumento da população de células basais do grupo RP pode ter relação com possível aumento na taxa de morte das células luminais prostáticas. Na comparação entre as duas idades estudadas, verificou-se que a população de células basais p63⁺ foi maior nos animais com 21 de dias idade, independente do grupo experimental (normoproteico ou hipoproteico). Esta observação acompanha os perfis dos índices de proliferação celular, indicando a existência do equilíbrio populacional das células basais nos diferentes grupos, garantindo, dessa forma, o desenvolvimento prostático.

Os eventos de proliferação e morte celular determinam o desenvolvimento, o crescimento, a diferenciação e a manutenção morfofuncional da próstata, bem como o surgimento de doenças. O controle funcional desses eventos ocorre sob a regulação hormonal do eixo reprodutivo mediada por andrógenos, estrógenos, fatores proteicos e também pela integração de hormônios associados ao balanço energético (Griffiths et al., 1997, Barreiro & Tena-Sempere, 2004; Prins, Huang, Birch, 2006).

Dessa forma, o presente estudo avaliou as concentrações plasmáticas de testosterona e de estradiol. A restrição proteica, em ambas as idades estudadas, aplicada à janela de programação masculinizante não interferiu nos níveis plasmáticos da testosterona nas idades de 21 e 120 dias e do estradiol aos 21 dias de idade. Esses resultados estão alinhados com os

achados de Cavariani et al. (2019) que ao estudar os efeitos da restrição proteica materna na expressão das AQ1, AQ9 (aquaporinas 1 e 9) e do VEGFr-2 (fator vascular de crescimento endotelial), em modelo experimental idêntico ao deste estudo, nas idades de 21, 44 e 120 dias de idade, registraram alterações nos níveis de testosterona e estradiol somente aos 44 dias de idade (Cavariani et al., 2019). Na idade de 120 dias, a avaliação da concentração plasmática de estradiol indicou que o grupo HP apresentou valores significativamente menores comparado aos níveis dos animais do grupo NP.

A testosterona exerce os seus efeitos por meio da ligação ao seu receptor independente dos mecanismos genômicos clássico e não clássico da testosterona (Bennett, et al., 2010). Neste sentido, o presente estudo verificou a imunolocalização do AR. O AR apresentou imunorreatividade positiva em grande parte das células epiteliais e nos núcleos das fibras musculares lisas (estroma) do lobo ventral da próstata dos animais dos grupos NP e RP aos 21 dias de idade. Este registro indica, de forma indireta, o papel relevante do andrógeno, por meio da expressão do seu receptor durante a formação ductal prostática (Marker et al., 2003). Aos 120 dias de idade, a localização do AR esteve restrita aos núcleos das células luminais e células musculares lisas do estroma dos ratos dos grupos NP e RP. O lobo ventral do grupo NP apresentou marcação mais intensa em relação ao grupo RP.

Com a finalidade de relacionar os fenótipos epitelial e estromal referente às imunomarcações para o ER- α , Ob-R e do GHRS-1a encontrados neste estudo, considerações acerca da ação dos estrógenos, da leptina e da grelina precisam ser feitas.

Além da ação direta dos andrógenos sobre a próstata, os estrógenos, por meio da ligação com os seus receptores, exercem efeitos diretos e indiretos sobre o desenvolvimento e a homeostasia prostática e desempenham papel na etiologia de doenças da próstata (Taplin & Ho, 2001). Neste sentido, reconhece-se que a localização dos receptores ER- α e ER- β na próstata está relacionada à ação direta dos estrógenos sobre este órgão. O ER- α é um dos

fatores responsáveis por mediar o efeito do estrógeno induzindo o aumento da proliferação celular na próstata (Bonkhoff & Berges, 2009). Neste trabalho, o ER- α foi comumente detectado no estroma da próstata e pontualmente na matriz citoplasmática das células epiteliais. A intensidade de marcação do ER- α foi maior nos animais adultos do grupo NP. A diferença da intensidade observada está em concordância com os níveis plasmáticos de estradiol registrados nos animais adultos. Neste trabalho, nos animais adultos do grupo RP ficou evidente a relação direta dos menores níveis plasmáticos de estradiol com a imunomarcação de menor intensidade para o ER- α . Este resultado corrobora com trabalho experimental que associou má nutrição materna por restrição proteica com menores quantidades de ER α transcritas.

Em estudo sobre a ação da leptina no metabolismo do estrógeno e na proliferação celular na próstata humana, Habib et al. (2015) demonstraram que o efeito proliferativo da leptina sobre a próstata pode ser devido a sua possível atuação sobre a expressão do ER- α e sobre a regulação negativa no ER- β . Além da ação mitogênica, a leptina que é produzida predominantemente pelo tecido adiposo, também exerce efeitos anti-apoptóticos por ativar genes envolvidos na proliferação celular (Malendowicz, et al., 2006; Hoda & Popken, 2008). Em tumores prostáticos com características hiperplásicas, a leptina é mais fortemente expressada (Kim et al., 2008).

Simultaneamente à menor imunolocalização do ER- α nos animais RP nas duas idades estudadas, a imunolocalização positiva para o Ob-R foi encontrada nas células basais e luminais do epitélio prostático. Aos 21 dias de idade, notou-se que a intensidade de marcação e a quantidade de células marcadas foi maior no grupo NP, enquanto que aos 120 dias de idade observou-se o oposto, ou seja, o grupo RP apresentou mais células intensamente imunorreativas. Em um estudo experimental com ratos para determinar o papel da leptina, Colli et al. (2011) sugeriram que o efeito da administração de leptina na próstata ocorre pela

regulação positiva da leptina e dos seus receptores ObRa e ObRb. Neste mesmo trabalho, os autores indicaram que há uma relação entre o surgimento de alterações prostáticas com níveis aumentados de leptina e da expressão gênica dos receptores ObRa e ObRb, e redução nas isoformas ER- α e ER- β . No presente trabalho, a PF interferiu no aumento de células Ob-R⁺ nos animais adultos RP, indicando importante modificação fenotípica

Ainda em relação aos estados patológicos da próstata, vários estudos demonstraram a presença de níveis elevados de receptores de grelina nas linhagens de células de câncer prostático em comparação com tecidos à próstata normal (Jeffery et al., 2002; Cassoni et al., 2004; Yeh et al., 2005; Chen et al., 2012). A grelina se liga ao receptor GHSR-1a e esta ligação estimula a capacidade de liberação do hormônio do crescimento (GH). A grelina é o mais poderoso agente orexígeno e adipogênico conhecido (Muccioli et al., 2002; Kojima & Kangawa, 2005). Neste trabalho, o sítio de marcação do receptor GHSR-1a foi no epitélio e no estroma prostático. A marcação positiva do GHSR-1a foi expressiva nas células epiteliais prostáticas dos animais com 120 dias de idades do grupo RP. A presença do receptor GHRS-1a sugere forte atuação da grelina na próstata. No testículo, a grelina ao se ligar ao seu receptor é capaz de inibir a expressão do gene SCF relacionado no controle da espermatogênese (Yan et al., 2000 a, b). Kheradmand et al. (2012) indicaram que a grelina possui efeitos moduladores sobre as células germinativas de ratos adultos normais por meio da regulação da expressão do gene Bax (relacionado ao processo de apoptose) e da supressão dos níveis de PCNA (relacionado ao processo de proliferação celular).

Confrontando os achados da literatura especializada com o fenótipo prostático dos ratos do grupo RP, acredita-se que houve uma possível programação da expressão dos receptores ER- α , Ob-R e GHSR-1a, embora não tenha havido registros significativos de alterações no processo de proliferação celular. Defende-se que as alterações observadas na expressão desses receptores nos animais RP aos 120 dias de idade possam estar associadas ao

ganho expressivo das massas corpóreas dos tecidos adiposos. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que níveis circulantes de leptina exibem forte correlação positiva com a massa de gordura corpórea, e em menor grau com o índice de massa corpórea (Boden et al., 1996; der Merwe et al., 1999).

Dessa forma, acredita-se que aumento da gordura visceral no grupo RP tenha proporcionado maior impacto nos níveis circulantes de leptina, repercutindo assim no aumento periférico de seu receptor na próstata. Nossos achados corroboram com o estudo realizado por Gombar & Ramos (2013). Esses autores em estudo sobre a expressão gênica das isoformas dos receptores de leptina na próstata e no testículo de ratos filhos de mães submetidas à restrição (proteica e calórica) durante a lactação, registraram aumento do RNAm das isoformas ObRa e ObRb (Gombar & Ramos; 2013). Para Barreiro & Sempere (2004), a leptina e a grelina cooperam no controle do balanço energético e da reprodução.

CONCLUSÕES

Diante dos fatos discutidos e confrontados com os nossos resultados, entende-se que a baixa qualidade nutricional, ocorrida durante a janela de PF da próstata durante desenvolvimento pós-natal ocorrido nas fases juvenil e adulta, determinou importantes alterações na próstata do rato. Os perfis fenotípicos epiteliais da localização dos receptores Ob-R e GHSR são condizentes com o fenótipo de alterações morfológicas encontradas em alguns estados patológicos da próstata.

Assim a exposição experimental do rato ao baixo teor de proteínas durante os períodos de desenvolvimento pré e pós-natal

- programou o atraso do crescimento somático da prole dos 21 aos 120 dias;
- alterou o fenótipo epitelial das células do lobo ventral da próstata que expressam a p63, os receptores ER- α , Ob-R e GHSR-1a e a concentração de estradiol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMA, R.S.; FLIER J.S. Leptin. **Annual Review of Physiology**, v.62, p.413-437, 2000.
- BARKER, D.J.P. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. Feeding diets restricted in calories. **Lancet**, v.341, p.938-941, 1993.
- BARKER, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v.261, p.412-7, 2007.
- BARREIRO, M.L.; TENA-SEMPERE, M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.226, p.1-9, 2004.
- BENNETT, N.C.; GARDINER, R.A.; HOOPER, J.D.; JOHNSON, D.W.; GOBE, G.C. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, n.6, p.813-27, 2010.
- BODEN, G.; CHEN, X.; MOZZOLI, M.; RYAN, I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.81, p.3419-23, 1996.
- BONKHOFF, H.; BERGES, R. The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer. **European Urology**, v.55, p.533-542, 2009.
- BOSLAND, M.C.; GIRVAN, I.O.; WHITTEMORE, A.S. Dietary fat, calories, and prostate cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v.91, p.1691-1692, 1999.
- BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. **Journal of Cell Biology**, v.105, p.1549-1554, 1987.
- BUCHANAN, G.; GREENBERG, N.M.; SCHER, H.I.; HARRIS, J.M.; MARSHALL, V.R.; TILLEY, W.D. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v.7, p.1273-81, 2001.
- CAMARGO, A.C.L.; CONSTANTINO, F.B.; SANTOS, S.A.A.; COLOMBELLI, K.T.; DAL-PAI-SILVA, M.; FELISBINO, S.L.; JUSTULIN, L.A. Influence of postnatal prolactin modulation on the development and maturation of ventral prostate in young rats. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.30, n.7, p.969-979, 2017.
- CARSON, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v.61, (suppl 4A), p.1-7, 2003.
- CASANUEVA, F.F.; DIEGUEZ, C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.20, p.317-363, 1999.
- CASSONI, P.; GHÉ, C.; MARROCCO, T.; TARABRA, E.; ALLIA, E.; CATAPANO, F.; DEGHENGI, R.; GHIGO, E.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G. Expression of ghrelin and

biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. **European Journal of Endocrinology**, v.150, n.2, p.173-84, 2004.

CAVARIANI, M.M.; SANTOS, T.M.; PEREIRA, D.N.; CHUFFA, L.G.A.; PINHEIRO, P.F.F.; SCARANO, W.R.; DOMENICONI, R.F. 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.469, 2019.

CHEN, L.; MCFARLAND, M.S.; NESBITT, R.-L.; WILLIAMS, A.K.; CHAN, C.; GOMEZ-LEMUS, J.; AUTRAN-GOMEZ, A.M.; AL-ZAHRANI.; CHIN, J.L.; IZAWA, J.I.; LUYT, L.G.; LEWIS, J.D. Ghrelin receptor as a novel imaging target for prostatic neoplasms. **The Prostate**, v.72, p.825-833, 2012.

CHEN, H.; LUO, L.; LIU, J.; BROWN, T.; ZIRKIN, B.R. Aging and caloric restriction: effects on leydig cell steroidogenesis. **Experimental Gerontology**, v.40, p.498-505, 2005.

CHIK, C.L.; HO, A.K.; BROWN, G.M. Effect of Food restriction on 24-h serum and pineal melatonin content in male rats. **Acta Endocrinologica**, v.115, p.507-513, 1985.

CHIK, C.L.; HO, A.K.; BROWN, G.M. Effect of pinealectomy on the undernutrition-induced suppression of the reproductive axis in rats. **Acta Endocrinologica**, v.120, p.569-573, 1989.

COLLI, S.; SILVEIRA, C.F.; PEIXOTO, M.M.; SAMPAIO, F.J.; FONTE, R.C. Leptin role in the rat prostate ventral lobe. **Fertility and Sterility**, v.95, n.4, p.490-3, 2011.

DER MERWE, M.T.; PANZ, V.R.; CROWTHER, N.J.; SCHLAPHOFF, G.P.; GRAY, I.P., FROGUEL, P.; JOFFE, B.I.; LÖNNROTH, P.N. Free fatty acids and insulin levels--relationship to leptin levels and body composition in various patient groups from South Africa. **International Association for the Study of Obesity**, v.23, p.909-17, 1999.

DIAS, J. C. O.; VELOSO, C. M.; DONZELE, R. F. M.; CARVALHO, G. R. O neuropeptídeo kisspeptina e a reprodução animal: uma revisão. **Multi-Science Journal**, v.1(2), p. 96-110, 2015.

DONG, Q.; BERGENDAHL, M.; HUHTANIEMI, I.; HANDELSMEN, D.J. Effect of undernutrition on pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in castrate and intact male rats using an ultrasensitive immunofluorometric LH assay. **Endocrinology**, v.135, p.745-750, 1994.

DRAKE, A.J.; WALKER, B.R. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. **Journal of Endocrinology**, v.180, p.1-16, 2004.

EVERTTS, A.G.; ZEE, B.M.; GARCIA, B.A. Modern approaches for investigating epigenetic signaling pathways. **Journal of Applied Physiology**, v.109, n.3, p.927-33, 2010.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; NAVARRO, V. M.; BARREIRO, M.L.; VIGO, E.M.; TOVAR, S.; SIROTKIN, A.V.; CASANUEVA, F.F.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.;

PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. **Endocrinology**, v.146, p.3018-3025, 2005.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; TENA-SEMPERE, M.; AGUILAR, E.; PINILLA, L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. **Neuroscience Letters**, v.362, p.103-107, 2004.

FERNANDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TENA-SEMPERE, M.; NAVARRO V.M.; BARREIRO, M.L.; CASTELLANO J.M.; AGUILAR, E.; PINILLA, L. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. **Neuroendocrinology**, v.82, p.245-255, 2005.

FURUTA, M.; FUNABASHI, T.; KIMURA, F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.288, p.780-785, 2001.

GAROFANO, A.; CZERNICHOW, P.; BRÉANT, B. Postnatal somatic growth and insulin contents in moderate or severe intrauterine growth retardation in the rat. **Biology of the Neonate**, v.73, p.89-98, 1998.

GLUCKMAN, P.D.; DOUGLAS, R.G.; AMBLER, G.R.; BREIER, B.H.; HODGKINSON, S.C.; KOEA, J.B.; SHAW, J.H. The endocrine role of insulin-like growth factor I. **Acta paediatrica Scandinavica. Supplement**, v.372, p.97-105, 1991.

GNANAPRAGASAM, V.J.; ROBSON, C.N.; LEUNG, H.Y.; NEAL, D.E. Androgen receptor signaling in the prostate. **BJU international**, v.86, p.1001-13, 2000.

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.115-20, 2013.

GREWAL, T.; MICKEELSEN, D.; HAFS, H.D. Androgen secretion and spermatogenesis in rat following semistarvation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.138, p.723-729, 1971.

GRIFFITHS, K.; MORTON, M.S.; NICHOLSON, R.I. Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer. **European Urology**, v.32, (suppl 3), p.24-40, 1997.

GULBAHAR, M.Y.; YUKSEL, H.; GUVENC, T.; OKUT, H. Assessment of proliferative activity by AgNOR and PCNA in prostatic tissues of lambs implanted with zeranol. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.468-474, 2005.

GUOYAO, W.U.; IMHOFF-KUNSCH, B.; GIRARDC, A.W. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v.26, (Suppl. 1), p.4-26, 2012.

HABIB, C.N.; AL-ABD, A.M.; TOLBA, M.F.; KHALIFA, A.E.; KHEDR, A.; MOSLI, H.A.; ABDEL-NAIM, A.B. Leptin influences estrogen metabolism and accelerates prostate cell proliferation. **Life Sciences**, v.121, p.10-15, 2015.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v.35, n.7, p.595-601, 1992.

HAYWARD, S.W.; BASKIN, L.S.; HAUGHNEY, P.C.; CUNHA, A.R.; FOSTER, B.A.; DAHIYA, R.; PRINS, G.S.; CUNHA, G.R. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. **Acta Anatomica**, 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.; CUNHA, A.R. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. **Acta Anatomica**, v.155, p.94-103, 1996b.

HERBERT, D.C. Morphology of the mammatrophs and gonadotrophs in the anterior pituitary gland of rats with protein-calorie malnutrition. **American Journal of Anatomy**, v.158, p.521-531, 1980.

HERMAN, R.A.; JONES, B.; MANN, D.R.; WALLEN, K. Timing of prenatal androgen exposure: anatomical and endocrine effects on juvenile male and female rhesus monkeys. **Hormones and Behaviour**, v.38, p.52-66, 2000.

HODA, M.R.; POPKEN, G. Mitogenic and anti-apoptotic actions of adipocyte-derived hormone leptin in prostate cancer cells. **BJU International**, v.102, p.383-8, 2008.

HOFMEISTER, M.V.; BONEFELD-JORGENSEN, E.C. Effects of the pesticides prochloraz and methiocarb on human estrogen receptor alpha and beta mRNA levels analyzed by on-line RT-PCR. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.427-33, 2004.

HOWLAND, B.E. The influence of feed restriction and subsequent refeeding on gonadotrophin secretion and serum testosterone concentrations in male rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p.429-436, 1975.

HUIZINGA, C.T.; OUDEJANS, C.B.; DELAMARRE-VAN DE WAAL, H.A. Persistent changes in somatostatin and neuropeptide Y mRNA levels but not in growth hormone-releasing hormone mRNA levels in adult rats after intrauterine growth retardation. **Journal of Endocrinology**, v.68, p.273-281, 2001.

HUIZINGA, C.T.; OUDEJANS, C.B.; STEINER, R.A.; CLIFTON, D.K.; DELAMARRE-VAN DE WAAL, H.A. Effects of intrauterine and early postnatal growth restriction on hypothalamic somatostatin gene expression in the rat. **Pediatric Research**, v.48, p.815-820, 2000.

IARC. **Cancer, causes, occurrence and control**. Lyon, France: IARC, 1990. (Scientific Publication; 100)

IFRAH, A.M.; DAMAYANTHI, D.; HARBINDAR, J.S. Leptin and its actions on reproduction in males. **Asian Journal Andrology**, v.21, n.3, p.296-299, 2019.

IQBAL, J.; KUROSE, Y.; CANNY, B.; CLARKE, I.J. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. **Endocrinology**, v.147, p.510-519, 2006.

JEFFERY, P.L.; HERINGTON, A.C.; CHOPIN, L.K. Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. **Journal of Endocrinology**, v.172, n3, p.R7-11, 2002.

KAY'S, S.K.; HINDMARSH, P.C. Catch-up growth: an overview. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v.3, n.4, p.365-78, 2006.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v.14, p.629-640, 1997.

KHERADMAND, A.; DEZFOULIAN, O.; ALIREZAEI, M.; RASOULIAN, B. Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.419, p.299-304. 2012.

KIM, I.Y.; ZELNER, D.J.; SENSIBAR, J.A.; AHN, J.A.; PARK, H.J.; KIM, L.; LEE, J.H. Modulation of sensitivity to transforming growth factor-beta 1 and the level of type II TGF-receptor in LNCaP cells by dihydrotestosterone. **Experimental Cell Research**, v.222, p.103-110, 1996.

KIM, J.H.; LEE, S.Y.; MYUNG, S.C.; KIM, Y.S.; KIM, T-H.; KIM, M.K. Clinical significance of leptin and leptin receptor expressions in prostate tissues. **Asian Journal of Andrology**, v.10, p.923-8, 2008.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physiological Reviews**, v.85, p.495-522, 2005.

KURITA, T.; MEDINA, R.T.; MILLS, A.A.; CUNHA, G.R. Role of p63 and basal cells in the prostate. **Development**, v.131, n.20, p.4955-64, 2004.

LEANDRO, C.G.; AMORIM, M.F.; HIRABARA, S.M.; CURI, R.; MANHÃES DE CASTRO, R. Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição? **Revista de Nutrição**, v.22, p.559-569, 2009.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Foundation Symposium**, v.156, p.38-50, 1991.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **Journal of Nutrition**, p.401S-406S, 1998.

LUCAS, A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. **Archives of Disease in Childhood**, v.71, p.288-290, 1994.

LUCAS, A.; BARKER, B.A.; DESAI, M.; HALES, C.N. Nutrition in pregnant or lactating rats programs lipid metabolism in the offspring. **British Journal of Nutrition**, v.76, p.605-12, 1996.

MALENDOWICZ, W.; RUCINSKI, M.; MACCHI, C.; SPINAZZI, R.; ZIOLKOWSKA, A.; NUSSDORFER, G.G.; KWIAS, Z. Leptin and leptin receptors in the prostate and seminal vesicles of the adult rat. **International Journal of Molecular Medicine**, v.18, n.4, p.615-8, 2006.

MARKER, P.C.; DONJACOUR, A.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G.R. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v.253, p.165-73, 2003.

MARTINELLI JR., C.E.; CUSTÓDIO, R.J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52/5, p.717-725, 2008.

MATTOS, S.S. Programação intra-uterina para doenças da vida adulta. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.52, p.1993-4, 2006.

McARDLE, H.J. Fetal programming causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats – a review. **Placenta**, v.27, p.56-60, 2006.

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, 2005.

MUCCIOLI, G.; TSCHOP, M.; PAPOTTI, M.; DEGHENGI, R.; HEIMAN, M.; GHIGO, E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: Implications in metabolism and obesity. **European Journal of Pharmacology**, v.440, p.235-254, 2002.

MUKHERJEE, P.; SOTNOKOV, A.V.; MANGIAN, H.J.; ZHOU, J.R.; VISEK, W.J.; CLINTON, S.K. Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. **Journal of the National Cancer Institute**, v.91, p.512-23, 1999.

NIU, Y.; XU, Y.; ZHANG, J.; BAI, J.; YANG, H.; MA, T. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. **BJU International**, v.87, p.386-93, 2001.

OZANNE, S.E. Metabolic programming in animals. **British Medical Bulletin**, v.60, p.143-52, 2001.

PARSONS, J.K.; SARMA, A.V.; MCVARY, K.; WEI, D.J.T. Obesity and benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging etiological paradigms and future directions. **Journal of Urology**, v.182, n. 6, p.S27-S31, 2009.

PÔRTO, L.C.J. **Efeito da restrição alimentar intra-uterina sobre a resposta serotoninérgica hipotalâmica à ingestão alimentar na vida adulta**. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2003.

PRAHALADA, S.; TARANTAL, A.F.; HARRIS, G.S.; ELLSWORTH, K.P.; CLARKE, A.P.; SKILES, G.L. MaCKENZIE, K.I.; KRUK, L.F.; ABLIN, D.S.; CUKIERSKI, M.A.; PETER, C.P.; VANZWIETEN, M.J.; HENDRICKX, A.G. Effects of finasteride, a type 2 5-alpha reductase inhibitor, on fetal development in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Teratology**, v.55, p.119-131, 1997.

PRINS, G.S.; HUANG, L.; BIRCH, L.; PU, Y. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1089, p.1-13, 2006.

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

RAMADAN, W.S.; ALSHIRAIHI, I.; AL-KARIM, S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. **Annals of Anatomy**, v.19, p.68-76, 2013.

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, n.2, p.180-5, 2009.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR., 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. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-51, 1993.

REPACI, A.; GAMBINERI, A.; PAGOTTO, U.; PASQUALI, R. Ghrelin and reproductive disorders. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.40, p.70-79, 2011

RHINEHART, E. M. Mechanisms linking energy balance and reproduction: impact of prenatal environment. **Molecular Hormone Clinical Biology Research**, v.25 (1), p. 29–43, 2016.

RIBEIRO, R.; LOPES, C.; MEDEIROS, R. The link between obesity and prostate cancer: the leptin pathway and therapeutic perspectives. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v.9, n.1, p.19-24, 2006.

RINALDI, J.C.; JUSTULIN, L.A.; LACORTE, L.M.; SAROBO, C.; BOER, P.A.; SCARANO, W.R.; FELISBINO, S.L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. **Life Sciences**, v.92, p.763-774, 2013.

RINALDI, J.C.; SANTOS, S.A.A.; COLOMBELLI, K.T.; BIRCH, L.; PRINS, G.S.; JUSTULIN, L.A.; FELISBINO, S.L. Maternal protein malnutrition: effects on prostate development and adult disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, p.1-12, 2018.

ROSEBOOM, T.J.; VAN DER MEULEN, J.H.; RAVELLI, A.C.; OSMOND, C.; BARKER, D.J.; BLEKER, O.P. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Twin Research and Human Genetics**, v.4, p.293-298, 2001.

ROSS, M.G.; DESAI, M. Gestational programming: population survival effects of drought and famine during pregnancy. **American Journal Regulatory Comparative Physiology**, v.288, p.R25-R33, 2005.

SAGLAM, K.; AYDUR, E.; YILMAZ, M.I.; GOKTAS, S. Leptin influences cellular differentiation and progression in prostate cancer. **Journal of Urology**, v.169, n.4, p.1308-1311, 2003.

SANTTI, R.; NEWBOLD, R.R.; MÄKELA, S.; PYLKKÄNEN, L.; MCLACHLAN, J. Developmental estrogenization and prostatic neoplasia. **The Prostate**, v.24, p.67-78, 1994.

SHAPPELL, S.B.; THOMAS, G.V.; ROBERTS, R.L.; HERBERT, R.; ITTMANN, M.M.; RUBIN, M.A. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the mouse models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, v.64, p.2270-230, 2004.

SIGNORETTI, S.; WALTREGNY, D.; DILKS, J.; ISAAC, B.; LIN, D.; GARRAWAY L.; YANG, A.; MONTIRONI, R.; McKEON, F.; LODA, M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. **American Journal Pathology**, v.157, n.6, p.1769-75, 2000.

SKAKKEBÆK, N.E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; JØRGENSEN, N.; MAIN, K.M.; LEFFERS, H.; ANDERSSON, A.M.; JUUL, A.; JENSEN, T.K.; TOPPARI, J. Testicular cancer trends as 'whistle blowers' of testicular developmental problems in populations. **International Journal of Andrology**, v.30, p.198-205, 2007.

SKAKKEBÆK, N.E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; MAIN, K.M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. **Human Reproduction**, v.16, p.972-978, 2001.

TANNENBAUM, A. The dependence of the genesis of induced skin tumors on caloric intake during different stages of carcinogenesis. **Cancer Research**, v.4, p.673-7, 1944.

TANNENBAUM, A. The dependence of tumor formation on the composition of the calorie restricted diet as well as on the degree of restriction. **Cancer Research**, v.5, p.616-25, 1945.

TANNENBAUM, A. The genesis and growth of tumors. II Effects of caloric restriction per se. **Cancer Research**, v.2, p.460-7, 1942.

TAPLIN, M.E.; HO, S.M. Clinical review 134: the endocrinology of prostate cancer. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, n.8, p.3467-77, 2001.

TEERDS, K.J.; ROOIJ, D.G.; KEIJER, J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. **Human Reproduction Update**, v.17, n.5, p.667-683, 2011.

TEIXEIRA, C.V.; SILANDRE, D.; DE SOUZA SANTOS, A.M.; DELALANDE, C.; SAMPAIO F.J.; CARREAU, S.; FONTE RAMOS, C. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. **Journal of Endocrinology**, v.192, p.301-11, 2007.

TEIXEIRA, C.; PASSOS, M.; RAMOS, C.; DUTRA, S.; MOURA, E. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.493-98, 2002.

TENA-SEMPERE, M.; BARREIRO, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, p.9-13, 2002.

TOLEDO, F.C.; PEROBELLI, J.E.; PEDROSA, F.P.C.; ANSELMO, F.; JANETE, A.; KEMPINAS, W. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, p.1477-7827, 2011.

VAN DER LELY, A.J.; TSCHOP, M.; HEIMAN, M.L.; GHIGO, E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. **Endocrine Reviews**, v.25, n.3, p.426-457, 2004

VULLIEMOZ, N.R.; XIAO, E.; XIA-ZHANG, L.; GERMOND, M.; RIVIER, J.; FERIN, M. Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, p.5718-5723, 2004.

WANG, J.J.; WU, Z.L.; LI, D.F.; LI, N.; DINDOT, S.V.; SATTERFIELD, M.C.; BAZER, F.W.; WU, G.Y. Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.2, p.282-301, 2012.

WANG, Y.; HAYWARD, S.; CAO, M.; THAYER, K.; CUNHA, G. Cell differentiation lineage in the prostate. **Differentiation**, v.68, p.270-279, 2001.

WATTEZ, S.J. Perinatal nutrition programs the hypothalamic melanocortin system in offspring. **Hormone and Metabolic Research**, v.45, n.13, p.980-990, 2013.

WAUTERS, M.; CONSIDINE, R.V.; VAN GAAL, L.F. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. **European Journal of Endocrinology**, v.143, p.293-311, 2000.

WELSH, M.; SAUNDERS, P.T.K.; FISKEN, M.; SCOTT, H.M.; HUTCHISON, G.R.; SMITH, L.B.; SHARPE, R.M. 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, p.1479-1490, 2008.

WHO. **Malnutrition**. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/malnutrition/en/>. Acesso em: 01 abr. 2019.

YAN, W.; KERO, J.; HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/ckit system in Leydig cell development. **Developmental Biology**, v.227, p.169-182, 2000a.

YAN, W.; SUOMINEN, J.; TOPPARI, J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. **Journal of Cell Science**, v.113, p.161-168, 2000b.

YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLET, E.; FLEMING, M.D.; DOTSCHE, V.; ANDREWS, N.C.; CAPUT, D.; MCKEON, F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Molecular Cell**, v.2, p.305-316, 1998.

YEH, A.H.; JEFFERY, P.L.; DUNCAN, R.P.; HERINGTON, A.C.; CHOPIN, L.K. Ghrelin and a novel preproghrelin isoform are highly expressed in prostate cancer and ghrelin

activates mitogenactivated protein kinase in prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.23, p.8295-8303, 2005.

YOUNG, K.A.; ZIRKIN, B.R.; NELSON, R.J. Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.347-354, 2000.

ZIGMAN, J.M.; ELMQUIST, J.K. From anorexia to obesity - the Yin and Yang of body weight control. **Endocrinology**, v.144, p.3749-3756, 2003.