

**PROGRAMAÇÃO FETAL POR RESTRIÇÃO PROTEICA *IN UTERO*:
AVALIAÇÃO DO *IMPRINTING* ESTROGÊNICO NAS PRÓSTATAS
VENTRAL E DORSOLATERAL DO RATO WISTAR**

JAQUELINE DE CARVALHO RINALDI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Profº Drº Sérgio Luis Felisbino

Botucatu - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**PROGRAMAÇÃO FETAL POR RESTRIÇÃO PROTEICA *IN UTERO*:
AVALIAÇÃO DO *IMPRINTING* ESTROGÊNICO NAS PRÓSTATAS
VENTRAL E DORSOLATERAL DO RATO WISTAR**

JAQUELINE DE CARVALHO RINALDI

ORIENTADOR: Profº Drº SÉRGIO LUIS FELISBINO

COORIENTADOR: Profº Drº LUIS ANTONIO JUSTULIN JÚNIOR

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Botucatu - SP

2013

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

Rinaldi, Jaqueline de Carvalho.

Programação fetal por restrição proteica *in útero* : Avaliação do *imprinting* estrogênico nas próstatas ventral e dorsolateral do rato Wistar / Jaqueline de Carvalho Rinaldi. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Sérgio Luis Felisbino

Coorientador: Luis Antônio Justulin Júnior

Capes:20600003

1.Estrógenos. 2. Próstata. 3. Desnutrição fetal. 4. Desnutrição protéico - energética. 5. Testosterona.

Palavras-chave: estrógeno, próstata, programação fetal, restrição proteica materna, testosterona.

Botucatu, 08 de março de 2013.

Rinaldi, Jaqueline de Carvalho

Programação fetal por restrição proteica *in útero*: Avaliação do *imprinting* estrogênico nas próstatas ventral e dorsolateral do rato Wistar.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

(orientador – UNESP/Botucatu - SP)

Prof.^a Dr.^a Estela Sasso Cerri

(UNESP/Araraquara - SP)

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga

(UNESP/São José do Rio Preto - SP)

Prof.^a Dr.^a Raquel Fantin Domeniconi

(UNESP/Botucatu - SP)

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Magalhães Lazari

(UNIFESP/São Paulo - SP)

Prof.^a Dr.^a Rejane Maira Goes

(UNESP/São José do Rio Preto - SP)

Prof.^a Dr.^a Cleida Aparecida Oliveira

(UFMG/Belo Horizonte - MG)

Prof.^a Dr.^a Patrícia Fernanda Felipe

(UNESP/Botucatu - SP)

Dedicatória

*Ao meu amado Andréson,
Por acreditar no meu potencial e por seu apoio incondicional...
Essa tese também é sua!!
Agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho.
Amo você!*

Agradecimento Especial

A Deus

Fonte de minha força, coragem e inspiração. Ele provou que as adversidades despertam em nós capacidades que teriam ficado adormecidas se existissem apenas circunstâncias favoráveis. Muito obrigada por mais essa vitória! Também sou grata a Ele pelas pessoas maravilhosas que conheci nesta jornada e que permitiram minha evolução emocional e científica.

“Deus me mostrou verdades muito grandes, e eu as amei, tomei-as para mim. mas foi no andar diário ano após ano, dor após dor e lutas após lutas, que elas tomaram posse, então, de mim.”- Lettie Cowman

Aos meus pais Hélio e Irene,

Vocês são meus alicerces!! Serei eternamente grata pelo apoio, carinho, compreensão e muitos outros sentimentos verdadeiros com os quais me criaram e me ensinaram a viver, tornando-me o ser humano que sou hoje. Vocês são exemplos de vida, não somente para mim, mas para todos que os conhecem. Amo vocês!

Ao meu amigo e orientador Dr. Sérgio,

A quem tenho profundo respeito e admiração. Você me contagiou com seu entusiasmo e curiosidade científica. O meu MUITO OBRIGADA por permitir que eu fizesse parte da família LabMec, pela oportunidade do estágio no exterior e por sempre confiar no meu trabalho. Sinto-me horada em dizer que você é a minha referência de pesquisador e professor. “Do homem eminente, podemos aprender mesmo quando se mantem em silêncio” – Sêneca.

Agradecimentos

Ao coorientador e amigo Dr. Luís Antonio Justulín Jr, sou grata pelo acolhimento, disponibilidade e pela confiança depositada em mim. A sua visão dinâmica e a abertura a novas tecnologias, sempre me estimularam a ir mais além! Você é meu exemplo de humildade e competência.

Aos professores que aceitaram o convite para constituírem a banca examinadora desta tese. Obrigada por contribuírem com a minha formação!

Aos professores Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Dra. Renné Laufer Amorin e Dra. Patrícia Pinheiro, pela participação na fase da minha qualificação e pelas contribuições científicas.

A Dra. Gail Susan Prins pela oportunidade de estágio de 3 meses em seu laboratório na UIC (University of Illinois at Chicago) que permitiu não somente a experiência na área profissional, mas também por ter conhecido uma cultura diferente da minha e ter feito valiosas amizades.

Aos professores Dr. Wagner J Fávaro, Dr. Wellerson R Scarano, Dra. Renée L Amorin e Dra. Patrícia A Boer, sou grata pelas sugestões científicas e críticas construtivas que auxiliaram na elaboração dos artigos apresentados nesta tese.

A coordenadoria e professores do programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada pela excelência na formação de seus alunos. Eu não só aprendi muito, mas me apaixonei ainda mais pela histologia, embriologia e biologia celular.

Aos secretários da seção de pós-graduação pela paciência, competência e profissionalismo nos processos burocráticos para a execução desta tese.

Aos professores do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu pelo acolhimento, conhecimento compartilhado e pela oportunidade que me concederam de atuar em aulas na graduação através do estágio docência.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu pela colaboração e pela agradável convivência. Especialmente à

secretária Luciana, aos técnicos José Eduardo, Ricardo e Vivian. Também não poderia deixar de agradecer a Iolanda e a querida Terezinha (Dona Tera), pessoas adoráveis, sempre dispostas a ajudar!

A Claudete, Tiago e Lígia, funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica que me auxiliaram com o processamento do material para análise ultraestrutural.

Aos amigos do LabMec Livia (Lívita, o lab não era o mesmo sem você), Flávia (Flá, obrigado por todas as dúvidas tiradas), Carolina (Carolzinha, minha companheira de imuno), Carina (sempre animando a todos), Justulin (Justo, você foi, sem dúvida a alma do lab), Andrei (Andreco, suas frases divertidas sempre fizeram a diferença no lab), Marcela, Heloisa, Bruna, Elisa, Amanda e Alexandre. Obrigado pelo carinho, companheirismo e pelos bons momentos que passamos dentro e fora do laboratório. Vocês me mostraram que “o essencial é invisível aos olhos, só se vê com o coração”- Saint-Exupéry.

A Heloisa (Maguila) por sua disponibilidade em ajudar e por gentilmente permitir meu aprendizado de orientá-la em seu projeto de iniciação científica. Ter trabalhado contigo foi um privilégio enorme.

Aos colegas do Departamento de Morfologia, IB, Unesp de Botucatu: Ana Cláudia, Marcão, Fernanda Carani, Rodrigo, Ivan, Luana, Bruno, Warley, Fernanda Piculo, Gabriela, Edson, Léo, Tatá, Nelci, Marcos, Joyce, Dani, Carol, Leticia, Ariane, Leonarndo, Kelly, Fernanda Losi e Glaura pelos momentos de descontração que atenuaram a seriedade do curso de doutorado.

Aos colegas do laboratório de andrologia da UIC: Wen-Yang, Dan-Ping-Hu (Grace), Lynn Birch, Esther Calderon, Ikenna Madueke e em especial Guang-Bin por me receberem com carinho em Chicago e me ensinarem pacientemente o “caminho das pedras” no universo da cultura celular de stem cells.

As amigas Érica e Livia, minhas roommates, por vibrarem com as minhas conquistas e sofrerem com os meus fracassos durante esta jornada! Aprendi muito com vocês, obrigada por tudo!! Nossa amizade é para sempre!

Aos amigos de Formosa (PR) e Dourados (MS) que sempre me incentivaram nesta caminhada.

A todos da minha família, agradeço pelas palavras de força e otimismo que me ensinaram a perseverar sempre, independentemente do tamanho dos obstáculos. Vocês me fizeram compreender que o mais importante na vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos.

A minha querida irmã Jociane (sempre abrilhantando a nossa família com seu exemplo) e aos meus grandes amigos e sogros Altamir e Adelaide (pessoas sensacionais que me adotaram como filha). Também sou grata aos meus sobrinhos Gabriel, Vitória, Felipe e Nicole pelos abraços, risadas e por me nutrirem de afeto.

Ao meu querido esposo Andreilson por valorizar a minha carreira profissional, acreditar nos meus sonhos e estar sempre comigo, não importando a distância dos nossos corações.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (09/50204-6) e por me manter em dedicação exclusiva. Também agradeço por ter financiado o meu projeto através do auxílio pesquisa (09/52747-7).

Aos animais experimentais, os quais tratamos com todo o respeito e consideração: “Foste para nós vítimas solicitadas pela ciência para benefício da humanidade, porém, apesar do teu olhar mudo e de não teres a permissão da palavra, isso não nos impedirá de dizer-te sempre: Muito obrigada” autor desconhecido.

Agradeço, de coração, a todos que de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Enquanto suspiramos por uma vida sem dificuldades,
devemos nos lembrar que o carvalho cresce forte através de ventos contrários
e que os diamantes são formados sob pressão” – Peter Marshall*

Lista de Abreviaturas e Siglas

(Abreviações que aparecem no texto em português e em inglês que contem o mesmo significado estão apresentadas em conjunto)

- 11 β HSD2** – 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 placentária.
- AR** – receptor de andrógeno.
- CaP** – câncer de próstata.
- CK** – citoqueratina.
- DAG** ou **AGD** – distância ano-genital.
- DG** ou **GD** – dia gestacional.
- DHT** – diidrotestosterona.
- DOHaD** – *Developmental Origin of Health and Disease*.
- DPN** ou **PND** – dia pós-natal.
- E** – estrógeno.
- ER** – receptor de estrógeno.
- FSH** – hormônio folículo estimulante.
- HGPIN** – neoplasia intraepitelial prostática de alto grau.
- HPB** ou **BPH** – hiperplasia prostática benigna.
- LGPIN** – neoplasia intraepitelial de baixo grau.
- LH** – hormônio luteinizante.
- MEC** – matriz extracelular.
- NP** – prole de animais que receberam dieta padrão ou normoproteica.
- NPH** – prole de animais que receberam dieta padrão ou normoproteica e permaneceram por 17 semanas com implante hormonal (testosterona+estradiol).
- PA** ou **AP** – lobo prostático anterior.
- PBS** – tampão fosfato-salina.
- PCNA** – antígeno nuclear de células proliferativas.
- PCR** – reação em cadeia da polimerase.
- PD** ou **DP** – lobo prostático dorsal.
- PDL** ou **DLP** – lobo prostático dorsolateral.
- PFG** ou **MPM** – programação fetal por restrição proteica materna gestacional.
- PIN** – neoplasia intraepitelial prostática.
- PL** ou **LP** – lobo prostático lateral.
- PSA** – antígeno prostático específico.
- PV** ou **VP** – lobo prostático ventral.
- RP** – prole de animais que receberam dieta com restrição proteica no período gestacional.
- RPH** – prole de animais que receberam dieta com restrição proteica no período gestacional e permaneceram por 17 semanas com implante hormonal (testosterona+estradiol).
- T** – testosterona.
- VS** ou **SV** – vesícula seminal.

Sumário

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Programação fetal por restrição proteica materna.....	15
1.2 Aspectos morfofisiológicos da próstata.....	19
1.3 Características do desenvolvimento da próstata.....	22
1.4 Regulação hormonal da próstata.....	26
1.5 Afecções prostáticas.....	30
1.5.1 Prostatite e atrofia inflamatória proliferativa.....	30
1.5.2 Hiperplasia prostática benigna.....	31
1.5.3 Neoplasia intraepitelial prostática.....	32
1.5.4 Câncer de próstata.....	33
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA PROPOSTO.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivos gerais.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 <i>Capítulo I: Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging - Life Sciences, 2013, In Press</i>	38
4.2 <i>Capítulo II: Intrauterine protein malnutrition increases susceptibility to prostate neoplasias in adult rat after steroid exposure – manuscrito a ser submetido ao periódico The Prostate</i>	65
4.3 <i>Capítulo III: Restrição proteica gestacional altera o padrão de resposta da próstata de ratos adultos à manipulação hormonal – manuscrito a ser submetido ao periódico Cell and Tissue Research</i>	95
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
6. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	120
ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	128
ANEXO II: Imagens do procedimento experimental referente ao capítulo II.....	129
ANEXO III: Estágio de doutorado no exterior.....	131

RESUMO

Rinaldi, JC. **Programação fetal por restrição proteica *in útero*: Avaliação do *imprinting* estrogênico nas próstatas ventral e dorsolateral do rato Wistar** [Tese]. Botucatu, São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2013.

A programação fetal por restrição proteica materna durante a gestação (PFG) torna o feto exposto a altas concentrações de hormônios maternos, predispõe o indivíduo a desenvolver síndrome metabólica, diminui a taxa de fertilidade e altera o tempo de instalação da puberdade. No entanto, pouca atenção tem sido destinada ao estudo dos efeitos da PFG sobre o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino, particularmente a próstata que além de sua importância para a fertilidade apresenta alta incidência de doenças na idade adulta e senil. Assim, este projeto teve por objetivo investigar os impactos da PFG sobre o desenvolvimento da próstata e se a PFG promove o *imprinting* estrogênico na próstata. Para isso, ratos Wistar nascidos de ratas alimentadas com dieta padrão (grupo NP, dieta AIN93G contendo 17% de proteína) ou dieta com restrição proteica (grupo RP, dieta AIN93G modificada contendo 6% de proteína) foram divididos em três experimentos. *Experimento 1*: os lobos prostáticos ventral (PV) e dorsolateral (PDL) foram coletados de animais NP e RP sacrificados com 30, 120 e 360 dias para a padronização do modelo experimental e a descrição dos efeitos da PFG sobre o desenvolvimento, crescimento, maturação e envelhecimento da próstata. *Experimento 2*: as PV e PDL de animais NP e RP (17 semanas de idade) expostos durante 17 semanas aos hormônios testosterona e estradiol (implante subcutâneo com liberação diária de 0,08 mg de 17 β -estradiol e 0,8 mg de propionato de testosterona) foram coletadas no intuito de avaliar se a PFG desencadeou *imprinting* hormonal e tornou a próstata mais susceptível a afecções na idade adulta. *Experimento 3*: animais NP e RP submetidos a castração cirúrgica ou castração química (0,08 mg/kg/dia de 17 β -estradiol) ou suplementação androgênica (4 mg/kg/dia de cipionato de testosterona) tiveram a PV coletada para investigar se o *imprinting* hormonal desencadeado pela PFG alterou o padrão de resposta glandular a estas manipulações. Depois de dissecadas, as próstatas foram processadas para análises morfológicas, ultraestruturais, morfométricas, imuno-histoquímicas, western blotting e RT-PCR em tempo real. Os resultados obtidos destes experimentos demonstraram que a PFG atrasou o desenvolvimento da próstata do rato, reduziu as taxas séricas de andrógenos circulantes e promoveu fibrose no estroma prostático. Também foi constatado que a próstata dos animais programados apresentaram menor atrofia glandular à ablação hormonal, sugerindo uma resposta adaptativa ao menor estímulo androgênico. E apesar de alguns parâmetros das glândulas sexuais acessórias não apresentarem diferenças significativas entre os animais NP e RP, quando estes mesmos animais foram desafiados através da manipulação hormonal foi possível observar que estas glândulas responderam de forma diferente, sendo que os animais RPH apresentaram maior incidência de lesões proliferativas. Em conjunto, os resultados destes três experimentos permitem concluir que os animais programados pela PFG apresentam características de animais que sofreram *imprinting* estrogênico. Populações vulneráveis à programação fetal por restrição proteica devem estar atentas, além do risco ao desenvolvimento da síndrome metabólica, a questões de saúde do sistema reprodutor e urogenital masculino.

Palavras-chave: estrógeno, próstata, programação fetal, restrição proteica materna, testosterona.

ABSTRACT

Rinaldi, JC. **Fetal Programming by maternal low protein diet: Evaluation of the estrogen imprinting in rat ventral and dorsolateral prostate** [Thesis]. Botucatu, São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2013.

The fetal programming by maternal protein malnutrition (MPM) makes the fetus exposed to high concentrations of maternal hormones, predisposes individuals to develop metabolic syndrome, reduces the fertility rate and changes the time of onset of puberty. However, little attention has been devoted to studying the effects of MPM on the development of the male reproductive system, particularly the prostate that besides its importance for fertility, it has high incidence of disease in adulthood and senile. In this sense, the study aimed to investigate the impacts of MPM on development of the prostate and if the MPM is able to promote the estrogen imprinting in the prostate. For this, *Wistar* rats born from rats fed with standard diet (NP group, AIN93G diet = 17% protein) or a restricted protein diet (RP group, AIN93G modified diet = 6% protein) were divided into three experiments. *Experiment 1*: ventral prostate (VP) and dorsolateral (DLP) were collected from NP and RP animals sacrificed with 30, 120 and 360 days for the standardization of the experimental model and description of the PFG effects on prostate development, growth and maturation aging. *Experiment 2*: VP and the DLP from NP and RP animals (17 weeks-old) that were exposed for 17 weeks to hormones testosterone plus estradiol (subcutaneous implant of 0.08 mg of 17 β -estradiol and 0.8 mg propionate testosterone day-release) were collected in order to assess whether the MPM triggered hormonal imprinting and become more susceptible to prostate disorders in adulthood. *Experiment 3*: VP from NP and RP animals underwent to surgical castration or chemical castration (0.08 mg/kg/day 17 β -estradiol) or androgen supplementation (4 mg/kg/day of testosterone cypionate) were collected to investigate whether hormonal imprinting triggered by PFG changed the pattern of glandular response to these manipulations. Once dissected, the prostates were processed for morphological, ultrastructure, morphometric, immunohistochemical, western blotting and real time RT-PCR analysis. The results of these experiments demonstrated that the MPM delayed the development of rat prostate, reduced serum levels of androgens and promoted fibrosis in prostatic stroma. It was also noted that the prostate of animals scheduled to glandular atrophy had lower hormone ablation, suggesting an adaptive response to lower androgen stimulation. And although some parameters of the accessory sex glands do not present significant differences between NP and RP animals, when these same animals were challenged by manipulating hormone was observed that these glands responded differently, with higher incidence of proliferative lesions. Together, the results of these three experiments allow us to conclude that animals programmed by MPM exhibit characteristics of animals undergoing estrogen imprinting. Populations vulnerable to fetal programming by protein restriction should be aware, in addition to the risk of developing metabolic syndrome, to the health issues on male urogenital system.

Keywords: estrogen, fetal programming, low protein diet, prostate, testosterone.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Programação fetal por restrição proteica materna

O período de desenvolvimento intrauterino representa uma fase de alta vulnerabilidade e portanto é sensível a insultos tanto nutricionais quanto a agentes químicos ambientais. Dependendo do tipo, da dose e do tempo de exposição ao insulto, as consequências são diversas, desde baixo peso ao nascimento, desvios no desenvolvimento, maior susceptibilidade à doenças na idade adulta ou mesmo a morte. Estes eventos ocorrem em função de mudanças no padrão de expressão de genes responsáveis por diversas vias de sinalização que atuam durante esta fase do desenvolvimento, alteração de proliferação celular e/ou diferenciação celular e alteração na proporção dos diferentes tipos celulares que constituem órgãos e sistemas. Tais mudanças podem levar a alterações na morfologia dos tecidos, afetar de modo irreversível o funcionamento dos órgãos e sistemas bem como comprometer sua longevidade (Qasem *et al.*, 2012). Estas respostas adaptativas de um organismo frente a insultos durante um período crítico de desenvolvimento intrauterino e que afeta os órgãos de maneira irreversível, denomina-se **programação fetal** (Barker *et al.*, 1989). A programação fetal, posteriormente também denominada *developmental origin of health and disease* (DOHaD), estabelece a hipótese de que eventos ocorridos no período intrauterino ou perinatal são “memorizados” pelo organismo em desenvolvimento através do *imprinting* fetal ou neonatal (Langley-Evans e McMullen, 2010) (Fig. 1).

Dentre os modelos conhecidos de programação fetal, a restrição proteica na dieta oferecida a ratas gestantes e/ou lactantes é um dos mais utilizados (McMullen and Robinson, 2005). O principal indicador de que os mecanismos adaptativos envolvidos no desencadeamento da programação fetal foram acionados durante o desenvolvimento é a redução da taxa de crescimento intrauterino, constatado devido ao baixo peso ao nascimento (Langley-Evans e McMullen, 2010). A dieta materna influencia no crescimento fetal uma vez que fornece glicose, aminoácidos além de outros nutrientes essenciais a formação e crescimento do conceito por transferência placentária (Robinson *et al.*, 1999; Yang and Huffman, 2013). Diversos estudos demonstram que, indivíduos com baixo peso ao nascimento (seja por prematuridade ou por restrição de crescimento) apresentam maior incidência de hipertensão, cardiopatia e síndrome metabólica, considerados grandes problemas de saúde pública, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos países desenvolvidos (Barker, 2003; Gao *et al.*, 2013).

A literatura também descreve que a programação fetal por restrição proteica materna durante a gestação (PFG) e/ou lactação induz alterações morfofuncionais em diferentes

órgãos (Brameld *et al.*, 1998) evidenciando o efeito generalizado (sistêmico) da má-nutrição materna. Neste sentido tem sido relatado: menor número de néfrons no rim (Habib *et al.*, 2011), menor quantidade de células beta e de ilhotas de Langerhans no pâncreas (Dahri *et al.*, 1991), proporção celular alterada entre os tipos celulares do fígado (Burns *et al.*, 1997), redução no número de capilares do cérebro (Bennis-Taleb *et al.*, 1999) e menor número de neurônios que controlam o apetite no hipotálamo (Plagemann *et al.*, 2001).

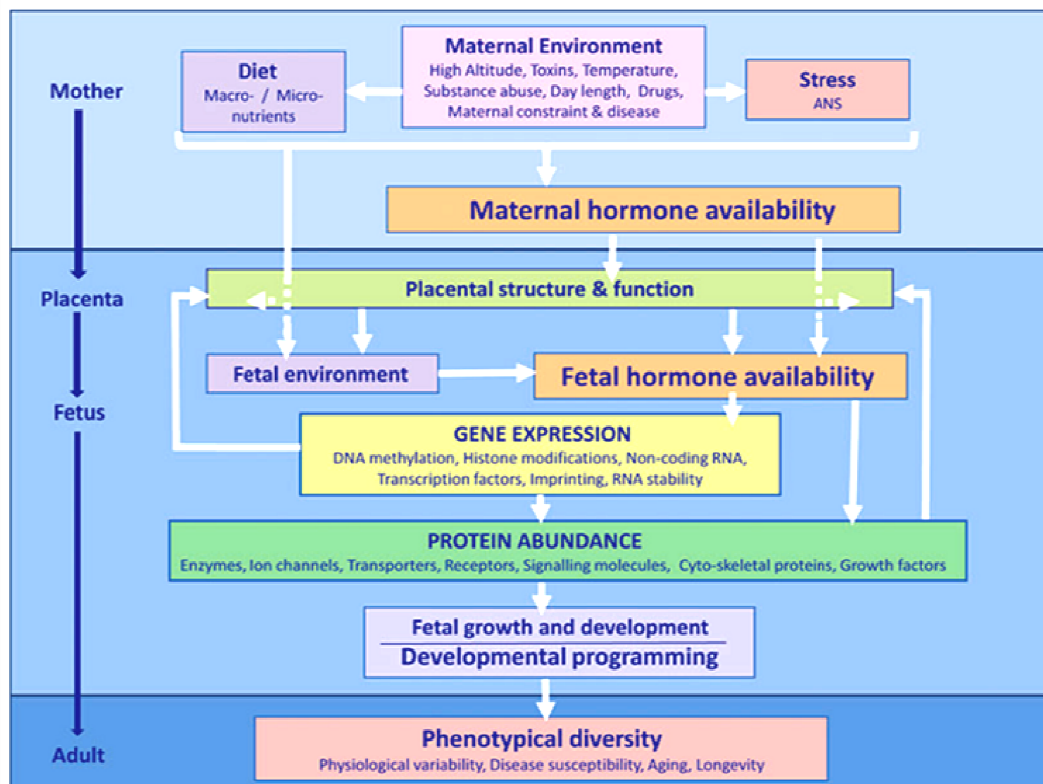


Figura 1. Diagrama proposto por Fowden e Forhead em 2009 para ilustrar os fatores desencadeadores da PFG e do *imprinting* hormonal durante o desenvolvimento.

Também é consenso que a PFG afeta o *status* metabólico e hormonal da prole (Gao *et al.*, 2013), promove disfunções vasculares (Torrens *et al.*, 2003), aumento na susceptibilidade à injúrias oxidativas (Langley-Evans e Sculley, 2005), problemas hepáticos (Erhuma *et al.*, 2007), compromete a imunidade (Calder e Jackson, 2000), altera o comportamento alimentar (Coupé *et al.*, 2009) e modifica a composição corpórea (Qasem *et al.*, 2012). Além das alterações observadas na prole, Zambrano *et al.* (2005) observaram um aumento dos níveis séricos de corticosterona, testosterona (T) e estrógeno (E) maternos durante a gestação. Estas alterações podem ser transmitidas à prole, interferindo no desenvolvimento do sistema reprodutor e na fertilidade destes animais. Em casos onde hormônios esteróides estão associados a estas alterações, o *imprinting* pode ser caracterizado como androgênico ou estrogênico.

Apesar do número crescente de estudos apontando os efeitos da PFG sobre diferentes órgãos, mecanismos que levam a estas alterações celulares e moleculares estão longe de ser totalmente conhecidos. Alguns estudos têm demonstrado que a restrição proteica materna diminui a atividade da enzima placentária 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 placentária (11 β HSD2) responsável, pelo menos em parte, pelo controle da transferência de glicocorticóides maternos ao embrião/feto. Com isso, ocorreria maior exposição a glicocorticóides maternos (Bertram *et al.*, 2001; Seckl e Holmes, 2007) (Fig. 2). Graham e Gandelman (1986), Barker *et al.* (1989) e Bertram *et al.* (2001) complementam que esteróides maternos e seus metabólitos podem atravessar a placenta e desencadear a ativação inadequada de determinados genes e consequentemente, promover mudanças permanentes na secreção hormonal ou na sensibilidade de órgãos dependentes de hormônios, como é o caso da próstata. A PFG também altera a expressão de β -cateninas e caderinas no endotélio vascular, acarretando no aumento da permeabilidade na placenta (Dejana, 1996).

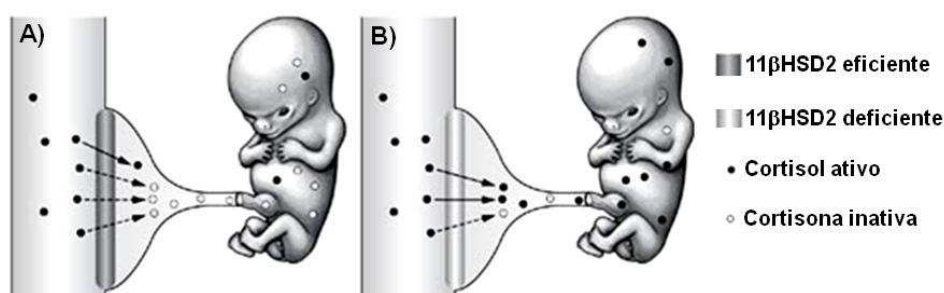


Figura 2. Imagem ilustrando a atividade da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 placentária (11 β HSD2). **A)** Em uma situação normal, a 11 β HSD2 converte os glicocorticóides maternos ativos (exemplo: cortisol) em seus metabólitos inativos (exemplo: cortisona) protegendo o feto; **B)** Diminuição da atividade da 11 β HSD2 na barreira placentária torna o feto exposto aos glicocorticóides maternos, podendo participar dos mecanismos adaptativos da PFG (modificado de Seckl e Holmes, 2007).

A programação fetal é tempo dependente, ou seja, dependendo a fase em que o insulto ocorre, diferentes órgãos ou sistemas podem sofrer desvios no desenvolvimento. No rato, o período de vulnerabilidade à PFG (janela de programação) da masculinização ocorre entre os dias 15,5 e 19,5 (McCarthy e Konkle, 2005) e da próstata entre os dias 18,5 e 19,5 podendo estender-se até 2 horas após o nascimento (Corbier *et al.*, 1992; Welsh *et al.*, 2008). Esse período coincide com o início de produção de T pelos testículos fetais (Fig. 3). Assim, se a síntese ou ação da T não for suficiente, ocorre prejuízo no processo de masculinização resultando em hipospadia, criptorquismo, próstata subdesenvolvida e redução da distância anogenital (Welsh *et al.*, 2008). Outras consequências desse processo que devem ser consideradas são: mutação no receptor de andrógeno (AR) e alteração na

expressão e atividade da enzima 5-alfa-redutase (Imperato-McGinley e Zhu, 2002). Se a ação androgênica continuar ocorrendo após o processo de masculinização, quando ambos LH (hormônio luteinizante) e seus receptores são expressos, pode também afetar o tamanho e/ou a estrutura dos testículos (Welsh *et al.*, 2008) levando a uma redução permanente na produção de T.

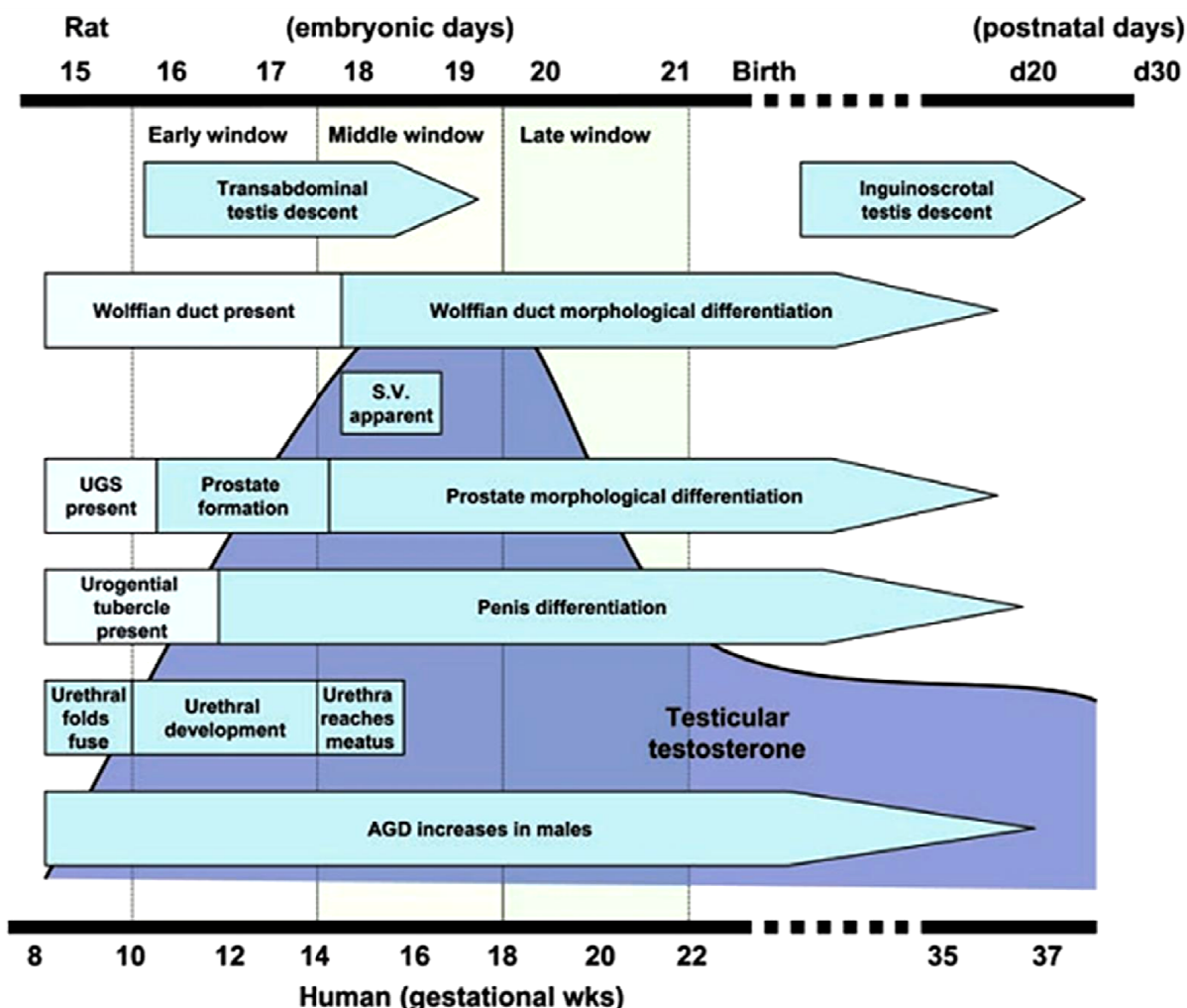


Figura 3. Diagrama ilustrativo do desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino em humanos e ratos em relação a produção de testosterona testicular (Welsh *et al.*, 2008).

Estudos experimentais relacionando os impactos da PFG por restrição proteica materna sobre as funções reprodutivas da prole ainda são escassos, mas pesquisas em animais demonstram alteração sobre o tempo e a progressão de instalação da puberdade (Van Weissenbruch *et al.*, 2005; Noriega *et al.*, 2009) e menor taxa de fertilidade (Santos *et al.*, 2004; Zambrano *et al.*, 2005). Além disso, em relação a prole de machos, também é relatado o aumento da distância anogenital (Zambrano *et al.*, 2005), alteração na concentração sérica de T e estradiol (Teixeira *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2010), menor expressão de receptores de andrógenos no testículo (Rodríguez-González *et al.*, 2012), menor expressão de aquaporina-9 no epidídimo (Arrighi *et al.*, 2010), menor quantidade e

tamanho dos ácinos na próstata dorsolateral (Ramos *et al.*, 2010). Estes resultados demonstram que o sistema reprodutor sofre alterações morfofuncionais com a PFG.

Assim, essas mudanças nos níveis hormonais observadas na mãe, aliadas às alterações no desenvolvimento sexual observadas na prole de machos, despertam atenções para a necessidade de se avaliar os efeitos PFG sobre o desenvolvimento e maturação da próstata que é um órgão dependente de andrógeno, exerce papel importante no sucesso reprodutivo e é alvo de doenças relevantes na população mundial. Além disso, recentemente, Gorbachinsky *et al.* (2010), Abdollah *et al.* (2011) e De Nunzio *et al.* (2012) demonstraram que a síndrome metabólica, que pode ser consequência da PGF, está envolvida na progressão de doenças prostáticas, tais como a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP).

1.2 Aspectos morfofisiológicos da próstata

A próstata é uma glândula exócrina acessória do aparelho reprodutor masculino cujo desenvolvimento e homeostasia se encontram sob controle androgênico (Cunha *et al.*, 1985). Ela secreta um complexo proteolítico composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolizina, enzimas específicas e outros fatores componentes do fluido seminal (Marker *et al.*, 2003). Esta secreção é fundamental para o sucesso reprodutivo pois liquefaz o ejaculado além de possuir enzimas, nutrientes e gradientes iônicos que alcalinizam o canal vaginal e garantem a motilidade dos espermatozóides (Aumüller e Seitz, 1990). Em algumas espécies, a próstata ainda produz proteínas importantes para a formação do “plug copulatório”, o qual atua como uma proteção contra a superfecundação (Cunha *et al.*, 1987). No homem, o principal componente da secreção prostática é o antígeno prostático específico (PSA), o qual é uma serina protease pertencente à família das calicreínas importantes para a dissolução do coágulo seminal (Wang *et al.*, 1979).

No homem adulto, a próstata localiza-se no compartimento subperitoneal, entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal posterior da sínfise púbica, anterior ao reto e inferior a bexiga (Schauer e Rowley, 2011). Estruturalmente ela é encapsulada por uma fina camada de tecido fibroelástico que lhe confere uma aparência não lobulada. Histologicamente a próstata pode ser dividida em três conjuntos de glândulas túbulo-alveolares: 1) glândulas da zona central ou periuretrais ou da mucosa; 2) glândulas da zona periférica ou glândulas principais; 3) glândulas da zona de transição ou da submucosa, além de uma região não glandular, o estroma fibromuscular anterior (Fig. 4A). Este estroma se estende anterior e lateralmente formando uma cápsula, que separa a próstata da gordura

periprostática (Roy-Burman *et al.*, 2004). Enquanto as zonas periférica e de transição se originam do seio urogenital, a zona central origina-se do ducto de *Wolffian* (Lee *et al.*, 2011).

No rato adulto, a próstata localiza-se caudal à bexiga e incompletamente ao redor da uretra (Roy-Burman *et al.*, 2004). Trata-se de uma glândula multi lobular dividida em 4 lobos bilateralmente simétricos, classificados em: ventral (PV), lateral (PL) e dorsal (PD) de acordo com a localização ao redor da uretra prostática, e um par de glândulas coaguladoras ou próstata anterior (PA) localizadas na face côncava das vesículas seminais (Marker *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2011) (Fig. 4B). Em alguns roedores, os lobos lateral e dorsal podem ser considerados uma única estrutura por se originarem de brotos na mesma região do seio urogenital (UGS), formando o lobo dorsolateral (PDL). Comparativamente, a PDL é análoga à zona periférica da próstata humana. A PA, por sua vez, é considerada homóloga a zona central e a PV não possui homologia com nenhuma das zonas da próstata humana apesar de ser a mais estudada por responder facilmente à modulação hormonal (Roy-Burman *et al.*, 2004).

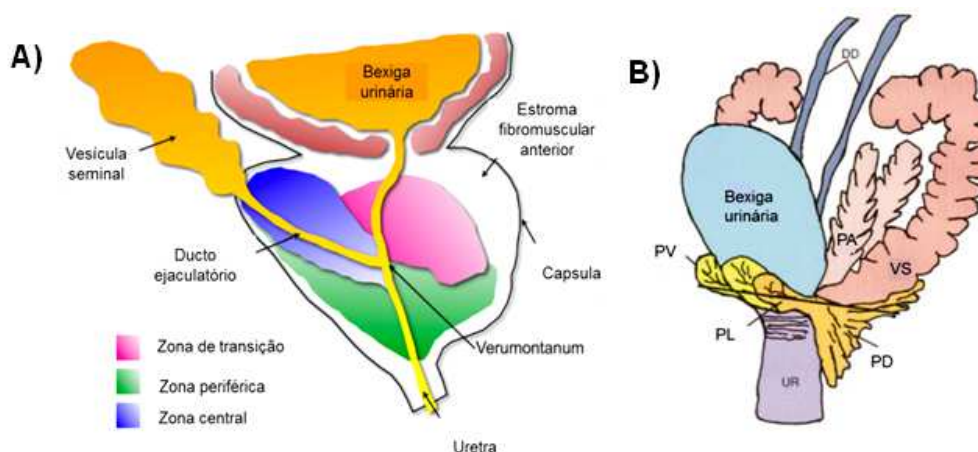


Figura 4. Imagem da próstata humana e de roedor. **A)** Ilustração esquemática das zonas anatômicas e funcionais da próstata humana adulta (Schauer e Rowley, 2011) e **B)** pares de lobos prostáticos de camundongo adulto (modificado de Cunha *et al.*, 1987). PV, próstata ventral; PD, próstata dorsal; PL, próstata lateral; PA, próstata anterior; VS, vesícula seminal; UR, uretra e DD, ducto deferente.

Histologicamente, a próstata é uma glândula túbulo-alveolar composta, cujos ductos, túbulos e alvéolos são revestidos por epitélio secretor simples que repousa sobre o estroma (Fig. 5A e B). Entre as células epiteliais e o estroma encontra-se a membrana basal, composta principalmente por colágeno IV e laminina (Nemeth e Lee, 1996). Envolvendo este órgão, tem-se uma cápsula fibromuscular, que confere diferentes formas ao órgão nos diversos mamíferos (Price, 1963). Cada lobo prostático é envolto e separado do outro por um estroma delgado, composto por apenas algumas células fusiformes distribuídas entre as fibras de colágenos e tecido conjuntivo frouxo, conferindo arquitetura lobulada à próstata. Além disso, os diferentes lobos da próstata do rato apresentam particularidades quanto ao

padrão de ramificação dos ductos (Hayashi *et al.*, 1991), padrão de expressão gênica (Takeda *et al.*, 1990), resposta a hormônios (Prins *et al.*, 1992), síntese proteica e tipo de secreção (Lee *et al.*, 1990). Outro fator a ser considerado é que cada lóbulo apresenta características histológicas distintas, como extensas pregas epiteliais na PA, dobras menores na PDL e pregas mínimas na PV (Cunha *et al.*, 1987).

A PV (Fig. 4B e 5A) é dividida em dois lóbulos (direito e esquerdo) compostos de oito conjuntos de ductos cada um. Estes ductos se originam a partir da uretra como uma estrutura tubular simples e se ramificam distalmente. Ao longo de sua extensão, os ductos podem ser arbitrariamente divididos nos segmentos distal, intermediária e proximal, de acordo com sua posição em relação à uretra (Lee *et al.*, 1990; Shabsigh *et al.*, 1999). Enquanto nas regiões distal e intermediária, as células epiteliais são colunares altas, na região proximal, estas células são cúbicas e baixas. Células em proliferação são mais frequentes no epitélio da região distal, células apoptóticas são mais abundantes na região proximal e células secretoras são mais diferenciadas na região intermediária (Nemeth e Lee, 1996). Em relação ao estroma, tanto na região intermediária como na proximal, o tecido fibroso está presente no espaço entre os ductos, ocasionalmente intercalando-se com a camada de células musculares lisas que é contínua na região intermediária e torna-se descontínua na região distal (Lee *et al.*, 1990). Independentemente da região prostática, todo o estroma é rico em elementos da matriz extracelular (MEC) (Augusto *et al.*, 2008).

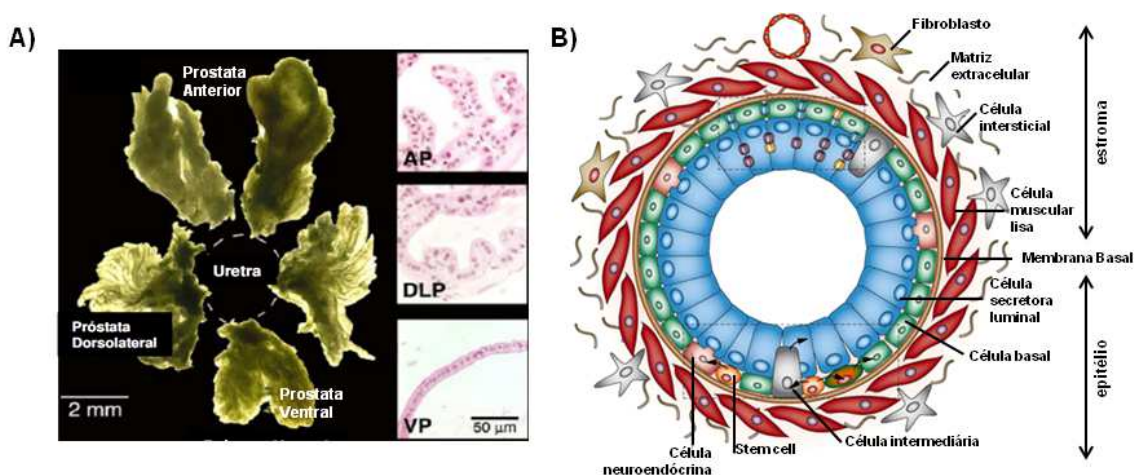


Figura 5. Imagem dos lobos prostáticos e sua organização celular. **A)** Aparência macroscópica e organização microscópica (coloração em H.E.) dos pares de lobos prostáticos do rato adulto (Marker *et al.*, 2003). **B)** Esquema da organização celular do epitélio e estroma prostático do homem adulto (modificado de Czyz *et al.*, 2012). AP, próstata anterior; DLP, próstata dorsolateral; VP, próstata ventral.

A PD origina-se da base da vesícula seminal, bilateralmente (Fig. 4B). Ela é constituída por um conjunto de ductos principais, que se ramificam extensamente formando uma estrutura arborizada. Estes ductos possuem poucas pregas e são revestidos por

células colunares baixas e com menor basofilia citoplasmática que as da PV. Ao redor dos ductos, encontra-se um espesso estroma fibromuscular formado por 2 a 4 camadas de células musculares lisas. Na luz dos ductos, ocorre acúmulo de uma secreção eosinofílica, além de debris celulares (Roy-Burman *et al.*, 2004). A PL, em relação a PD, apresenta epitélio cilíndrico simples mais baixo com núcleo basal, basofilia citoplasmática, menos dobras epiteliais e o estroma muito delgado. Estes lóbulos são frequentemente agrupados e recebem a terminologia de próstata dorsolateral (PDL) (Fig. 5A).

A PA, também conhecida como glândula de coagulação, tem forma tubular e aparência gelatinosa. Seu produto de secreção é abundante e homogêneo. As células epiteliais são colunares simples, com núcleo central e podem apresentar padrão cribiforme devido grande quantidade de dobras do epitélio (Fig. 5A). Comparativamente, a PA tem estroma mais desenvolvido que a PV. Além disso, as células musculares lisas formam camadas concêntricas ao redor dos alvéolos (Roy-Burman *et al.*, 2004).

1.3 Características do desenvolvimento da próstata

O desenvolvimento da próstata é um processo complexo que envolve múltiplas vias de sinalização, incluindo sinalização endócrina, parácrina, autócrina e fatores de transcrição. Enquanto a maioria das glândulas acessórias desenvolvem-se a partir do ducto de *Wolffian* (mesodermal), a próstata origina-se do UGS, uma subdivisão da cloaca (Marker *et al.*, 2003). O UGS é constituído de uma camada epitelial derivada do endoderme e está envolvido por uma camada mesenquimal derivada do mesoderme (Prins e Putz, 2008). Este processo de desenvolvimento não é determinado pelo sexo genético, mas pela exposição aos andrógenos, pois tem sido demonstrado que o UGS de fêmea ou macho podem formar tecido prostático funcional, caso eles sejam estimulados por andrógenos no período adequado (Takeda *et al.*, 1986).

A formação da próstata inicia-se por volta do 17º dia de gestação em camundongos, 18º dia em ratos e entre a 9-10ª semana em humanos (Welsh *et al.*, 2008). Em todas as espécies, inclusive nos humanos, a glândula prostática se desenvolve através de um processo altamente conservado, denominado “morfogênese de ramificação”, onde pequenos brotos se projetam a partir do epitélio do UGS. Em humanos, o desenvolvimento da próstata está completo ao nascimento, enquanto nos roedores a próstata é rudimentar ao nascimento, sendo a maior parte do desenvolvimento, durante os primeiros 15 dias de vida pós-natal (DPN). Em ambos, esse processo se estende até que a maturidade sexual seja atingida (Marker *et al.*, 2003).

Os andrógenos circulantes, produzidos pelos testículos fetais (Fig. 6A), masculinizam o trato reprodutor e conduzem à formação glandular. Embora a T seja o primeiro andrógeno

produzido pelos testículos, é a diidrotestosterona (DHT, forma hidroxilada da T) a principal responsável pela morfogênese prostática. A DHT é produzida no UGS a partir da redução enzimática de T pela 5 α -redutase. Existem dois tipos de isoenzimas 5 α -redutase, sendo a do tipo 2 expressa na próstata, particularmente nas células musculares lisas do estroma e nas células epiteliais basais (Steers, 2001). Assim, sob a ação androgênica, células mesenquimais que expressam AR invaginam da uretra na base da bexiga para formar o mesênquima do UGS (Timms *et al.*, 1994). Posteriormente, as células epiteliais do UGS passam a expressar AR e em resposta aos andrógenos, observa-se a expressão do gene homeobox Nkx3.1 no DG15,5 e dois dias depois surgem os brotos prostáticos (Timms *et al.*, 1994) (Fig. 6B). Depois do nascimento, ocorre alongamento dos brotos e início da morfogênese com a formação dos ductos (Prins *et al.*, 1992). A diferenciação epitelial e mesenquimal está coordenada com o processo de ramificação morfogênica e ocorre no sentido proximal-distal (Prins e Birch, 1995).

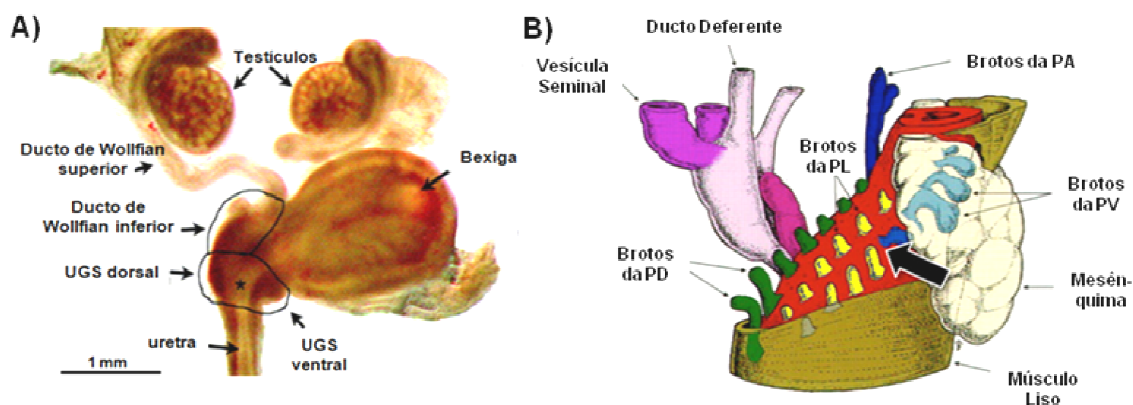


Figura 6. Desenvolvimento da próstata. **A)** Imagem do sistema urogenital de embrião de camundongo no dia gestacional 16,5. Note o seio urogenital (UGS) na base da bexiga embrionária. Nessa fase, o epitélio do UGS é visível como uma dilatação na uretra (*). Também é possível observar o mesênquima condensado nas áreas escuras ventral e dorsalmente ao epitélio (modificado de Marker *et al.*, 2003). **B)** Esquema da porção urogenital de embrião de camundongo mostrando o padrão de brotamento prostático. Observe os brotos epiteliais sólidos da próstata ventral (PV), dorsal (PD), lateral (PL) e anterior (PA). A seta aponta ramificação lateral a partir dos brotos iniciais. No estroma adjacente observa-se as células sofrendo citodiferenciação no sentido proximal-distal e o músculo liso envolvendo a porção proximal dos ductos prostáticos (Timms e Hofkamp, 2011).

O padrão de ramificação é complexo e lobo-específico, sendo que este processo inicia-se no DPN3-5 na próstata ventral (PV) e dois dias depois na próstata dorsolateral (PDL). Concomitantemente, as células mesenquimais prostáticas condensam-se ao redor dos brotos (Fig. 6B), forma-se uma camada periductal de células musculares lisas enquanto as células interductais diferenciam-se em fibroblastos (Hayward *et al.*, 1997). Em seguida, tem-se início o processo de formação do lúmen, atingindo as extremidades distais dos ductos no DPN12. Outro processo importante que ocorre entre os DPN10-15, é a

diferenciação funcional das células epiteliais luminais (Prins e Birch, 1995). Em roedores, as proteínas de secreção prostáticas são detectáveis a partir do DPN20 e tornam-se mais abundantes concomitantemente ao aumento dos níveis séricos de T (Marker *et al.*, 2003), sendo o processo de maturação completado com a puberdade (DPN25-40) (Hayashi *et al.*, 1991).

Os eventos de proliferação e diferenciação celular que levam a morfogênese prostática são regulados pela expressão de genes em uma sequência espacial e temporal precisamente coordenada. Destes processos participam várias famílias gênicas, sendo as principais: Sonic Hedgehog (Shh), Proteína Morfogenética Óssea (BMPs), Fator de Crescimento Derivado de Fibroblasto (FGF) e a família gênica Wingless-Related MMTV Integration site (Wnt). Sabe-se que o desequilíbrio na expressão destes genes está relacionado a vários desvios no desenvolvimento e à carcinogênese (Huang *et al.*, 2009). Além disso, também participam da morfogênese prostática diferentes polipeptídeos como os fatores de crescimento homólogos a insulina (IGFs), fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), fatores de crescimento e transformação (TGFs) e fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs) (Reynolds e Kyprianou, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a próstata apresenta receptores para hormônio do crescimento (GHR) e que distúrbios nessa via de sinalização estão relacionados tanto a problemas no desenvolvimento, quanto a alterações na susceptibilidade da próstata a desenvolver lesões na idade adulta (Wang *et al.*, 2008).

A glândula prostática adulta é composta por diferentes tipos celulares que constituem o parênquima secretor e o estroma fibromuscular (Berry *et al.*, 2008). O epitélio secretor é constituído por duas camadas morfológicamente definidas, as camadas luminal e basal (Fig. 5B), que podem ser distinguidas pela expressão diferencial de citoqueratinas (CK) e antígenos de superfície (CD) e/ou a expressão conjunta desses. Nestas camadas observam-se as células basais, luminais ou secretoras e neuroendócrinas (Miki, 2009). Há ainda a possibilidade de se distinguir as células prostáticas nos subtipos: células de amplificação transitória (*transit-amplifying cells*) e as células intermediárias. Estas últimas podem expressar, numa fase transitória, citoqueratinas comuns às células basais e luminais (Hudson *et al.*, 2001). Experimentos envolvendo ablação androgênica seguida de restauração hormonal em roedores também sugerem a existência de uma população celular de vida-longa e autorenovável que são responsáveis pela manutenção e homeostasia da glândula. Esta população denominada de *stem cells* está presentes tanto no epitélio prostático de roedores quanto na próstata humana (Lukacs *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011).

O compartimento estromal é formado por um arranjo complexo de células, incluindo as células musculares lisas, fibroblastos e miofibroblastos, mastócitos, macrófagos células endoteliais e pericitos, nervos e vasos sanguíneos. Os fibroblastos e as células musculares

lisas sintetizam os componentes teciduais e regulatórios da MEC. A MEC é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos, sendo também um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (Tuxhorn *et al.*, 2001). A MEC provém sinais biológicos gerais e exercem influências sobre as células epiteliais (Marker *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de órgãos como a próstata, útero e glândulas mamárias, que são formados por um epitélio parenquimal, depende de uma interação epitélio-mesenquimal (Cunha *et al.*, 2004). Essas interações são importantes em diversos estágios da morfogênese, na diferenciação celular, na manutenção da diferenciação do epitélio e na função geral dos epitélios glandulares (Hall, 1978; Hay, 1981; Vilamaior *et al.*, 2000; Taboga *et al.*, 2009) (Fig. 7).

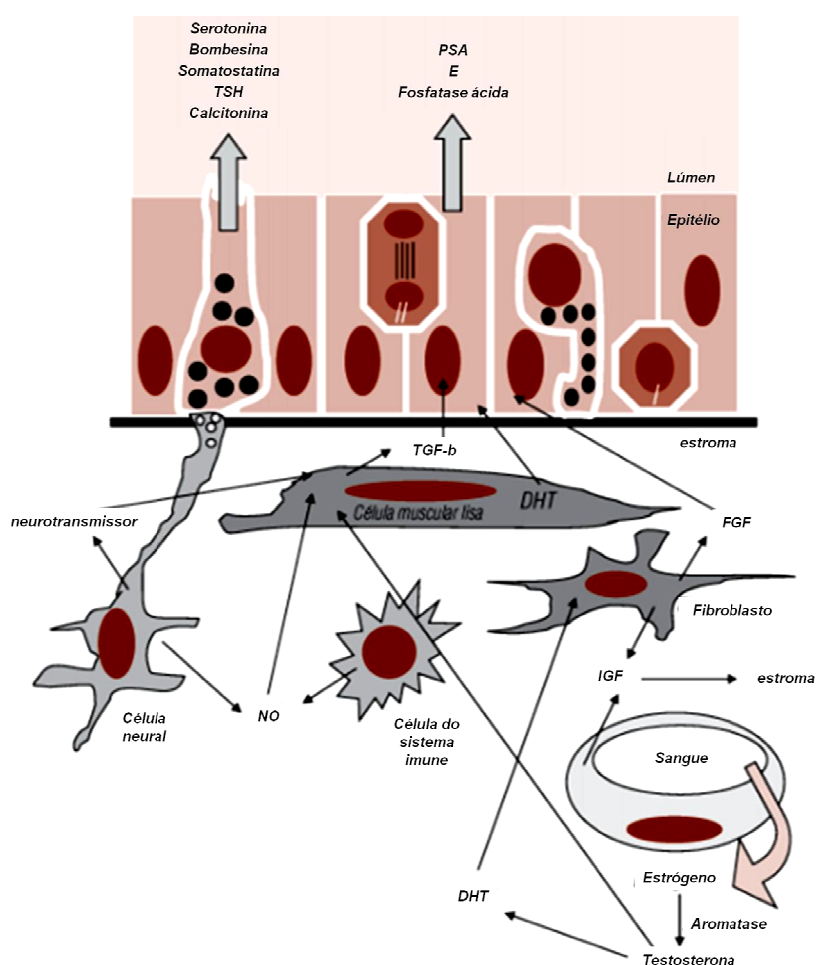


Figura 7. Interação entre o epitélio e o estroma na próstata (Taboga *et al.*, 2009). FGF-b, fator de crescimento beta; DHT, diidrotestosterona; NO, óxido nítrico; FGF, fator de crescimento fibroblástico; PSA, antígeno prostático específico; I célula basal; II célula em divisão.

Os fatores de crescimento produzidos no estroma exercem influência parácrina sobre as células epiteliais adjacentes, através da ligação com seus receptores específicos. O epitélio, por sua vez, é estimulado a secretar polipeptídeos que irão promover o crescimento estromal (Reynolds e Kyprianou, 2006). Assim, os fatores de crescimento e seus receptores

atuam como mediadores da interação bidirecional entre o epitélio e o estroma, a qual também envolve sinais providos por proteínas da MEC e pelos receptores intracelulares de hormônios esteróides (Chung *et al.*, 2005).

1.4 Regulação hormonal da próstata

O controle neuroendócrino do metabolismo, crescimento e de certos aspectos da reprodução é mediado por uma combinação de sistemas neurais e endócrinos localizados no hipotálamo e na hipófise (Sharifi e Auchus, 2012). Esses mecanismos de retroalimentação negativa (*feedback*) tem início com a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. O GnRH por sua vez, estimula a hipófise a secretar hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). O LH estimula as células de Leydig testiculares a produzirem T bem como uma pequena quantidade de estradiol e o FSH estimula as células de Sertoli a regularem a espermatogênese. Ambos, T e estradiol podem efetuar *feedback* negativo e suprimir a liberação de LH. De modo similar, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) do hipotálamo estimula a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH estimula as células da zona fasciculada da adrenal a produzir cortisol. Também promove a síntese e a liberação de hormônio deidroepiandrosterona (DHEA) pelas células da zona reticulada que posteriormente é convertido em T nos órgãos alvos (Sharifi e Auchus, 2012).

No homem, a T é o principal andrógeno circulante, sendo produzida principalmente pelas células de Leydig no testículo (95%). A zona reticular da glândula adrenal produz os andrógenos androstenediona e DHEA, contribuindo com 5% dos andrógenos circulantes (Aumüller e Seitz, 1990). Estima-se que somente 2-3% da T encontra-se disponível em sua forma livre, estando o restante ligado a proteínas séricas como SHBG (do inglês: *Sex hormone-binding globulin*), albumina e globulina (Vermeulen, 1973). No testículo e na próstata, a T pode ainda, ser convertida em um andrógeno intracelular mais potente, a DHT (Steers, 2001).

As funções da DHT e da T na próstata são mediadas por receptores de andrógenos (AR). Embora tanto a T quanto a DHT sejam capazes de manter a atividade prostática, a DHT apresenta afinidade pelo AR 50 vezes maior e ela é 10 vezes mais potente do que a T (Deslypere *et al.*, 1992; Harper *et al.*, 2009). O AR está localizado no citoplasma e uma vez associado a T ou DHT, o AR dimeriza-se, e é translocado para o núcleo, onde, em conjunto com uma série de co-ativadores, ativa ou inativa diferentes conjuntos de genes (Li e Al-Azzawi, 2009). Apesar desses andrógenos se ligarem ao mesmo receptor, cada um exerce efeitos biológicos distintos. No desenvolvimento prostático, por exemplo, quando a conversão da T em DHT é bloqueada, a T é capaz de induzir a diferenciação do UGS em

próstata, mas o desenvolvimento e crescimento glandular são reduzidos (Marker *et al.*, 2003).

Experimentos com castração química e/ou cirúrgica em indivíduos adultos também comprovam que os andrógenos são essenciais para a manutenção e homeostasia glandular, pois na sua ausência, ocorre a atrofia da próstata. Esse processo de redução em tamanho e/ou perda de função denomina-se involução (Lee *et al.*, 1981). A notável redução do volume e peso do órgão é decorrente de uma série de eventos, inicialmente marcada por uma diminuição do fluxo sanguíneo prostático, uma interrupção na síntese e uma elevada liberação da secreção luminal, seguida pela diminuição na altura e no número das células epiteliais por processos de morte celular programada, resultando em lobos reduzidos com células epiteliais baixas e um aumento relativo do estroma glandular (Brandes, 1966).

Embora a próstata seja dependente de andrógenos, a sua fisiologia também é influenciada por outros moduladores hormonais, como os estrógenos (E), retinóides, vitamina D, prolactina, insulina e hormônio do crescimento (Hsing *et al.*, 2002). Particularmente os E representam papel crítico na manutenção da homeostasia prostática, pois alterações na razão andrógeno:estrógeno (T:E) estão relacionadas ao desenvolvimento de lesões na próstata. Isto é observado, por exemplo, na senescência, quando as taxas de andrógenos reduzem e a razão T:E torna-se alterada (Ellem e Risbridger, 2010). A razão T:E alterada, por sua vez, acarreta no aumento da susceptibilidade ao aparecimento de afecções prostáticas, como a HPB e o CaP.

A biossíntese de E a partir de andrógenos é catalisada por um membro da superfamília P450 chamado aromatase (gene CYP19). Os E atuam sobre seus tecidos alvos através de seus receptores específicos, os quais são membros de uma vasta família de fatores de transcrição nuclear. Os receptores de estrógeno alfa (ER α) e beta (ER β) são codificados por dois genes diferentes, o ESR1 e o ESR2 respectivamente. Estes receptores encontram-se no núcleo celular e podem ser ativados de forma direta pela ligação com o E ou de forma indireta através de fatores de crescimento, como ocorre no útero (Prins e Korach, 2008). Na glândula prostática, o ER α pode ser expresso pelas células epiteliais, mas é expresso predominantemente no estroma e o ER β no epitélio (Weihua *et al.*, 2002; Rochel-Maia *et al.*, 2013) (Fig. 8). A ação dos E sobre a próstata apresenta resposta diferenciada se o estímulo for através do ER α ou do ER β . De modo geral, estudos indicam que estímulo via ER α desencadeia proliferação aberrante e inflamação ao passo que via ER β é associado com regulação da taxa proliferação/apoptose e tem atividade anti-inflamatória (Ellem e Risbridger, 2010).

Além da ação direta dos E via ERs, estes hormônios também apresentam ação indireta por influenciar o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Isto é possível porque ocorre

a presença de receptores de E no hipotálamo e na hipófise de roedores e a expressão de aromatase no cérebro (Carretero *et al.*, 1999), indicando que os E podem alterar a secreção de gonadotrofinas. Assim, indiretamente, os E suprimem a liberação de LH pela hipófise e leva a redução da quantidade de T produzida pelos testículos, inibindo a diferenciação e proliferação celular (Gill-Sharma *et al.*, 2001; Atanassova *et al.*, 2000).

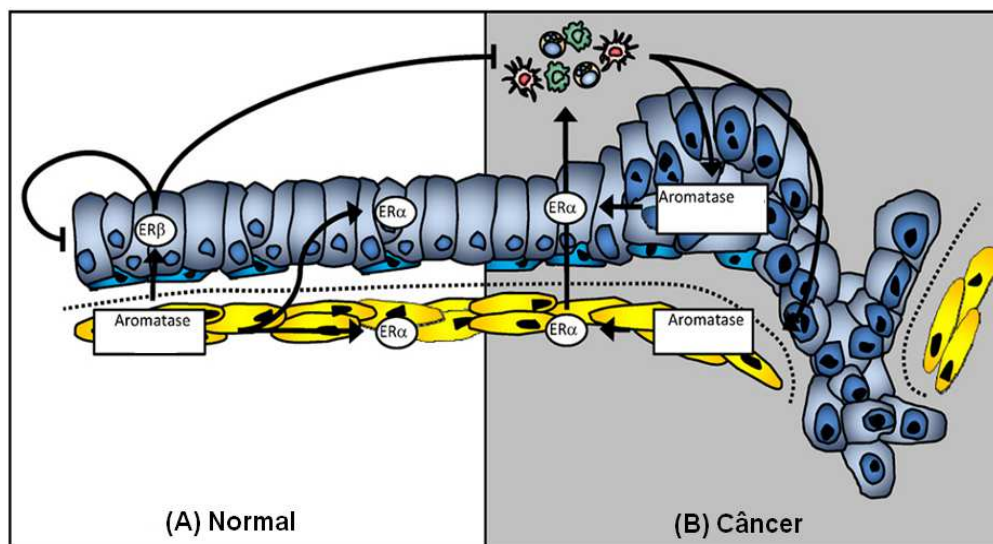


Figura 8. Imagem ilustrativa da localização dos receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) e os efeitos da aromatase e do E na próstata. **(A)** No tecido normal a aromatase é expressa exclusivamente no estroma, assim os E exercem seus efeitos de modo autócrino via $ER\alpha$ estromal e de modo parácrino via $ER\alpha$ e $ER\beta$ epitelial. Nessa situação a atividade proliferativa e pró-inflamatória desencadeada via $ER\alpha$ é controlada pela atividade anti-proliferativa e anti-inflamatória desencadeada via $ER\beta$. **(B)** No câncer de próstata, a aromatase é expressa também nas células epiteliais transformadas, consequentemente o E pode exercer seus efeitos de modo autócrino via $ER\alpha$ e $ER\beta$ estromal e epitelial. Como resultado dos níveis elevados de E no tecido e da expressão aberrante de $ER\alpha$, observa-se o desenvolvimento de inflamação que também contribui para aumento da expressão de aromatase (modificado de Ellem e Risbridger, 2010).

Durante o desenvolvimento, seja no período pré-natal ou neonatal, se por alguma razão, a prole for exposta a hormônios esteróides, esta exposição pode ser “memorizada” e desencadear alterações permanentes na morfologia e função da próstata através do mecanismo de *imprinting*. O *imprinting* torna as células ou o tecido sensibilizados e caso ocorra uma re-exposição ao hormônio desencadeador do *imprinting*, as células ou o tecido afetado apresentam padrão de resposta alterado (Santos *et al.*, 2004). Os hormônios esteróides são componentes importantes para a próstata e a sensibilidade alterada a estes hormônios na vida pós-natal é a base do desenvolvimento de várias doenças na idade adulta (Prins *et al.*, 2007).

Diversos estudos avaliando os efeitos da exposição ao E durante o desenvolvimento fetal e neonatal demonstraram que o E pode afetar tanto o crescimento quanto a

diferenciação celular (Jarred *et al.*, 2002; Prins *et al.*, 2007; Prins e Putz, 2008). Mas os efeitos do E na próstata são complexos, dependem da dose e da fase em que a exposição ocorre. Além disso, a re-exposição ao E na idade adulta é cada vez mais comum no estilo de vida ocidental, uma vez que contaminantes ambientais, detergentes, embalagens plásticas e alimentos apresentam substâncias com comprovados efeitos estrogênicos (Korach, 1993).

Já foi verificado, por exemplo, que o *imprinting* estrogênico ocorrido em roedores devido a alterações tanto nos níveis endógenos de E (materno ou produção local excessiva) quanto exógenos (exposição ambiental) no período neonatal promove distúrbios no crescimento da próstata (Timms *et al.*, 2005). Ho *et al.* (2006) e Prins *et al.* (2008) explicam que estes distúrbios são decorrentes de alterações no padrão de metilação do DNA de genes envolvidos na sinalização prostática. Prins *et al.* (2001) também demonstraram que a exposição ao E durante o desenvolvimento pode reprogramar a próstata, levando ao aumento do número de células basais e a defeitos de diferenciação do epitélio prostático de ratos adultos, predispondo este epitélio a alterações displásicas.

Nonneman *et al.* (1992) descreveram que a exposição a baixas doses de E durante o período gestacional provoca aumento dos níveis de receptor de andrógeno e aumento do peso da próstata no animal adulto. Por outro lado, também tem sido descrito que a exposição ao E durante a fase neonatal, pode levar a redução da expressão de AR, a prejuízos no desenvolvimento do trato reprodutor masculino (Rivas *et al.*, 2002), maior susceptibilidade a inflamações, além de favorecer o desenvolvimento de hiperplasia, displasia e metaplasia na idade adulta (Santti *et al.*, 1994; Stoker *et al.*, 1999). Já a exposição a altas doses de E exógenos compromete o crescimento prostático, a função secretora glandular e resulta no desenvolvimento de lesões proliferativas na idade adulta (Prins, 1997; Prins *et al.*, 1998; Un-no *et al.*, 2007). Acredita-se que o *imprinting* estrogênico decorra tanto de alterações nas concentrações de andrógeno via inativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal quanto de efeitos diretos (via receptor de estrógeno) sobre a próstata (Huang *et al.*, 2004).

Os mecanismos de como os E atuam no desequilíbrio da homeostasia glandular e de como estão envolvidos nas etapas de iniciação e progressão do processo de carcinogênese ainda não está claro, porém o desequilíbrio na sinalização via ER α , ER β e GPR30 perturba a homeostasia glandular e leva a um desequilíbrio entre as vias de proliferação e morte celular (Prins *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2010; Mak *et al.*, 2010). O que tem sido consenso é que, na idade adulta, a exposição a baixas doses de E promove ação proliferativa, enquanto a exposição a altas doses tem efeito inibitório a produção de andrógenos e desencadeia atrofia da próstata (Santti *et al.*, 1994; Putz *et al.*, 2001).

1.5 Afecções prostáticas

Além de sua importância para a fertilidade, a próstata tem despertado grande interesse médico-científico pela alta incidência de doenças, principalmente a HPB e o CaP, que no Brasil, é a segunda causa de óbitos por câncer entre homens (Dasgupta *et al.*, 2012). Estimativas do Instituto Nacional do Câncer apontam para mais de 60 mil novos casos diagnosticados em 2012, com número de mortes próximo de 13 mil indivíduos (INCA, 15/10/2012 em <http://www.inca.gov.br>).

Em modelos experimentais animais, particularmente roedores, ocorre uma baixa incidência de lesões espontâneas na próstata e isso é válido não só para lesões neoplásicas, mas também para lesões não-neoplásicas. Mas alterações morfológicas referentes à idade e o envolvimento hormonal na patogenia das lesões são cada vez mais estudadas nesses animais. Deste modo, roedores representam uma ponte entre os estudos *in vitro* e os clínicos (Cunha *et al.*, 2004; Roy-Burman *et al.*, 2004) (Fig. 8).

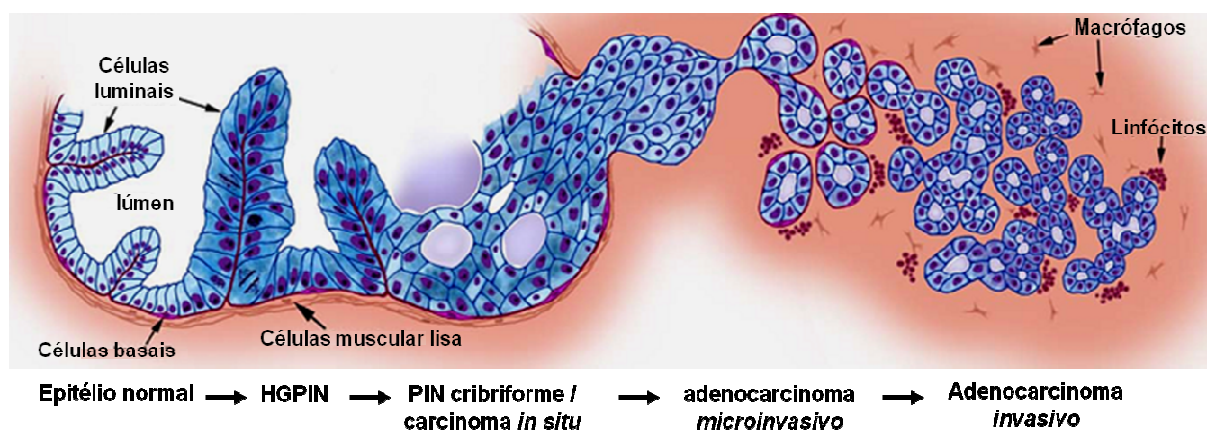


Figura 8. Modelo de progressão tumoral: alteração do tecido normal para neoplasia intraepitelial de alto grau (HGPIN), seguindo para padrão cribriforme ou carcinoma *in situ*, ruptura da membrana basal com o adenocarcinoma microinvasivo e rearranjo glandular com o adenocarcinoma invasivo (modificado de Iwata *et al.*, 2010).

1.5.1 Prostatite e Atrofia Inflamatória Proliferativa

A próstata, assim como o intestino e o pulmão, são considerados órgãos imuno-competentes e por isso, apresentam um pequeno número de células inflamatórias que aumentam com a idade. Essas células são principalmente linfócitos, macrófagos e mastócitos. Na próstata adulta saudável, pode-se observar pequenos infiltrados inflamatórios periglandulares e no estroma fibromuscular (De Nunzio *et al.*, 2011).

A prostatite é um processo caracterizado pelo aumento de células inflamatórias no estroma prostático e no interior dos ácinos (Shappell *et al.*, 2004). Ela pode ser dividida em aguda ou crônica, de acordo com o tipo de infiltrado encontrado. Na prostatite aguda, ocorre predominância de neutrófilos e/ou células inflamatórias dentro do epitélio glandular ou no

lúmen. Já a prostatite crônica refere-se a inflamações decorrentes de prostatites agudas não tratadas que evoluem (Shapell *et al.*, 2004).

A inflamação em conjunto com a dieta e outros fatores ambientais atingem as células epiteliais prostáticas e resultam em injúria e destruição celular. Ocorre aumento da proliferação como uma resposta regenerativa e uma diminuição de apoptose. No entanto, as lesões não crescem em volume, porque há uma perda celular por mecanismos não apoptóticos no qual as células lesadas migram para o lumen glandular e são expulsa no ejaculado ou capturadas por macrófagos (De Marzo *et al.*, 2003). A inflamação é sugerida como um fator etiológico capaz de incitar a carcinogênese por causar dano celular e no genoma, promover a substituição celular e criar um microambiente no tecido rico em citocinas e fatores de crescimento que podem elevar a replicação celular, angiogênese e reparo tecidual (Palapattu *et al.*, 2004).

A atrofia inflamatória proliferativa (PIA) pode ocorrer associada à inflamações crônicas. O termo PIA designa focos discretos de epitélio glandular proliferativo com aparência morfológica de atrofia simples ou hiperplasia pós-atrótica. Suas características peculiares são a presença de duas camadas celulares distintas no epitélio, células inflamatórias mono e/ou polimorfonucleares nos compartimentos estromal e epitelial, e atrofia estromal com quantidade variável de fibrose (De Nunzio *et al.*, 2011).

A PIA é considerada precursora do adenocarcinoma prostático, pois a inflamação pode atuar como um agente iniciador da carcinogênese (via efeitos genotóxicos) ou um agente promotor (via efeitos citotóxicos). A associação com a inflamação sugere que a PIA é resultado de uma proliferação regenerativa das células epiteliais em resposta à injúria causada pelos oxidantes inflamatórios. Muitas células em proliferação nos focos de PIA apresentam um fenótipo de célula secretora imatura e estas células podem ser o principal alvo para a transformação neoplásica (De Marzo *et al.*, 2003).

1.5.2 Hiperplasia Prostática Benigna

A HPB é definida como um crescimento tumoral não neoplásico. Ela é a causa mais comum de aumento de volume prostático em indivíduos adultos ou idosos (Carson e Rittmaster, 2003). Isto ocorre devido ao crescimento hiperplásico do epitélio glandular e dos componentes estromais da próstata (De Nunzio *et al.*, 2011). Também são observadas alterações como hiperplasia de células basais, aumento da massa estromal (particularmente das células musculares lisas), aumento da deposição de elementos da MEC, redução do tecido elástico, aumento na infiltração de linfócitos ao redor dos ductos e maior quantidade de corpos amiláceos no lúmen (Bostwick *et al.*, 1992).

Os mecanismos da HPB são multifatoriais e ainda não estão definitivamente estabelecidos. Porém, estudos em homens e animais sugerem que o desenvolvimento da HPB vincula-se a um desequilíbrio entre os níveis hormonais e/ou entre os processos de proliferação e morte celular (sendo os processos proliferativos predominantes em relação aos apoptóticos) além de processos inflamatórios (Griffiths *et al.*, 1997; Carson e Rittmaster, 2003).

1.5.3 Neoplasia Intraepitelial Prostática

A neoplasia intraepitelial prostática (PIN) é considerada uma lesão pré-neoplásica não-invasiva precursora do câncer prostático e cuja descrição foi realizada por McNeal e Bostwick em 1986. Ela é principalmente caracterizada por ácinos contendo epitélio hipercelular, irregular e células com variação do tamanho nuclear. Os núcleos celulares podem se apresentar alongados, hipercromáticos e contendo pequenos nucléolos. Apesar de apresentar atipias celulares, as glândulas continuam com arquitetura benigna, ausência de padrão infiltrativo e presença de células basais (Weinstein e Epstein, 1993). A PIN pode originar-se da diferenciação celular alterada, expressão aberrante de receptores de fatores de crescimento e genes de controle de crescimento e diferenciação celular alterada (Bostwick, 1996).

A PIN pode ser dividida em dois grupos: de baixo grau (LGPIN, do inglês *low grade prostatic intraepithelial neoplasia*) e alto grau (HGPIN, do inglês: *high grade prostatic intraepithelial neoplasia*). A LGPIN diferencia-se da HGPIN pela alta celularidade e a estratificação celular mais evidente, além da menor variação do volume nuclear entre as células, pois a maioria possui núcleo aumentado. A presença de nucléolo proeminente, frequentemente múltiplo, também é típica (Bostwick, 1996; Shappell *et al.*, 2004). Klink *et al.* (2012) descrevem que HGPIN compartilha aspectos clínicos, morfológicos e genéticos com o câncer de próstata e localiza-se preferencialmente na zona periférica da próstata humana.

Na HGPIN os processos de proliferação e diferenciação celular estão alterados, pois as células basais apresentam-se de forma atípica e migrando para o compartimento secretor. Associada a esta progressiva indiferenciação celular, tende a ocorrer a perda gradativa das próprias células basais, facilitando a extensão da lesão para o estroma e a sua transformação em carcinoma invasivo. Por isso, a continuidade no desenvolvimento de HGPIN para o câncer é caracterizada pela interrupção da camada de células basais, perda progressiva de marcadores de diferenciação secretora, aumento de anormalidades nucleares e nucleolares, aumento da atividade proliferativa, neovascularização, instabilidade genética e variações na quantidade de DNA (Bostwick e Brawer, 1987).

Shappell *et al.* (2004) recomendam que para o diagnóstico de PIN em modelos experimentais como roedores, deve-se reconhecer a combinação de pelo menos três das características listadas a seguir: células epiteliais estratificadas, atipias nucleares (aumento do tamanho nuclear, irregularidade da membrana, hipercromasia, acúmulo de cromatina, nucléolo evidente ou de tamanho aumentado), focos epiteliais em forma de tufos, formação de micropapilas e crescimento com um padrão cribriforme (formação de arcos e pontes epiteliais).

1.5.4 Câncer de Próstata

O CaP é uma proliferação neoplásica de células epiteliais oriundas dos ácinos e/ou ductos prostáticos, podendo apresentar arranjo, grau de diferenciação e comportamento biológico variáveis. O CaP é atualmente a neoplasia mais comum entre homens, representando 29 e 30% de todos os novos casos de câncer nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente (Siegel *et al.*, 2012; INCA, 2012). O maior número de casos diagnosticados nos últimos anos deve-se, em parte, ao aumento da expectativa de vida, conscientização da importância desta neoplasia e detecção por rastreamento através da dosagem do PSA com diagnóstico de câncer histológico em pacientes assintomáticos.

Alguns fatores predis põem ao desenvolvimento do CaP, tais como: a idade (homens mais velhos, com mais de 50 anos de idade, têm maiores chances de desenvolverem a doença); a raça (os descendentes africanos desenvolvem mais o CaP); histórico familiar (homens com casos de CaP na família têm o risco de desenvolver a doença aumentado em 2 a 3 vezes); dieta (homens obesos, com dieta rica em gordura animal apresentam maior pré disposição); além da influência dos componentes genéticos (Rittmaster *et al.*, 2009).

Histologicamente, o CaP envolve transformações fenotípicas e genotípicas das células epiteliais de ácinos ou ductos, resultando em alterações nos processos de diferenciação e proliferação celular e resistência à morte celular dependente de andrógeno. Assim como na PIN, a zona glandular periférica da próstata humana é a mais afetada; principalmente na região posterior atingindo percentual de 70 a 75% dos casos; em seguida é a zona central com 15% e a menos afetada é a zona de transição com 10 a 15% (Qian *et al.*, 1997).

A aquisição do comportamento invasivo e metastático dos tumores de próstata é um evento complexo e multifatorial, que envolve a transformação das células tumorais inicialmente dependentes de andrógenos a independentes de andrógenos. Neste sentido, tem sido demonstrado que fatores de crescimento podem fosforilar o AR por mecanismo independente de andrógenos. Desta forma, o AR fosforilado pode migrar para o núcleo e ativar genes regulados por andrógenos, mesmo na ausência destes, o que poderia, em

parte, explicar a progressão de tumores de próstata dependentes de andrógenos para independentes de andrógenos (Wu *et al.*, 2006).

Ao contrário da PIN, o CaP é incompatível com a arquitetura normal das glândulas. Além disso, ele pode exibir características citológicas de outros tipos de carcinoma como os carcinomas das células escamosas, das células neuroendócrinas ou ainda exibir nenhuma característica morfológica específica e ser conhecido por carcinoma indiferenciado (Shappell *et al.*, 2004). A ruptura da camada contínua de células basais e a degradação proteolítica local da membrana basal e da MEC também são eventos críticos que levam à invasão tumoral e à metástase (Zeng e Kyprianou, 2005). Apesar da maioria das neoplasias prostáticas serem originadas no compartimento epitelial, tem-se demonstrado que o estroma também é alvo das alterações morfológicas e bioquímicas induzidas pelas neoplasias. Estas alterações, que coletivamente são denominadas de reação ou ativação estromal, incluem aumento da proliferação celular, significativa redução das células musculares lisas e simultâneo aumento na quantidade de fibroblastos e miofibroblastos, com aumento de síntese dos componentes da MEC e de enzimas que participam da remodelação estromal, além de citocinas que induzem migração celular e angiogênese (Tuxhorn *et al.*, 2002).

Os miofibroblastos são células estromais ativadas encontradas tipicamente em locais de remodelação tecidual patológica e que apresentam fenótipo intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas, podendo ser distinguidos pela co-expressão de vimentina e α -actina de músculo liso (Tuxhorn *et al.*, 2001; Tomas *et al.*, 2010). Os miofibroblastos no estroma tumoral teriam origem a partir de um anel periacinar de fibroblastos adjacente a um foco de PIN. Assim, a origem do estroma reativo ocorreria logo nos primeiros estágios da carcinogênese prostática, pela ativação de células estromais por células pré-malignas de uma PIN adjacente (Tuxhorn *et al.*, 2001). Tuxhorn *et al.* (2002) sugerem que células estromais ativadas pela transformação epitelial propiciam sinais angiogênicos durante os estágios iniciais da carcinogênese prostática, aumentando a incidência e a taxa de crescimento tumoral.

Assim, a reação estromal assemelha-se em muitos aspectos a uma resposta de reparo tecidual, caracterizada por proliferação celular, remodelação da MEC, aumento da atividade proteolítica e da biodisponibilidade de fatores de crescimento, influxo de células inflamatórias e indução de angiogênese. Estas alterações estromais criam um microambiente favorável à progressão dos carcinomas (Tuxhorn *et al.*, 2001). Além disso, Tomas *et al.* (2010) sugerem que a ocorrência e a intensidade das modificações estromais podem ser úteis como indicadores prognósticos da progressão e recorrência do carcinoma prostático, apontando o ambiente de estroma reativo como um importante componente biológico do câncer.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA PROPOSTO

O fato de a próstata apresentar importante papel no processo reprodutivo e ser o órgão mais frequentemente acometido por neoplasias no homem tem motivado estudos sobre a biologia celular, molecular e endocrinológica desse órgão.

Evidências laboratoriais demonstram o período de desenvolvimento intrauterino (inclusive pré-implantação) como uma janela de sensibilidade aumentada para condições ambientais tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Essa sensibilidade torna emergente o conceito de que o embrião, mesmo antes da fase de implantação, responde a alterações maternas importantes na manutenção da regulação homeostática e fisiológica do metabolismo e a critérios de crescimento para a gestação.

Assim, considerando que a PFG provoca alterações hormonais tanto maternas (níveis de corticosteróide, estrógeno e andrógeno elevados) quanto na prole e que estes fatores tem ação direta sobre a próstata, nos parece de fundamental importância avaliar os impactos deste tipo de programação fetal sobre os lobos prostáticos ventral e dorsolateral do rato. Outro aspecto relevante é investigar se a taxa sérica elevada de E materno é capaz de promover o *imprinting* estrogênico por sensibilizar as células prostáticas a uma segunda exposição a este agente na idade adulta.

A próstata ventral não apresenta homologia com a próstata humana, entretanto, é o principal órgão alvo de investigação além de ser a mais responsiva a modulação androgênica e estrogênica (Prins *et al.*, 2001). Já os lobos dorsais e laterais são mais susceptíveis às alterações morfológicas e inflamatórias, além de serem semelhantes à zona periférica da próstata humana, local de maior incidência de adenocarcinomas (Roy-Burman *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo objetiva investigar se a dieta hipoproteica na fase gestacional interfere no desenvolvimento e maturação da próstata e se é capaz de sensibilizar e predispor a próstata ao desenvolvimento de afecções frente à exposição ao estrógeno na vida adulta.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da PFG sobre o consumo de ração e o ganho de peso tanto da ratas prenhe durante a gestação quanto da prole de machos durante o desenvolvimento e senescência;
- Avaliar se a PFG altera os níveis séricos de T, DHT e estradiol na prole de machos;
- Investigar se os ratos programados apresentam alteração de peso corpóreo e peso dos lobos prostáticos ventral e dorsolateral;
- Avaliar os efeitos da PFG sobre os parâmetros morfológicos em nível estrutural e ultra-estrutural do epitélio glandular;
- Analisar se os ratos submetidos à PFG apresentam alterações morfométricas como altura do epitélio secretor, área de colágeno, volumes relativos e absolutos do parênquima e estroma prostático;
- Investigar se a PFG interfere nos índices de proliferação e morte das células epiteliais da PV e PDL;
- Analisar se a PFG altera a localização, a expressão gênica e expressão proteica tecidual de receptor de andrógeno (AR);
- Avaliar se a PFG altera a expressão proteica tecidual de receptores de estrógeno alfa (ER α) e beta (ER β);
- Investigar se a PFG associada ou não a modulação hormonal interfere na incidência de lesões na PV e PDL de ratos adultos.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos desta tese estão divididos em 3 capítulos apresentados na forma de artigos científicos:

4.1 Capítulo I: Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging – Manuscrito aceito para publicação; *Life Sciences*, 2013, *In Press*.

4.2 Capítulo II: Intrauterine protein malnutrition increases susceptibility to prostate neoplasias in adult rat after steroid exposure – Manuscrito a ser submetido ao periódico *Prostate*.

4.3 Capítulo III: Restrição proteica gestacional altera o padrão de resposta da próstata de ratos adultos à manipulação hormonal – Manuscrito a ser submetido ao periódico *Cell and Tissue Research*.

4.1 Capítulo I:

Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging

Jaqueline C Rinaldi^a, Luis A Justulin Júnior^b, Livia M Lacorte^a, Carolina Sarobo^a,
Patrícia A Boer^a, Wellerson R Scarano^a, Sérgio L Felisbino^{a*}

^aDepartment of Morphology, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista (UNESP), Brazil.

^bDepartment of Morphology, School of Odontology, Univ Estadual Paulista (UNESP), Brazil.

This work was supported by FAPESP (grant 09/52747-7) and CAPES do Brazil is gratefully acknowledgement J.C.R. was recipient of a FAPESP fellowship (09/50204-6).

*Corresponding author at: Sao Paulo State University, Institute of Biosciences, Department of Morphology, Rubiao Jr, District of Botucatu, SP, Brazil. Zip Code: 18618-970, Brazil. Tel./fax: +55 (0xx) 14 38800474.

E-mail address: felisbin@ibb.unesp.br (S.L. Felisbino)

ABSTRACT

Aims: Maternal malnutrition by low protein diet is associated with an increased incidence of metabolic disorders and decreased male fertility in adult life. This study aimed to assess the impact of maternal protein malnutrition (MPM) on prostate growth, tissue organization and lesions incidence with aging.

Main methods: Wistar rat dams were distributed into two groups, which were control (NP; fed a normal diet containing 17% protein) or a restricted protein diet (RP, fed a diet containing 6% protein) during gestation. After delivery all mothers and offspring received a normal diet. Biometrical parameters, hormonal levels and prostates were harvested at post-natal days (PND) 30, 120 and 360.

Key findings: MPM promoted low birth weight, decreased ano-genital distance (AGD) and reduced androgen plasma levels of male pups. Prostatic lobes from RP groups presented reduced glandular weight, epithelial cell height and alveolar diameter. The epithelial cell proliferation and collagen deposition were increased in RP group. Incidences of epithelial dysplasia and prostatitis were higher in the RP offspring than in the NP offspring at PND360.

Significance: Our findings show that MPM delays prostate development, growth and maturation until adulthood, probably as a result of low testosterone stimuli. The higher incidence of cellular dysplasia and prostatitis suggest that MPM increases prostate susceptibility to diseases with aging.

Key words - Prostatitis; epithelial dysplasia; collagen; protein malnutrition; fetal programming; androgen receptor.

Introduction

Epidemiological studies have linked malnutrition in pregnancy with many chronic diseases (Langley-Evans et al. 2009). Malnutrition is a medical condition caused by an improper or insufficient diet. It is technically a category of diseases that includes: undernutrition, obesity and overweight, and micronutrient deficiency among others. However, it is frequently used to mean just undernutrition from either inadequate calories or inadequate specific dietary components, such as protein (Dimosthenopoulos 2010).

During gestation, the female rat needs at least 12% of the diet to be protein (Benevenga et al. 1995). Maternal protein malnutrition (MPM) during gestation impairs overall growth and development (Wu et al. 2012). The “Barker hypothesis” (Barker 1997) proposes that suboptimal intrauterine environment induces compensatory responses in the fetus that may permanently affect the adult phenotype and disease susceptibility (Bateson and Barker 2004; Nijland et al. 2008). Rodent models have shown that MPM by low protein diet during pregnancy or during early postnatal life can lead to metabolic and physiological changes in the offspring, even when the animals have free access to a normal diet after weaning (Zambrano et al. 2005, 2006).

MPM could promote structural change in different organs, such as an altered cell number, an imbalanced distribution of different cell types within an organ, and an altered blood supply and receptor numbers (Vicente et al. 2004; Lins et al. 2005). In addition, these changes can modify hormone production and the capacity of cells to respond to hormone signals (Bertram et al. 2001; Langley-Evans and McMullen 2010; Qasem et al. 2012).

A few reports in sheep and rats indicate that male sexual development and the normal ontogeny of gonadal development and function can be disrupted by maternal malnutrition (Rae et al. 2002; McMillen et al. 2008; Gardner et al. 2009). Zambrano et al. (2005) have shown that intrauterine maternal protein malnutrition alone was sufficient to reduce sperm count and influence their ability to impregnate female rats. MPM also reduces the serum concentrations of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone. In these studies, the weights of the testis, epididymis and prostate were reported to be decreased (Fernandez-Twinn et al. 2003; Santos et al. 2004; Zambrano et al. 2005; Guzman et al. 2006; Zambrano et al. 2006; Fernandez-Twinn et al. 2007; Ramos et al. 2010). However, no previous studies investigated the effects of MPM during pregnancy on the prostate development. The prostate gland plays a fundamental role in reproductive biology. The prostate gland secretes different nutrients that partly compose seminal fluid, which is essential for sperm motility and nutrition (Untergasser et al. 2005). Moreover, early changes in prostate development may permanently alter the prostate morphology and function and influence the onset of late-life diseases, such as prostatitis,

benign prostatic hyperplasia and prostate cancer (Risbridger et al. 2005; Prins et al. 2006; Cowin et al. 2008).

Therefore, the aim of the present study is to evaluate the effects of MPM on the prostate gland morphology of rats at three important phases: growth, maturation and aging.

Material and Methods

Animals

Adult female (90 days of age, $n = 24$) and male (90 days of age, $n = 10$) Wistar rats were obtained from the Central Stock breeder at the State University of Campinas – UNICAMP (Campinas, SP, Brazil). The animals were kept in a Central Biotherium of UNESP – Sao Paulo State University throughout the experimental period. The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research of the Brazil College of Animal Experimentation and was approved by the Bioscience Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Experimentation (protocol: 08/09). A normal protein diet and a low protein diet were prepared as recommended by the American Institute of Nutrition (AIN 93-G) (Reeves et al., 1993). The diets are isoenergetic and their detailed composition is presented in Table 1.

Virgin female Wistar rats were mated overnight with established male breeders, and the day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as gestational day 1 (GD1). Pregnant dams were then randomized into two dietary groups: the control group (NP, $n = 12$) received a normal protein diet (containing 17% of protein), and the restricted group (RP, $n = 12$) received a low protein diet (a low protein formulation containing 6% of protein), ad libitum. The birth weight and ano-genital distance (AGD) of male pups were measured on post-natal day one (PND1). At 72 h post-birth, the litter size was standardized to eight pups (the gender ratio was kept as close to 1:1 as possible) per dam for both the control and restricted protein diet groups. This procedure maximizes lactation performance (Fishbeck and Rasmussen 1987). After birth, all groups (mothers and offspring) had free access to normal protein diet for the remainder of the study. At PND 22 the littermates were weaned and housed in isosexual groups. Post-weaning, body weight and food intake of the pups were measured weekly throughout the duration of the study. Food consumption was determined by measuring the difference in amount of pellet food provided at the beginning of the interval from that remaining at the end of the interval.

On PND 30, 120 and 360, male rats ($n = 12$ /group) were weighed and euthanized by decapitation. Blood samples were collected from ruptured cervical vessels. The urogenital complex (UGC - bladder, urethra, seminal vesicles and prostatic lobes) were dissected out and weighted. The ventral (VP) and dorsolateral (DLP) prostatic lobes were removed, weighted, and processed for histology. Those which were not easily dissected out of

adherent tissue were not weighed. Visceral fat mass (VFM) – mesenteric, epididymal and retroperitoneal – was excised at PND 120 and 360 and weighed for the evaluation of central adiposity (data were expressed as g fat/100g body weight).

Hormone Assay

Blood samples from each animal were collected at the time of euthanasia. Serum was obtained after centrifugation (2400 rpm, 20 min) and stored at -20°C . The concentrations of the testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) levels were determined by chemiluminescence (VITROS ECi-Johnson and Johnson Ultra-Sensitive Chemiluminescence analysis) using specific reagents (Johnson and Johnson Orthoclinical). The sensitivities of this assay were 0.02 and 0.04 ng/mL for T and DHT, respectively.

Histological Procedures, Stereological and Morphometrical Analysis

The prostatic lobes were fixed by immersion in 4% buffered formalin for 24 h, dehydrated in a series of graded ethanol and embedded in glycol methacrylate resin (Leica Historesin embedding kit), or they were clarified in xylene and embedded in Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO). The resin sections of 3 μm were obtained and stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) for morphological and morphometric analysis. Paraplast sections of 5 μm were stained with Picrosirius for collagen fibers (type I and type III collagen fibers) and stereological analysis (Junqueira et al. 1979).

The sections were analyzed in a Leica DMLB 80 microscope connected to a Leica DC300FX camera. The digitalized images, obtained by using the image analyzer Leica Q-win software Version 3 for Windows, were used for stereological-morphometric analysis. The mean of epithelial heights of the prostatic lobes was determined from a total of 1,200 random measurements, at 10 different points, in 20 different fields (40X) and from six different animals (sections stained by H&E). The mean of the collagen fibers' volume fraction in the prostatic lobes was determined by a red color automatic detection, in 10 different microscopic fields (20X) and from 10 different individual prostatic lobe sections. The collagen volume fraction was determined as a percentage of red-stained areas per total prostatic area.

To determine the relative proportions of the prostate components (epithelium, stroma and lumen), stereological analysis were carried out using Weibel's (1966) multipurpose graticulate with 130 points and 60 test lines. Random measurements were performed in 10 different fields (20X) and from six different individual prostatic lobe sections. The relative values were determined by counting the coincident points of the test grid and dividing them by the total number of points. To avoid erroneous interpretations of the morphometric data, all measurements were made in the intermediate regions of the prostate lobes, which

represent the major portion of the prostatic ductal system in rats (Lee et al. 1990; Nemeth and Lee 1996). Image acquisition, all quantitative measurements, and the identification of animal and experimental groups were performed in a blind manner by two independent investigators.

The histopathological classification of prostate lesions presented in the experimental animals was accomplished according to the Bar Harbor Classification System for the mouse prostate, developed by National Cancer Institute's Mouse Models of the Human Cancers Consortium, Prostate Steering Committee (Shappell et al. 2004). Five histological sections of the prostatic distal-intermediate regions (eight animals each experimental group) were examined (n = 40 microscopic sections) to quantify the incidence of histopathological lesions including: inflammatory infiltrate (into stromal or luminal spaces), epithelial dysplasia, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and focal hyperplasia associated with inflammatory cells (inflammatory reactive atypia). Results were expressed in percentage of total animals.

In Situ Cell Apoptosis Detection by TUNEL Assay

Apoptosis detection was based in a reaction of in situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Biotinylated UTP Nick End-Labeling (TUNEL). Detection was performed using the FragEL™ DNA (Calbiochem, CA, USA) according to the manufacturer's directions. The specimens were counterstained with Hematoxylin and mounted with Permount. The epithelial cells were counted in 10 random microscopic fields (40X) from 6 different ventral, dorsal and lateral prostatic lobe sections from both control and restricted groups. Approximately 10,000 cells were counted per experimental group. TUNEL index was expressed as a percentage of total cells counted (number of TUNEL-positive cells X 100/total cell number).

Immunohistochemistry

Sections of Paraplast® embedded prostates of 4 µm were collected on silanized glass. Antigen retrieval was achieved using a decloaker for 20 min. After washing, the slides were blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min followed by 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature. Slides were then incubated with monoclonal anti-Rat-Ki-67 antibody (clone MIB-5, Dako, Carpinteria, CA) and polyclonal rabbit anti-androgen receptor antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) at a 1:100 dilution in 1% BSA in PBS and incubated overnight at 4°C. After washing with PBS, the slides were incubated for 1 h at room temperature with goat anti-mouse IgG-HRP or goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA) diluted 1:200 in 1% BSA in PBS. Chromogen color development was carried out with 3,3'-diaminobenzidine

tetrahydrochloride, slides were counterstained with Harris's hematoxylin. Negative control was performed by omitting the primary antibody incubation step.

Epithelial Cell Proliferation (Ki-67) Index

To quantitatively evaluate Ki-67-immunostained nuclei (proliferation index), the number of positive epithelial cells was counted in 10 microscopic fields (40X) of the ventral, dorsal and lateral prostatic lobe sections from 6 different animals from each experimental group. The results are expressed as a percentage of total cells counted (number of labeled nuclei x 100/total number cell). Approximately 10,000 cells were counted per experimental group.

Western Blotting Analysis

Frozen samples of urogenital complex (without bladder, seminal vesicles and coagulating gland) at PND30, ventral and dorsal rat prostatic lobes at PND120 and PND360 from NP and RP experimental groups were mechanically homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 plus 0.25% Triton-X 100 by Polytron for 30 sec at 4°C, centrifuged, and protein was extracted on supernatant and quantified as per Bradford methods (Bradford 1976). A protein sample (70 µg) was loaded into 10% SDS-PAGE under reducing conditions. After electrophoresis, the proteins were transblotted onto a nitrocellulose membrane (Sigma-CO™, Saint Louis, MO, USA). The blot was blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% Tween-20) for 1 h. The blot was then incubated overnight at 4°C with 3% BSA in TBST containing a 1:1000 dilution of monoclonal mouse anti-PCNA (Proliferating cell nuclear antigen, Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), or polyclonal goat anti-PAR-4 (Prostate apoptosis response 4, Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), or polyclonal rabbit anti-androgen receptor (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), or polyclonal goat anti-beta actin (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA) primary antibodies. The blot membranes were then washed five times for 20 min in TBST and incubated for 1 h at room temperature with respective secondary peroxidase-conjugated antibodies. After washing in TBS-T, antibody location was detected using chemiluminescence substrate kit (Pierce ECL Western Blotting Substrate - GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The substrates were removed from membranes and ECL signals were captured by CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®, GE Healthcare™). The integrated optical density (IOD) of the target proteins bands were measured using the Image J software downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) to compare the protein levels. The Androgen-receptor, PCNA and PAR-4 expression was normalized to the β-actin values and the results were expressed as mean ± SD.

Statistical Analysis

All statistical analysis were carried out using INSTAT software (version 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA). According to the type of the data, either a non-parametric Mann-Whitney test or a T Test (with Welch's correction factor) was used to examine the significance of any difference between groups. The results were presented as the mean $\pm$ SD. Differences were considered statistically significant when p-value was < 0.05 .

Results

Reproductive performance of the dams, birth weight and DAG of the male offspring

As shown in Table 2, the RP and NP rat dams had equivalent body weights at the beginning of pregnancy; however, dams fed a low protein diet gained significantly less weight during pregnancy, despite no change in food intake. The lower weight gain did not affect the litter size, male/female distribution and gestational length (data not shown). At birth, both absolute and relative distances of AGD in the RP rats were lower compared with those in the NP pups. At PND1 the RP male pups were significantly lighter (approximately 33% lower) than the NP pups (Table 2).

Neonatal and post-natal growth profile and food intake of the male offspring

Body weight and food intake of pups whose mothers were submitted to protein restriction during gestation are shown in Fig. 1. Despite of initiating maternal nutritional rehabilitation with normal protein diet afterbirth, intrauterine protein malnutrition produced long-term reductions in the body weight of male offspring, in which showed a slower growth rate (Fig. 1A). This difference between NP and RP offspring persisted until adulthood (Fig. 1A). A significant catch up growth in body weight was observed between PND100 and PND120, in which the RP animals gained approximately 90 g, while the NP animals gained approximately 30 g (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B there was no difference in food consumption between NP and RP male offspring. However, when food intake was normalized to body weight, the low protein offspring consumed significantly more food per gram body weight compared to the control offspring. This indicates that the low protein offspring are in a state of hyperphagia. The hyperphagia was evident until PND 150 (Fig. 1C). Instead of Fig. 1D presenting no statistically difference in content of visceral fat mass (VFM) between NP and RP groups, there was a trend for the RP group to have a lower VFM (-20%) at PND120 and 360.

Serum Hormone Levels

The serum levels of T were significantly reduced in the RP group at PND30, while the serum levels of DHT were decreased in all of the RP groups compared with that of the age-matched control group (Table 3).

Prostatic Lobe Weight

The absolute and relative weights of the UGC were significantly lower in the RP animals at PND30 and PND120 compared with those of the age-matched control group (Table 3). Similarly, a significant reduction in the absolute and relative weights of VP and DLP were observed in the RP group, at PND120. However, at PND360, there were no differences in these parameters between the experimental groups (Table 3).

Morphological and Morphometrical Analysis

The prostatic lobes from the RP group presented similar morphological aspects as those observed in the control group. However, all the prostatic lobes from the RP group offspring showed an apparent slight reduction in the luminal diameter of prostatic glands and an increase in the stromal compartment (Fig. 2). Morphometric analysis confirmed these data and showed a significant reduction in the epithelial cell height of VP, DP and LP in the RP group at PND30, whereas no differences were found in the other ages (Table 3). Similarly, at PND30 and PND360, there was a reduction in the luminal diameter and an increase in the stromal compartment in VP and LP in the RP group compared with those in the NP group (Table 4).

Picrosirius staining showed collagen fibers adjacent to the epithelium, in the interacinar stroma, and around smooth muscle cells in VP, DP and LP in all of the groups (Fig. 3). In VP and LP from the RP group, an increase in the distribution of collagen fibers was observed (Fig. 3). At PND30 and PND360, morphometric analysis confirmed an increase in collagen volume in VP and LP from the RP group compared with that of the age-matched group (Table 3).

Histopathological examination showed that prostatic lesions were more frequent in the RP group. Dysplastic epithelium (clear epithelial cells with vacuolated cytoplasm and atypical basal nuclei) in VP and LP were observed. Inflammatory infiltrates were observed into three different areas: perivascular (inflammatory cells tightly around the blood capillaries), stromal (inflammatory cells in the stroma between and around the gland or periglandular) and glandular (inside the lumen of the gland). The incidence of prostatitis in LP was more frequent and severe in the RP group at PND360. Such incidence was associated with epithelial alterations, reactive stromal hypertrophy with collagen fibers deposition and

changes of glandular architecture (Fig. 4; Table 5). No histopathological alterations were found in the prostatic lobes at PND30 from both experimental groups (data not shown).

Epithelial Cell Proliferation and Apoptosis

Figure 5 shows the results of immunostaining for Ki-67 in rat prostates. The number of positive nuclei in the VP, DP and LP epithelium from the RP group was evidently increased at PND30 compared with that of the age-matched control group. No positive staining was observed in the negative control (data not shown). The quantitative analysis confirmed a higher Ki-67 index at PND30 in the VP, DP and LP epithelium from the RP group compared with age-matched control group (Table 3).

Figure 6 shows the typical morphology of apoptotic cells stained for TUNEL found in the prostatic lobes epithelium from both experimental groups at PND120. Quantitative analysis showed that the apoptotic index (TUNEL index) of epithelial cells was about 0.4 % and without statistically significant differences between the groups in all ages studied (data not shown).

Androgen Receptor

Androgen receptor immunostaining was detected in the nuclei of columnar and basal epithelial cells of the three prostatic lobes from the NP and RP groups (Fig. 7). AR immunostaining was apparently less intense in the nuclei of prostatic epithelial cells from LP in the RP group at PND30 (Fig. 7).

Western Blotting

The expression of AR, PCNA and PAR-4 in the VP and DP tissue from the different experimental groups was evaluated by western blot (Fig. 8). There was no difference in the expression of AR in the urogenital complex and prostatic lobes between groups (Fig. 8B). The analysis of PAR-4 also showed no differences in the expression of this protein related to apoptosis in the prostatic lobes between the groups (Fig. 8C). On the other hand, the analysis of PCNA expression also confirmed the increased index of cellular proliferation in the UGC from RP offspring at PND30 (Fig. 8D).

Discussion

Nutrient requirement for the organism depends on developmental state, reproductive activity, and age. Protein requirement for gestation and lactation as a percentage of the diet is similar for growth of weanling rats - about 12 percent - when highly digestible protein of balanced amino acid pattern is used (Benevenga et al. 1995). In this sense, fetal programming caused by a maternal low-protein diet affects the development of several

organs, including the reproductive system (Leonhardt et al. 2003; Zambrano et al. 2005; Guzman et al. 2006; Faria et al. 2008; Ramos et al. 2010; Qasem et al. 2012). However, the effect of this programming in adulthood and during aging is unclear, in part because of the possibility of reversion or the compensation of these adverse effects observed earlier in life (Langley-Evans and McMullen 2010). Therefore, to our knowledge, this is the first study addressing the effect of fetal programming on rat ventral, dorsal and lateral prostatic lobes throughout lifespan.

In our experiment, which only half of the needed protein was provided (6%), MPM did not affect gestation length or litter size. These observations are similar to other reports in the literature evaluating reproductive performance of the pregnant rats fed an 8% protein diet (Langley and Jackson 1994; Langley-Evans 2000). Despite similar litter sizes in both experimental groups, evidence of fetal programming was observed in the RP group by the decreased body weight at birth and reduced AGD in male offspring. These results are consistent with previous reports (Fagundes et al. 2007; Gosby et al. 2009).

MPM was associated with a prolonged reduction in body weight, which in this study, reached the age-matched control group values by the age of 4 months. Other investigators have also demonstrated that the long-term decrease in this parameter represents the imprinting effect of MPM (Desai et al. 2005; Zambrano et al. 2005; Cherala et al. 2006; Fagundes et al. 2007; Qasem et al. 2012). However, the mechanism(s) underlying this imprinting effect is not clearly understood. Furthermore, post-weaning male low protein offspring demonstrated hyperphagia as evidenced by higher food consumption per gram of body weight and this hyperphagia persisted into adulthood. Other investigators have also reported hyperphagia in offspring after maternal exposure to low protein diet during pregnancy and lactation (Fagundes et al. 2007; Coupe et al. 2009; Qasem et al. 2012). Instead of no statistical difference in visceral fat mass between groups, the present study showed there was a trend for this parameter to be lower in RP male offspring. Previous studies have shown that protein restriction during lactation programmed lower visceral fat mass and total body fat, which are responsible for the lower body weight in the adult offspring (Fagundes et al. 2007; Qasem et al. 2012).

AGD has been used as a good external biomarker for correct prenatal androgen exposure because it is regulated by testosterone from fetal testes (Graham and Gandelman 1986; Swan et al. 2005). Thus, the decreased AGD in male RP offspring observed in our study suggests an impaired intrauterine androgenic signaling, as proposed by Page et al. (2001). This deficiency in the androgen stimuli persisted in the RP offspring at PND30, which presented a reduction in the serum levels of T and DHT. These results are also in agreement with other studies (Zambrano et al. 2005; Guzmán et al. 2006), in which offspring from malnourished mothers presented reduced levels of LH and T, even after being fed a normal protein diet. However, epithelial cell proliferation in the prostatic

lobes from the RP group was increased at PND30, suggesting that other factors or hormones in addition to androgens may be acting on cell proliferation in the prostate. Certain growth factors, such as insulin-like growth-factor-1 (IGF-1), keratinocyte growth factor (KGF) and epidermal growth factor (EGF), can stimulate AR and activate AR target genes in the absence of androgen (Culig et al. 1994). These growth factors are ligands for receptor tyrosine kinases, and they initiate complex intracellular signaling cascades (Feldman and Feldman 2001). This is one of the mechanisms that contribute to prostatic carcinoma progression in an androgen-independent manner (Culig et al. 1994). A similar mechanism has been observed in breast and ovarian cancer, in which estrogen receptor (ER) activation by growth factors in the absence of estrogen can occur (Pietras et al. 1995). During prostatic development, similar pathways could be activated when androgens/estrogens are low and could stimulate the growth and differentiation of the gland. In addition, some authors have shown that somatotrophic factors, such as prolactin, retinoic acid, estrogen and growth hormones, as well as the interaction between stroma and epithelium may be involved in prostatic development (Webber 1981; Prins 2001). These possible androgen-independent mechanisms of prostate growth will be issue of future studies of our group.

The ventral and dorsolateral prostatic weights from the RP group offspring were significantly lower until PND120, suggesting a prolonged delay in the maturation of the prostatic lobes. The prostate weight reduction observed in our study is probably related to a decrease in serum androgen levels and reduced epithelial height and epithelial cell secretory activity. This observation is in agreement with Zambrano et al. (2005) study. Previous study on maternal low protein diet during lactation also observed reduction in the dorsal prostate weight at PND21 (Ramos et al. 2010).

Notably, apart from the similarity between the groups in prostate weight and plasma androgen levels at PND360, the prostate gland from RP animals exhibited important differences in epithelial dysplasia, collagen fibers density, prostatitis incidence and severity compared to NP group. These differences reveal that this type of maternal malnutrition promotes other effects on prostate gland physiology beyond just prostatic tissue growth delay. Several studies have demonstrated that alterations in androgens signaling during fetal/neonatal period may be involved in an increased susceptibility to prostate diseases with aging (Risbridger et al. 2005; Prins et al. 2006; Un-no et al. 2007). The increased incidence of epithelial dysplasia suggests impaired control of epithelial cell differentiated status. Androgens play a crucial role in the maintenance of the differentiated state of prostate epithelial cells and low androgen levels observed in the RP animals may lead to phenotypic instability of prostatic epithelial cells (Marker et al. 2003; Shidaifat et al. 2004, Justulin et al. 2010). However, if the dysplastic epithelium will evolve into neoplastic lesions remains to be determined. On the one hand, increased incidence of prostatitis also suggests unbalanced

regulation of inflammatory processes in these glands. Sustained inflammatory microenvironment has been associated with initiation and progression of epithelial dysplasia (Elkahlwaji et al. 2009). In this scenario, besides epithelial dysplasia, repeated tissue damage and repair due inflammation can result in increased collagen deposition in the stroma, as observed in LP from RP animals (Sivakumar and Das 2008).

Conclusion

In conclusion, our results suggest that adequate nutritional status during embryonic/fetal development is important for both prostate morphogenesis during early life as well as homeostasis of the gland throughout the lifespan. In addition, MPM can increase prostate susceptibility to prostatitis and epithelial dysplasia with aging.

Acknowledgements

This study was supported by São Paulo Research Foundation, grants n° 09/50204-6 and 09/52747-7. This article represents part of the PhD thesis developed by JCR to the Institute of Biosciences (UNESP), Brazil.

References

- Barker DJ. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 1997;13:807–813.
- Bateson P, Barker DJ, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine D, Foley RA. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;430:419–421.
- Benevenga NJ, Calvert C, Eckhert CD, Fahey GC, Greger JL, Keen CL et al. Nutrient Requirements of the Laboratory Rat. In: Benevenga NJ, Calvert C, Eckhert CD, Fahey GC, Greger JL, Keen CL et al. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 4th ed. Washington: National Academy Press; 1995. p.11-79.
- Bertram CE, Hanson MA. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull* 2001;60:103–121.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- Cherala G, Shapiro BH, D'mello AP. Two low protein diets differentially affect food consumption and reproductive performance in pregnant and lactating rats and long-term growth in their offspring. *J Nutr* 2006;136:2827–2833.
- Coupe B, Frt I, Darmaun D, Parnet P. The timing of “catch-up growth” affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297:R813–824.
- Cowin PA, Foster P, Pedersen J, Hedwards S, McPherson SJ, Risbridger GP. Early-onset endocrine disruptor-induced prostatitis in the rat. *Environ Health Perspect* 2008;116:923–929.
- Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994;54:5474–5478.
- Dimosthenopoulos C. Malnutrition. In: Katsilambros N, Dimosthenopoulos C, Kontogianni M, Manglara E, Poulia K. *Clinical Nutrition in Practice*. Chichester: Wiley-Blackwell; 2010. p.37-44.

- Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R91–96.
- Elkhwaji JE, Hauke RJ, Brawner CM. Chronic bacterial inflammation induces prostatic intraepithelial neoplasia in mouse prostate. *Br J of Cancer* 2009;101:1740–1748.
- Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr* 2007;98:922–928.
- Faria TS, Brasil FB, Sampaio FJ, Ramos CF. Maternal malnutrition during lactation alters the folliculogenesis and gonadotropins and estrogen isoforms ovarian receptors in the offspring at puberty. *J Endocrinol* 2008;198:625–634.
- Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:34–45.
- Fernandez-Twinn DS, Ekizoglou S, Gusterson BA, Luan J, Ozanne SE. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogenesis* 2007;28:545–552.
- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson B, Hales CN. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr* 2003;90:815–822.
- Fischbeck KL, Rasmussen KM. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr* 1987;117:1967–1975.
- Gardner DS, Ozanne SE, Sinclair KD. Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:3419–3427.
- Gosby AK, Stanton LML, Maloney CA, Thompson M, Briody J, Baxter RC, Bryson JM, Denyer DS, Caterson ID. Postnatal nutrition alters body composition in adult offspring exposed to maternal protein restriction. *Br J Nutr* 2009;101:1878–1884.
- Graham S, Gandelman R. The expression of ano-genital distance data in the mouse. *Physiol Behav* 1986;36:103–104.
- Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 2006;572:97–108.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447–455.
- Justulin LA Jr, Della-Coleta HH, Taboga SR, Felisbino SL. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int J Androl* 2010;33:696–708.
- Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010;19:87–98.
- Langley-Evans SC. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int J Food Sci Nutr* 2000;51:11–17.
- Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci* 1994;86:217–222.
- Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA, Liao ST. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod* 1990;43:1079–1086.
- Leonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and waning and on timing of puberty. *Biol Reprod* 2003;68:390–400.

- Lins MC, Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT, Passos MCF. Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring, *Regul Pept* 2005;127:197–202.
- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 2003;253:165–174.
- McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:82–89.
- Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate* 1996;28:124–128.
- Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz PW. Prenatal origins of adult disease. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:132–138.
- Page KC, Sottas CM, Hardy MP. Prenatal exposure to dexamethasone alters Leydig cell steroidogenic capacity in immature and adult rats. *J Androl* 2001;22:973–980.
- Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram ND, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995;10:2435–2446.
- Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O, Bieberich C. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev* 2001;13:241–252.
- Prins GS, Huang L, Birch L, Pu Y. The Role of Estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. *Ann NY Acad Sci* 2006;1089:1–13.
- Qasem RJ, Yablonski E, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'mello AP. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav* 2012;105:1182–1193.
- Rae MT, Kyle CE, Miller DW, Hammond AJ, Brooks AN, Rhind SM. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod Sci* 2002;72:63–71.
- Ramos CF, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJ. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl* 2010;12:180–185.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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-76 rodent diet. *J Nut* 1993;123:1939–1951.
- Risbridger GP, Almahbobi GA, Taylor RA. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res* 2005;322:173–181.
- Santos AM, Ferraz MR, Teixeira CV, Sampaio FJ, Ramos CF. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. *Horm Metab Res* 2004;36:27–33.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, Humphrey PA, Sundberg JP, Rozengurt N, Barrios R, Ward JM, Cardiff RD. 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 Res* 2004;64:2270–2305.
- Shidaifat F, Daradka M, Al-Omari R. Effect of androgen ablation on prostatic cell differentiation in dogs. *Endocr Res* 2004;30:327–334.
- Sivakumar P, Das AM. Fibrosis, chronic inflammation and new pathways for drug discovery. *Inflamm Res* 2008;57:410–418.
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL. Decrease in ano-genital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113:1056–1061.

- Un-no T, Hayami S, Nobata S, Sudoko H, Honma S, Fujita K, Ozono S. Neonatal exposure to estrogen in the Wistar rat decreases estrogen receptor-beta and induces epithelial proliferation of the prostate in the adult. *Urol Int* 2007;79:345–351.
- Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 2005;40:121–128.
- Vicente LL, Moura EG, Lisboa PC, Costa AMA, Amadeu T, Mandarim-de-Lacerda CA, Passos MCF. Malnutrition during lactation is associated with higher expression of leptin receptor in pituitary of the adult offspring. *Nutrition* 2004;20:924–928.
- Webber MM. Polypeptide hormones and the prostate. *Prog Clin Biol Res* 1981;75B:63–88.
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 1966;30:23–38.
- Wu G, Imhoff-Kunsch B, Girard AW. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012;26:4–26.
- Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, Martinez-Samayoa PM, González-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 2006;571:221–230.
- Zambrano E, Rodriguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005;563:275–284.

Tables

Table 1 Composition of the two isocaloric diets

Ingredientes (g/Kg)	Control diet 17% of protein	Low protein diet 6% of protein#
Cornstarch	397	480
Casein (84%)	202	71.5
Dextrin (90-94%)	130.5	159
Sucrose	100	121
Soybean oil	70	70
Fiber	50	50
Mineral mix (AIN 93%)*	35	35†
Vitamin mix (AIN 93)*	10	10
L-Cystine	3	1
Choline bitartrate	2.5	2.5
Total energy (Kcal g ⁻¹)	3.76	3.76

The low protein diet was prepared by PragSoluções (PragSoluções, SP, Brazil). Diets were supplemented with L-Cystine as sulfur amino acid. *Vitamin and mineral mixtures were formulated to meet the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendation for rodent diets (Reeves et al., 1993). †Potassium phosphate, monobasic, was added to the salt mix of this diet to maintain phosphorus at the levels found in the control casein diet (3g/kg of diet) and the calcium:phosphorus ratio has been kept at 1.3 in both diets.

Table 2 Effects of maternal protein malnutrition on the biometric parameters from dams and litter

Parameters	Experimental Groups	
	NP	RP
Data of pregnant rat (n = 12 each group)		
Body Weight (g) – GD1	234.21 ± 14.83	236.32 ± 12.35
Body Weight (g) – GD21	358.42 ± 11.61	328.53 ± 11.91*
Body Weight Gain (g) – GD21-GD1	124.24 ± 12.25	93.25 ± 13.12*
Maternal food intake (g day ⁻¹) at GD2	20.26 ± 2.01	19.95 ± 2.33
Maternal food intake (g day ⁻¹) at GD20	22.17 ± 2.32	22.85 ± 3.13
Data of litter (n = 96 each group) at PND1		
Litter male birth weight (g)	6.68 ± 0.38	4.46 ± 0.39*
Litter male ano-genital distance (mm)	3.33 ± 0.34	2.68 ± 0.22*
Litter male ano-genital distance /birth weight (mm g ⁻¹)	0.21 ± 0.01	0.16 ± 0.01*

NP, normal-protein diet group; RP, restrict-protein diet group; GD, gestational day; PND, post-natal day. Values are expressed as mean ± SD. *indicates that RP group is significantly different from NP group with $p < 0.05$.

Table 3 Effects of maternal protein malnutrition on biometric values of the animals and rat prostatic lobes

Parameters	Experimental Groups					
	NP30	RP30	NP120	RP120	NP360	RP360
Biometric Data (n = 12)						
Body Weight (g) - day of euthanasia	140.68 ± 10.63	98.42 ± 6.21*	405.81 ± 37.66	391.31 ± 14.41	526.17 ± 54.07	501.53 ± 29.61
Urogenital complex absolute weight (g)	0.31 ± 0.01	0.23 ± 0.02*	3.24 ± 0.12	2.78 ± 0.10*	3.64 ± 0.13	3.55 ± 0.12
Urogenital complex relative weight (g)	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.01*	0.82 ± 0.03	0.71 ± 0.04*	0.72 ± 0.09	0.68 ± 0.03
Hormone plasma levels (n = 10)						
Testosterone (ng/dL)	38.23 ± 6.11	24.64 ± 5.72*	202.16 ± 58.53	185.91 ± 66.81	165.31 ± 28.13	133.62 ± 32.21
Dihydrotestosterone (ng/dL)	5.80 ± 2.30	3.50 ± 0.80*	26.21 ± 3.19	18.74 ± 4.18*	19.62 ± 2.13	12.51 ± 2.36*
Ventral Prostate (n = 8)						
VP absolute weight (g)	-	-	0.46 ± 0.06	0.35 ± 0.06*	0.56 ± 0.09	0.48 ± 0.06
VP relative weight (g)	-	-	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.02*	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Epithelial height (µm)	10.21 ± 0.98	8.82 ± 0.91*	23.03 ± 1.09	21.01 ± 0.92	20.55 ± 0.51	19.94 ± 0.92
Collagen fibers volume fraction (%)	5.82 ± 0.62	8.37 ± 0.54*	3.23 ± 0.72	5.95 ± 0.91*	3.48 ± 0.18	5.97 ± 0.32*
Epithelial cells proliferation index (%)	5.42 ± 0.11	8.33 ± 0.61*	0.53 ± 0.03	0.61 ± 0.06	0.62 ± 0.06	0.86 ± 0.05
Dorsolateral Prostate (n = 8)						
DLP absolute weight (g)	-	-	0.32 ± 0.03	0.25 ± 0.05*	0.34 ± 0.09	0.35 ± 0.06
DLP relative weight (g)	-	-	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01*	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
DP Epithelial height (µm)	9.91 ± 0.85	7.83 ± 0.63*	20.28 ± 0.53	19.75 ± 0.42	18.26 ± 0.78	17.95 ± 0.93
DP Collagen fibers volume fraction (%)	3.01 ± 0.31	3.76 ± 0.89	3.89 ± 0.94	4.12 ± 0.98	3.30 ± 0.32	3.89 ± 0.41
DP Epithelial cells proliferation index (%)	7.91 ± 0.32	11.63 ± 1.23*	0.63 ± 0.02	0.68 ± 0.03	0.59 ± 0.01	0.66 ± 0.04
LP Epithelial height (µm)	11.28 ± 0.57	9.89 ± 0.61*	20.11 ± 0.72	19.70 ± 0.57	20.02 ± 0.73	19.85 ± 0.64
LP Collagen fibers volume fraction (%)	3.81 ± 0.31	5.26 ± 0.89*	5.42 ± 0.65	8.43 ± 0.87*	5.21 ± 1.04	7.75 ± 1.07*
LP Epithelial cells proliferation index (%)	9.04 ± 0.84	17.58 ± 1.42*	0.53 ± 0.03	0.59 ± 0.06	0.65 ± 0.03	0.78 ± 0.04

NP30, NP120 and NP360 (normal-protein diet group died at day 30, 120 and 360 respectively); RP30, RP120 and RP360 (restrict-protein diet group died at day 30, 120 and 360 respectively); Urogenital complex (bladder; urethra, seminal vesicle; ventral, dorsolateral and anterior prostatic lobes); VP (ventral prostate); DLP (dorsolateral prostate); DP (dorsal prostate); LP (lateral prostate). Values are expressed as mean ± SD. * indicates that RP group is significantly different from NP group with $p < 0.05$.

Table 4 Relative frequency of prostate compartments

Parameters (%)	Experimental Groups					
	NP30	RP30	NP120	RP120	NP360	RP360
Ventral Prostate (n = 8)						
Epithelium	29.53 ± 3.15	31.32 ± 5.34	33.53 ± 4.32	31.32 ± 3.25	34.14 ± 5.21	36.65 ± 4.54
Stroma	11.51 ± 1.52	25.53 ± 1.55*	23.95 ± 3.65	26.74 ± 2.83	18.18 ± 3.41	29.72 ± 4.31*
Lumen	59.01 ± 4.86	43.22 ± 6.26*	44.32 ± 3.28	42.01 ± 3.43	47.87 ± 5.12	34.58 ± 5.39*
Dorsal Prostate (n = 8)						
Epithelium	34.82 ± 3.31	34.72 ± 3.41	30.56 ± 4.54	29.82 ± 2.85	29.35 ± 2.62	31.67 ± 3.87
Stroma	26.75 ± 1.72	32.13 ± 1.81	28.73 ± 3.65	29.12 ± 1.84	22.93 ± 2.22	28.76 ± 3.78
Lumen	42.54 ± 3.23	33.15 ± 4.87	47.21 ± 3.62	47.35 ± 2.43	47.85 ± 4.74	40.57 ± 4.23
Lateral Prostate (n = 8)						
Epithelium	34.43 ± 2.52	35.52 ± 1.86	26.87 ± 5.77	26.34 ± 3.15	25.23 ± 2.62	26.69 ± 4.76
Stroma	25.23 ± 1.92	36.85 ± 1.52*	20.72 ± 4.43	29.54 ± 1.42	23.75 ± 2.42*	37.67 ± 5.33*
Lumen	40.45 ± 2.55	29.76 ± 2.13*	53.22 ± 5.22	44.31 ± 2.32	51.13 ± 4.61	37.52 ± 4.51*

NP30, NP120 and NP360 (normal-protein diet group died at day 30, 120 and 360 respectively); RP30, RP120 and RP360 (restrict-protein diet group died at day 30, 120 and 360 respectively). Values are expressed as mean ± SD. * indicates that RP group is significantly different from NP group with $p < 0.05$.

Table 5 Effects of maternal protein malnutrition on histopathological lesions incidence in rat prostatic lobes

Parameters	Experimental Groups			
	NP120	RP120	NP360	RP360
Ventral Prostate (n = 8)				
Prostatitis (%)	0	2/6 (33%)*	1/6 (17%)	3/6 (50%)*
Epithelial dysplasia (%)	0.11 ± 0.01	0.28 ± 0.01*	10.41 ± 1.03	32.35 ± 2.98*
Dorsal Prostate (n = 8)				
Prostatitis (%)	0	0	0	1/6 (17%)
Epithelial dysplasia (%)	0	0	0.73 ± 0.08	1.06 ± 0.32*
Lateral Prostate (n = 8)				
Prostatitis (%)	2/6 (33%)	4/6 (66%)*	3/6 (50%)	6/6 (100%)*
Epithelial dysplasia (%)	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.01	9.12 ± 1.05	21.41 ± 2.08*

NP30, NP120 and NP360 (normal-protein diet group died at day 30, 120 and 360 respectively); RP30, RP120 and RP360 (restrict-protein diet group died at day 30, 120 and 360 respectively). Results are expressed as mean ± SD. * indicates that RP group is significantly different from NP group with $p < 0.05$.

Figure Captions

Fig. 1. Data from body weight and food intake measurements. **A)** Mean body weight of pups whose mothers were fed a control (NP) or low protein diet (RP) during gestation from day 1 until post-natal day (PND) 150. **B)** Food intake of NP and RP pups after weaning until PND 360. **C)** Post-weaning body weight normalized food intake in NP and RP offspring. **D)** Body composition: Visceral fat mass (VFM) (g/100g body weight). Values are means for at least twelve animals per group with standard deviation represented by vertical bars. *indicates that RP group is significantly different from NP group with $p < 0.05$.

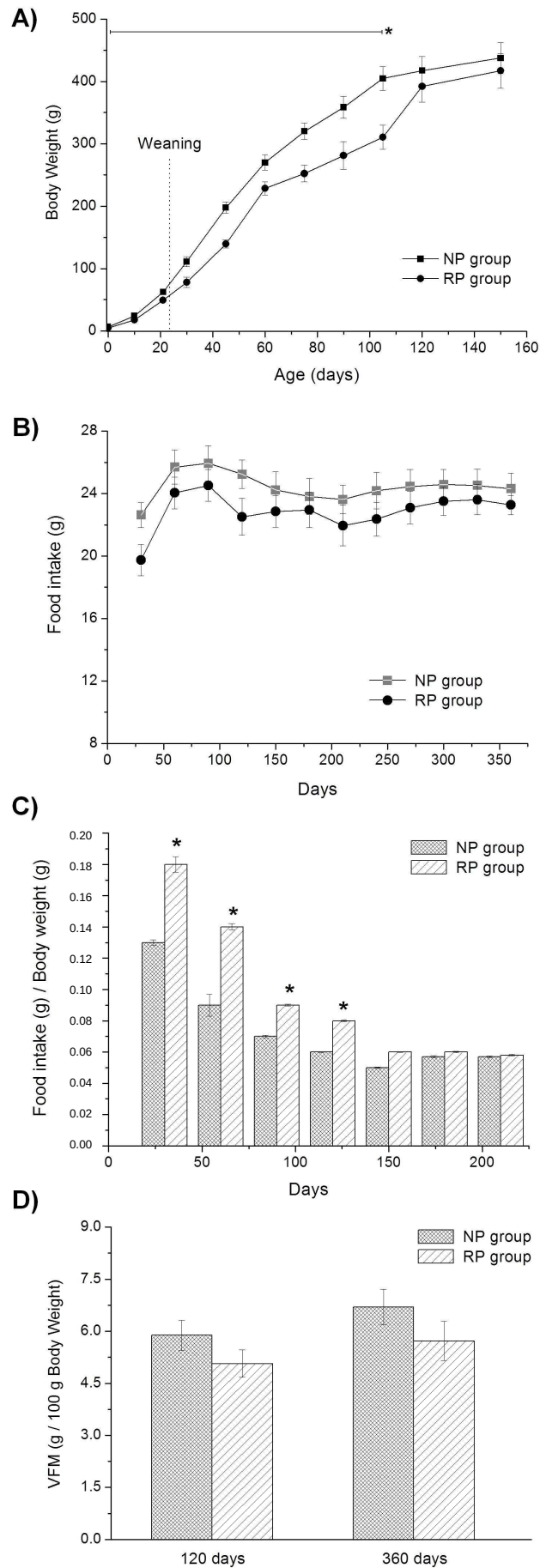


Fig. 2. Representative sections of the ventral (VP), dorsal (DP) and lateral (LP) prostatic lobes from the normal (NP) and restricted (RP) protein diet groups, stained with hematoxylin-eosin. **NP group:** Tall columnar cells with basal nuclei and evident nucleoli. The clear supranuclear areas probably represent the Golgi complex. Prostatic stroma with blood vessels, smooth muscle cells and thin layer of collagen fibers surrounding the glandular acini. **RP group:** Note lighter, reduced glandular acini, some areas with epithelial atrophy and hypertrophic stroma with increased collagen fibers. Inflammatory infiltration (*) in LP was observed in both of the groups. Arrows show cells detached from the DP epithelium. Scale bars = 50 μ m.

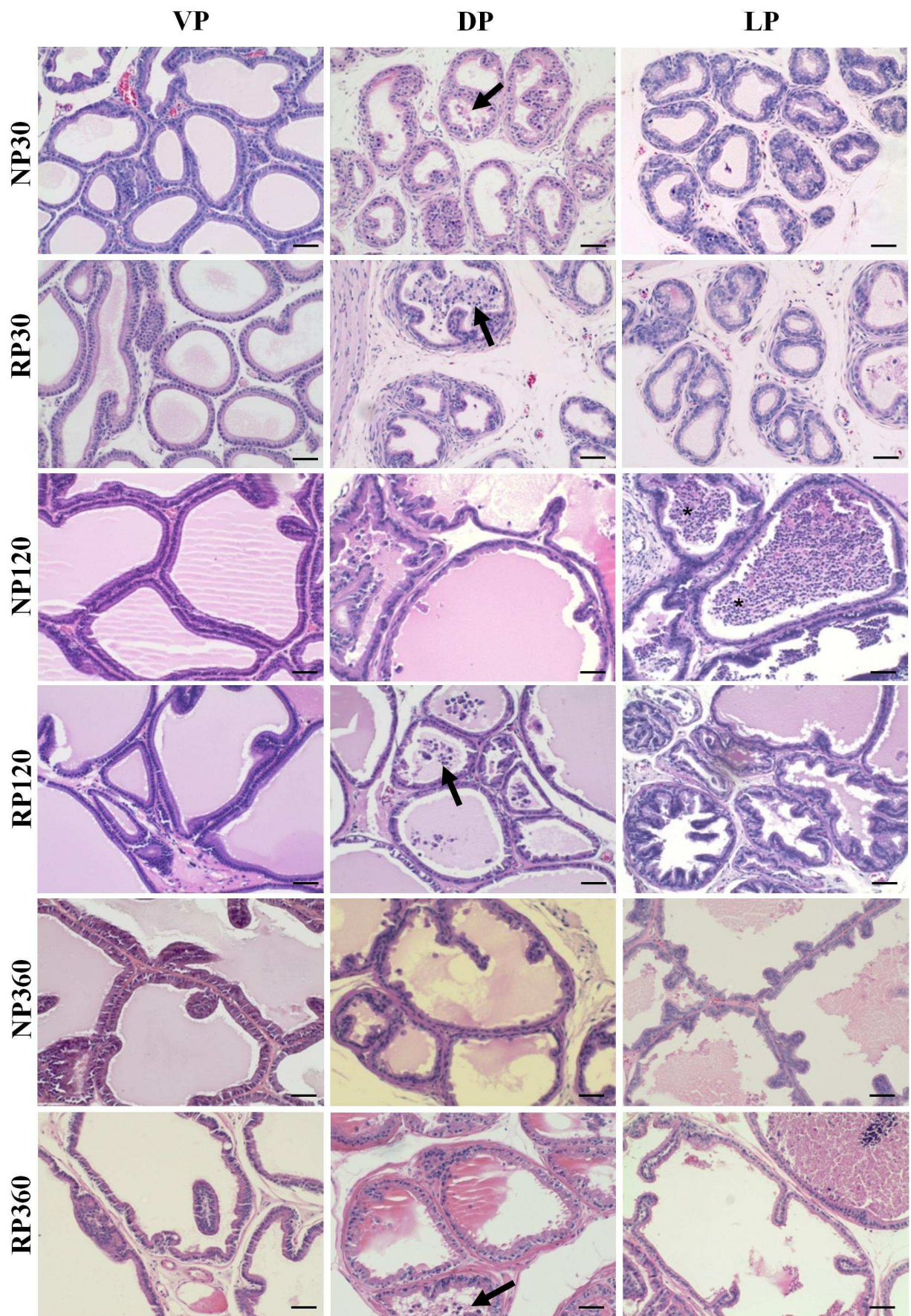
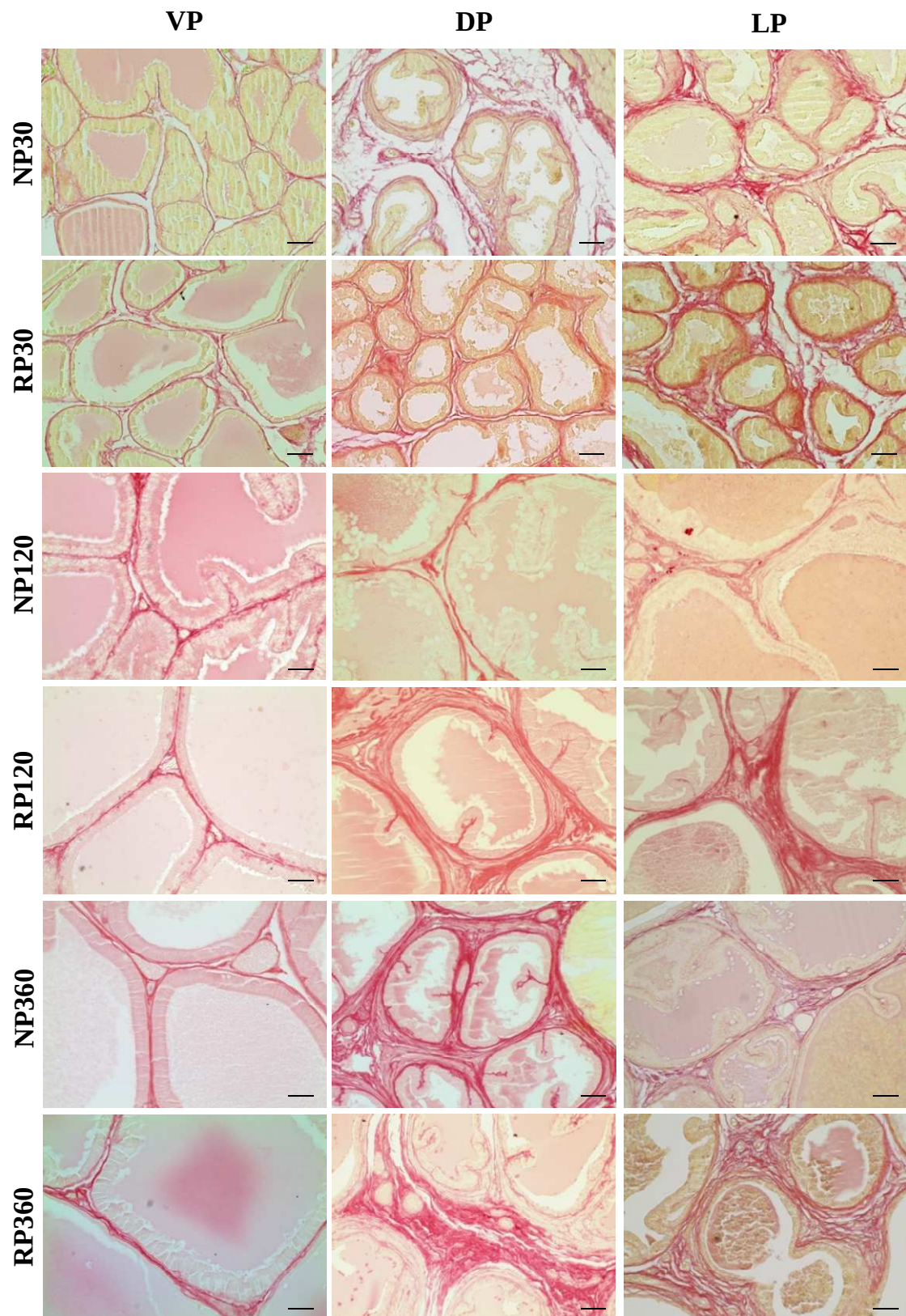


Fig. 3. Representative sections of the ventral (VP); dorsal (DP) and lateral (LP) prostatic lobes from the normal (NP) and restricted (RP) protein diet groups, stained by picrosirius. Collagen fibers are stained in red. The RP prostatic lobes show increased area of collagen fibers compared with that of the NP group, mainly in the lateral lobe. Scale bars = 30 μm .



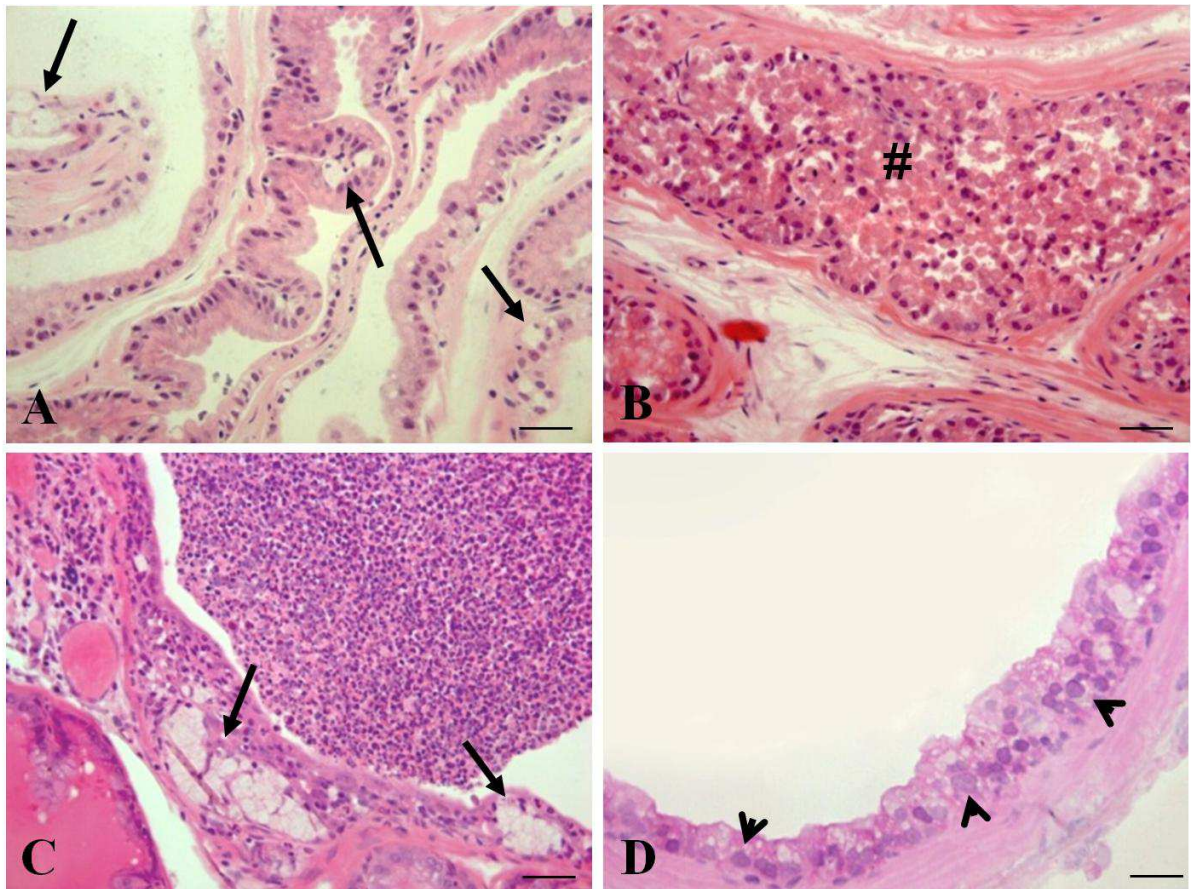
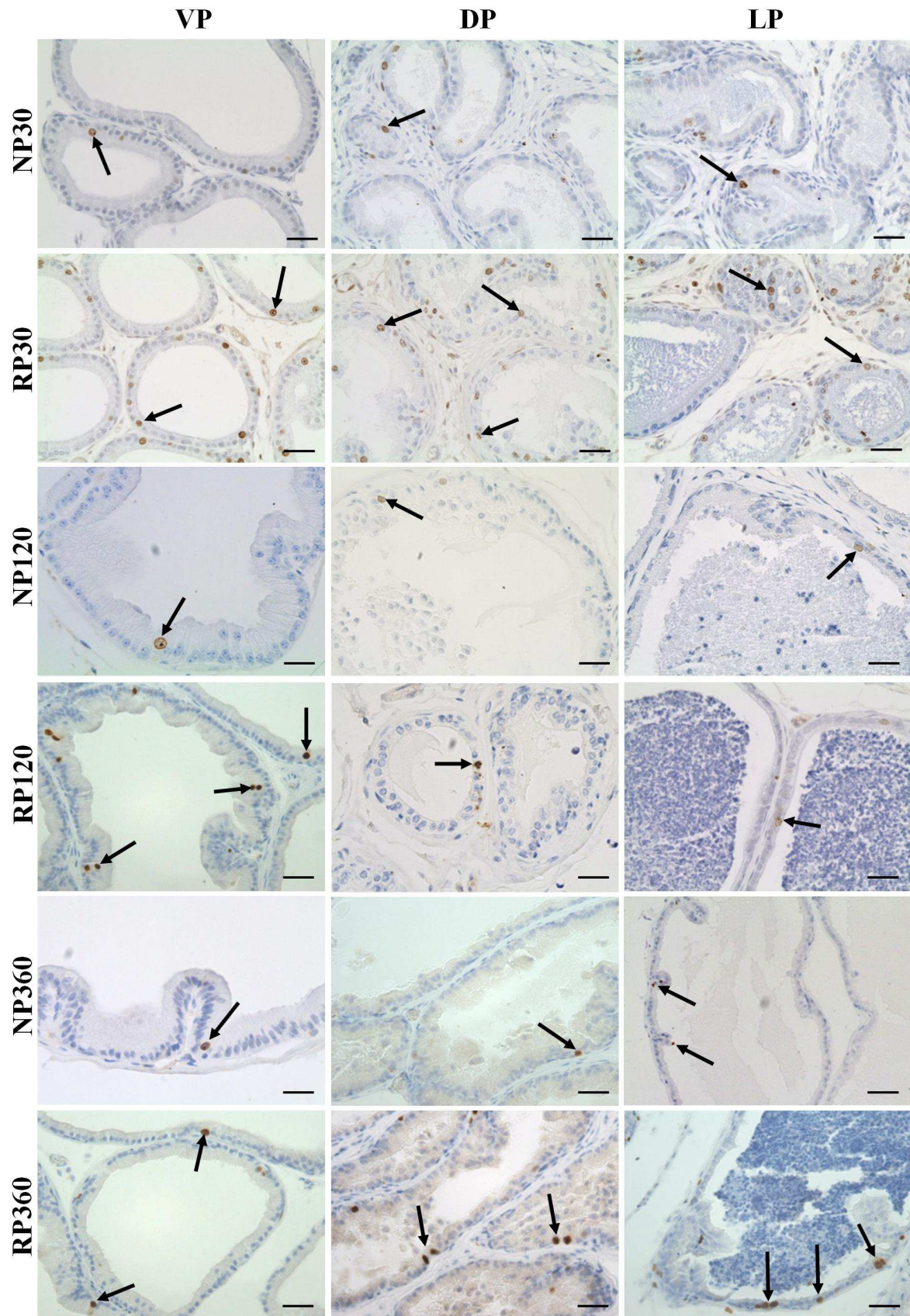


Fig. 4. Representative sections of ventral or VP (A), dorsal or DP (B) and lateral or LP (C-D) prostatic lobes for morphological alterations from the RP360 group, stained with H&E. A, Note reduced epithelial height and epithelium metaplastic cells (arrows); B, DP with epithelial cells (#) filling out the lumen; C, cluster of metaplastic cells (arrows) beside inflammatory cells (prostatitis) at the lumen; D, focal epithelial hyperplasia characterized by crowding cells and stratification. Note epithelial cells with enlarged nuclei (arrowheads). Scale bars = 30 μ m.

Fig. 5. Representative sections of the ventral (VP), dorsal (DP) and lateral (LP) prostatic lobes from the normal (NP) and restricted (RP) protein diet groups, immunostained for Ki-67. The arrows point to nuclei positive for Ki-67. Note an increased number of Ki-67 positive cells in the RP30 group compared with that in the NP30 group. Scale bars = 30 μ m.



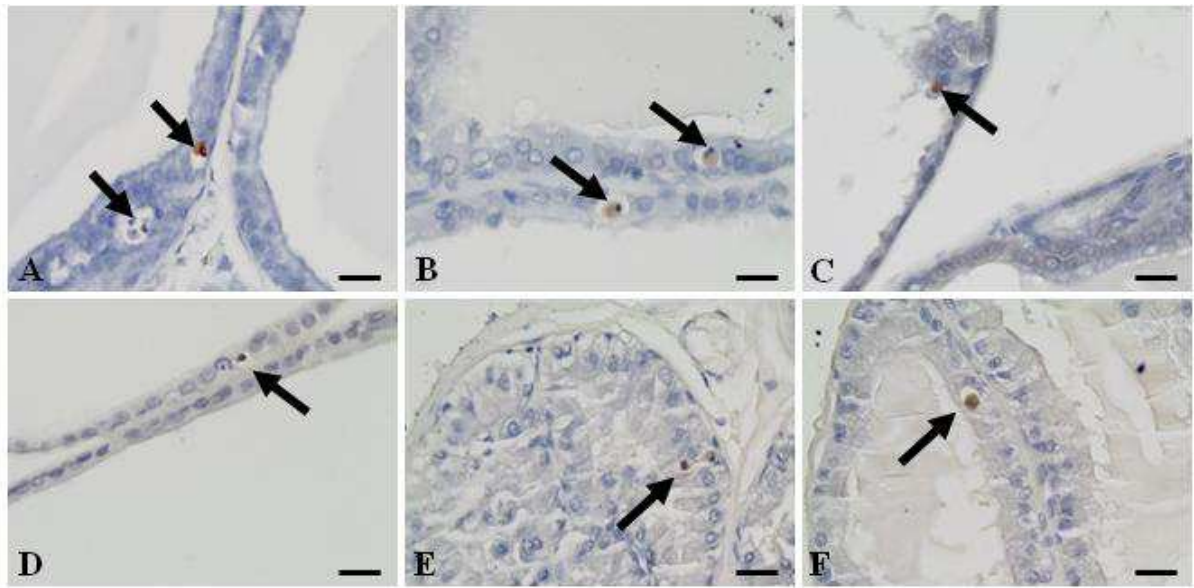


Fig. 6. Representative image of TUNEL reaction in sections of the rat ventral (A,D), dorsal (B,E) and lateral (C,F) prostatic lobes from normal or NP (A-C) and restricted (RP) protein diet groups (D-F) at post-natal day 120. The arrows indicate typical positively stained apoptotic epithelial cells that were used to determine the TUNEL index. Scale bars = 30 μ m.

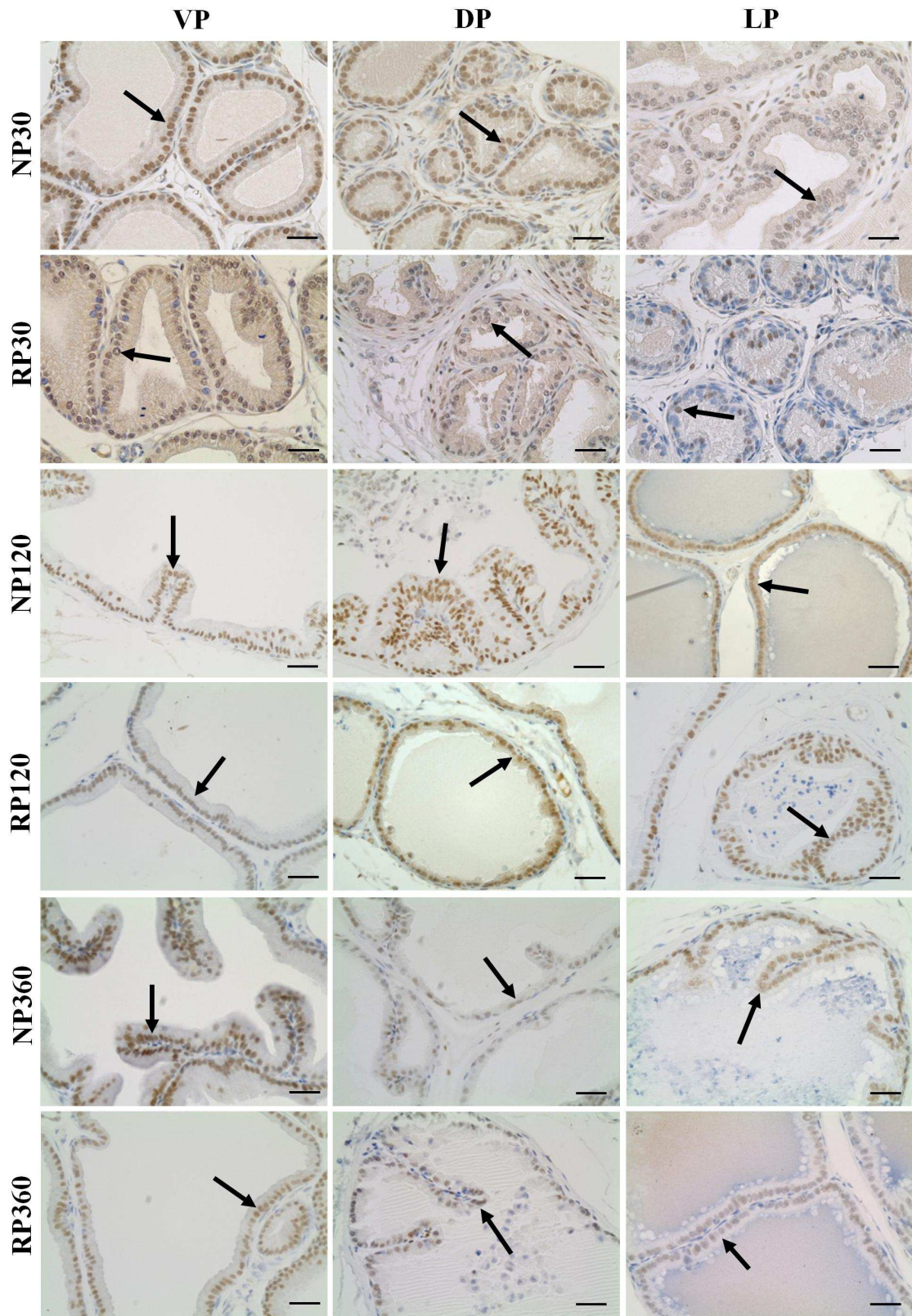
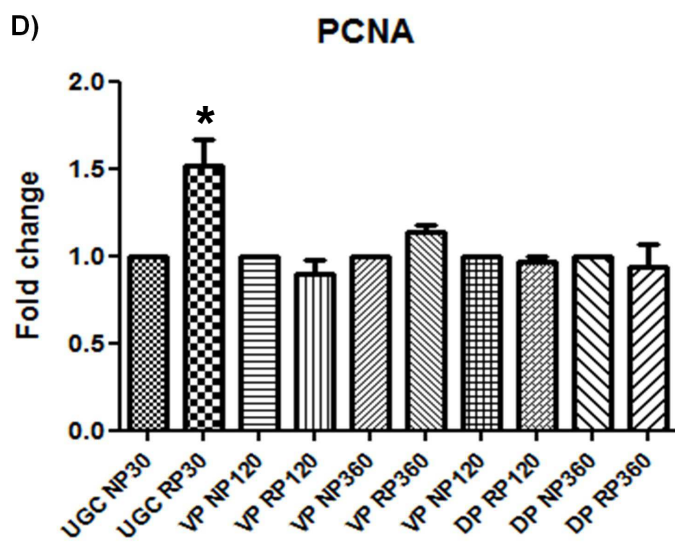
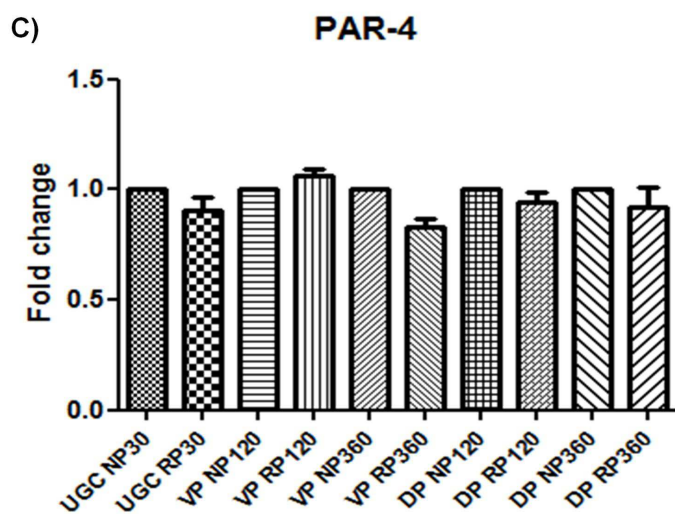
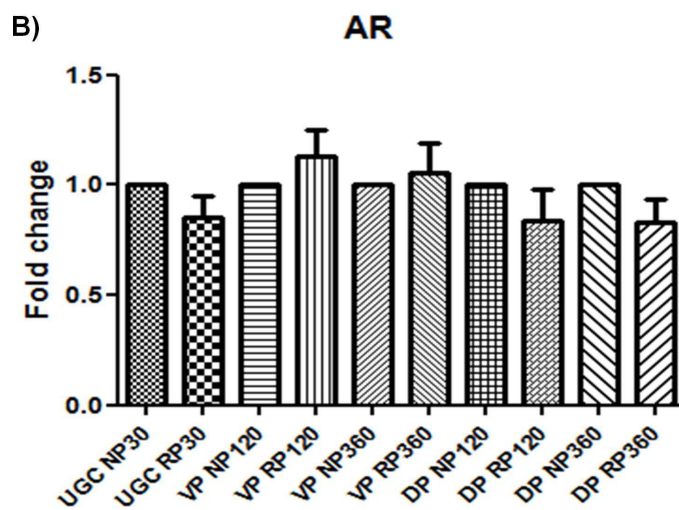
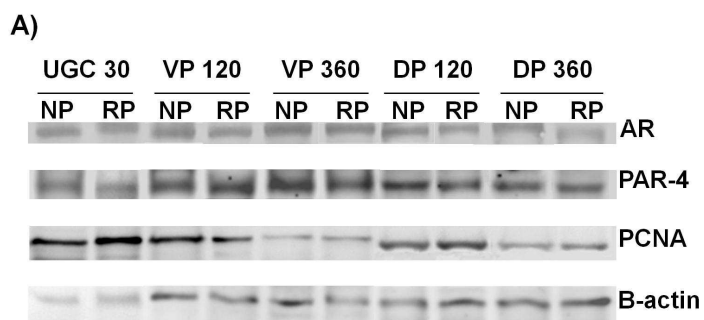


Fig. 7. Representative sections of the ventral (VP), dorsal (DP) and lateral (LP) prostatic lobes from the normal (NP) and restrict (RP) protein diet groups immunostained for androgen receptor (arrows). Scale bars = 30 μ m.

Fig. 8. **A)** Representative western blotting for androgen receptor (AR), prostate apoptosis response-4 (PAR-4), proliferating cell nuclear PCNA and beta-actin expression in the rat urogenital complex (UGC), ventral (VP) and dorsal (DP) prostatic lobes from the control (NP) and low protein (RP) groups. **B)** Densitometric analysis of the AR bands and **(C)** PAR-4 bands showed no differences between the groups in both prostatic lobes. **D)** Densitometric analysis of the PCNA bands showing a significant higher expression only in the UGC from the RP at PND30. Results are expressed as mean $\pm$ SD. *indicates that RP group is significantly different from NP group with $p < 0.05$.



4.2 Capítulo II:

Intrauterine protein malnutrition increases susceptibility to prostate neoplasias in adult rat after sex steroid exposure

Jaqueline C Rinaldi^a, Heloisa B Bruno^a, Livia M Lacorte^a, Wagner J Fávaro^b, Renee L Amorim^c, Luis A Justulin Junior^d, Sérgio L Felisbino^{a*}

^aDepartment of Morphology, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista (UNESP), Brazil.

^bInstitute of Biology - Univ of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo, Brazil.

^cClinic Veterinary, FMVZ – Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

^dDepartment of Morphology, School of Odontology, Univ Estadual Paulista (UNESP), Brazil.

Running title: **maternal low protein diet and prostate disease**

This work was supported by FAPESP (grant 09/52747-7) and CAPES do Brazil is gratefully acknowledgement J.C.R. was recipient of a FAPESP fellowship (09/50204-6).

*Correspondence to: Dr. Sérgio L. Felisbino, Departamento de Morfologia, Instituto de Biosciencias, Univ Estadual Paulista (UNESP), 18618-970, Botucatu, SP, Brasil.

Telephone/fax: +55 0XX 14 3880 0474

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br (S.L. Felisbino)

ABSTRACT

Background: Maternal protein restriction during pregnancy compromises reproductive functions by impairing testosterone peak during late gestation. Previous studies showed that androgen/estrogen unbalances during perinatal period, can program prostate cells to develop prostate lesions in adult life after a second insult. This study aimed to investigate the prostate diseases susceptibility in adult rat offspring which underwent *in utero* low protein diet and exposed chronically to low doses of estrogen and testosterone in the adult life.

Methods: 17 weeks-old Wistar rats (n=48) that received *in utero* normal protein diet (NP group, AIN93G=17% protein) or restricted protein diet (RP group, AIN93G modified=6% protein) were given implants with 17 β -estradiol plus testosterone administration (NPH and RPH groups) for 17 weeks to drive PIN lesions in the prostate lobes. The animals were killed at age of 34 weeks and the ventral (VP) and dorsolateral (DLP) prostatic lobes was excised, weighted and processed for morphological, histopathological, immunohistochemical, biochemical and ultrastructural analysis.

Results: VP and LP from RPH group exhibited heightened susceptibility to prostatic intraepithelial neoplasia, mainly cribriform and signet ring-cell patterns. Steroid hormones treatment also increases the incidence and aggressiveness of prostatitis in VP and LP from RPH group.

Conclusion: Maternal protein restriction alters adult prostate response to androgen/estrogen handling and increases prostate susceptibility to diseases.

Keywords: prostate, low protein diet, prostatitis, prostatic intraepithelial neoplasia.

INTRODUCTION

Maternal malnutrition by low protein diet (MPM) increases the maternal serum levels of testosterone, estradiol and corticosteroids [1]. Moreover MPM reduces the growth rate and promotes a selective distribution of nutrients to the embryo formation [2,3]. According to the developmental period in which this injury occurred, many systems can be affected resulting in different impacts in adulthood [4]. The long term effects are not yet fully characterized but the main impacts are heart disease, hypertension, hyperglycemia and impairment of reproductive functions [5-7].

Previous studies have demonstrated that MPM compromises reproductive functions by impairing testosterone peak during late gestation, hindering the development of androgen dependent structures [1,8]. The prostatic organogenesis is dependent on androgens produced by the fetal testes [9]. Prejudice in androgen signaling in prostate during development results in reduced growth and organ morphogenesis [10], and increased susceptibility to develop lesions [11].

Previous studies from our group have shown that MPM delays prostate development and increase incidence of cellular dysplasia and prostatitis (unpublished data). Moreover, other studies have shown that MPM alters receptor numbers [12], modifies hormone production and the capacity of cells to respond to hormone signals [13]. Considering that MPM causes hormonal changes in both, maternal and male offspring [1] is important to investigate if the increased serum maternal estrogen can promote the estrogen imprinting in the male offspring. The prostate gland is susceptible to perinatal estrogen imprinting, in which reduces the expression of the androgen receptor and impairs the prostate responsiveness to androgen stimulus in adulthood [14].

Prins et al. [15] also demonstrated that neonatal estrogen imprinting can interfere with prostate epithelial cells dynamic proliferation and differentiation leading to an increased in the number of basal cells and impaired their differentiation into luminal secretory cells. This unbalanced cellular population may be involved in the dysplastic and neoplastic processes observed in aging animals. In this sense, the aim of the present study was to investigate if maternal protein restriction diet alters the male prostate lesions susceptibility when exposed to testosterone plus estradiol in the adult age.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental procedures

Adult female (90 day-of-age, n=24) and male (90 day-of-age, n=10) Wistar rats were obtained from the Central Stock breeder of the State University of Campinas - UNICAMP

(Campinas, SP, Brazil). The animals were kept in a Central Biotherium of UNESP – Sao Paulo State University throughout the experimental period. The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research of the Brazil College of Animal Experimentation and was approved by the Bioscience Institute/UNESP Ethics Committee for Animal Experimentation (protocol: 08/09).

Pregnant female Wistar rats were randomized into two dietary groups, control (NP, n=12, AIN93G or normal diet=17% of protein) and protein restrict rats (RP, n=12, AIN93G modified=6% of protein) ad libitum. Both diets were prepared as described by Reeves et al. [16]. After birth, all animals had free access to water and control diet. The pups were weaned at post-natal week 3 and siblings were housed two/cage. At 17 weeks-old, male offspring were assigned to one of four groups with 12 rats/group: (1) NP group and (2) RP group, received a subcutaneous empty pellet; (3) NPH group and (4) RPH group, received testosterone plus 17 β -estradiol (T+E) implants for 17 weeks. Rats from each treatment group were anesthetized, a horizontal incision on the lateral side of the neck was made and the implants (Innovative Research of America, Inc. Sarasota, Florida) were placed in the subcutaneous area. During 17 weeks (replaced by a new identical after 60 days), the NPH and RPH animals were exposed to 0.8 mg/day of propionate-testosterone and to 0.08 mg/day of 17 β -estradiol [17]. Previous studies have shown that T+E implants result in normal testosterone levels and at least 3-fold higher estradiol levels than untreated-animals [18].

At 34 weeks-old, the animals were killed by decapitation and the prostate lobes were removed, weighted and alternate lobes were left and right assigned and snap frozen or immersed in fixative. Twelve prostatic lobes were fixed in methacarn (70% methanol, 20% chloroform, 10% acetic acid) for 24 h, rinsed and processed for histology and twelve prostatic lobes were fixed in liquid nitrogen and stored at -80°C for western blotting.

Serum hormone levels

Blood was collected from the ruptured cervical vessels and kept in a tube for determination of serum testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) and estradiol (E) concentration. Plasma was isolated by centrifugation (4000 rpm, 4°C, 20 min) and frozen at -20°C prior to hormone quantification. The serum concentration of T, DHT and E were determined by chemiluminescence analyzer Vitros ECI (Johnson and Johnson Orthoclinical Diagnostics, Division, Rochester, NY, USA). The sensitivities were 0.1-3814 pg/mL for E and 0.1-150 ng/mL for T and DHT. The respective intra-assay variations for E and T or DHT were 1.1% and 1%, while the test variations were 1.5% and 2.1%.

Morphological and Morphometric Analysis

The fixed prostatic tissues were dehydrated through an ascending series of 70-100% ethanol, and embedded in glycol methacrylate resin (Leica historesin embedding kit Image ProPlus, Germany) or were cleared in xylene and embedded in Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO, USA). Histological resin sections (4 µm) were subjected to hematoxylin-eosin (H&E) staining for morphological and morphometric analysis. Paraplast sections (4 µm) also were subjected to H&E staining, but mainly to immunohistochemistry analysis. Resin sections stained with H&E were subjected to the morphometric and stereological analysis using a Leica™ DMLB 80 microscope connected to a Leica™ DC300FX camera. The digitalized images, obtained by using the image analyzer Leica Q-win software Version 3 for Windows, were used for analysis. The mean of epithelial cells height of the VP, DP and LP was determined from a total of 1,200 measurements: at 10 points in 20 random microscopic fields per prostatic lobe (40X magnification). To avoid erroneous interpretations, all the measurements were performed in the intermediate regions of the prostatic lobes, which represent the major portion of the prostatic ductal system in rats [19].

Histopathological Analysis

Three to four serial sections were made at four levels of the tissue block to permit pathologic analysis along the tissue depth. A minimum of 10 sections was analyzed for each tissue. The sections were coded to prevent reader bias and stained with H&E. Each lobe was scored in a blinded fashion for the presence of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), epithelial hyperplasia and inflammatory infiltration. PIN lesions were characterized by the presence of nuclear atypia (enlarged and elongated nuclei, hyperchromasia, prominent nucleoli) with or without aberrant cellular piling and ductal formation as suggested for Bostwick and Cheng [20]. To diagnostic and separate benign and malignant conditions of the prostate, immunohistochemistry for p63 and laminin were used to stain tissue sections for the presence of basal cells, recognizing that PIN retains an intact or fragmented basal cell layer and basal membrane whereas adenocarcinoma does not [21].

Chronic histologic inflammation (prostatitis) was graded on a scale proposed by [22] considering: a) Histological grading: 0=no inflammation; 1=scattered inflammatory cell infiltrate without nodules; 2=no confluent lymphoid nodules; 3=large inflammatory areas with confluence. b) Histological aggressiveness: 0=no contact between inflammatory cells and glandular epithelium, 1=contact between inflammation and epithelium, 2=interstitial infiltrate with glandular disruption, 3=glandular disruption on >25%.

Transmission electron microscopy

Samples of the ventral and dorsolateral lobes from six animals were collected and fixed overnight by immersion in the Karnovsky's solution [23] followed by immersion in 3% glutaraldehyde plus 0.25% tannic acid solution in Millonig's buffer for 2 h [24]. After washing with the same buffer the samples were post fixed with 1% osmium tetroxide for 2 h. The material was then dehydrated in an increasing acetone series, embedded in Araldite resin (Polysciences, Niles, USA) and 0.5 μ m thick sections were stained with toluidine blue and prepared for light microscopy in order to choose specific areas for transmission electron microscopy analysis. Ultrathin sections were obtained with a diamond knife and contrasted with 2% uranyl acetate for 30 min, followed by 2% lead citrate in 1 N sodium hydroxide solution for 10 min. The samples were observed and evaluated using a Tecnai Spirit transmission electron microscope (Fei Company, Oregon, USA), operating at 80 kV.

Immunohistochemistry

Sections of Paraplast embedded prostates (4 μ m) were collected on silanized glass. Antigen retrieval was achieved by heat-mediated for 20 min. After washing, the slides were blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min and then 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature. Slides were then incubated overnight at 4°C with monoclonal anti-Ki-67 antibody (1:100 in 1% BSA; clone MIB-5, Dako, Carpinteria, CA), polyclonal rabbit anti-androgen receptor or AR (1:400 in 1% BSA; sc816, Santa Cruz BiotechnologyTM, CA, USA), monoclonal mouse anti-human p63 protein (1:50 in 1% BSA; clone M7247, Dako, Carpinteria, CA), polyclonal rabbit anti-laminin (1:200 in 1% BSA; ab11575, abcam Inc., Cambridge, MA), monoclonal mouse anti- β -catenin (1:800 in BSA 1%; ab22656, Abcam, Cambridge, MA). After washing with PBS, the slides were incubated for 1 h at room temperature with goat anti-mouse IgG-HRP or goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (1:200 in 1% BSA; Santa Cruz Biotechnology, CA). Chromogen color was developed by incubation with 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, USA). Slides were then counterstained with hematoxylin. A negative control was performed by omitting the primary antibody incubation step.

Ki-67 index and p63 index

The proliferation index or Ki-67 index was determined by counting the number of Ki-67 positive epithelial cells in 10 microscopic fields (40 x magnification) visualized from 6 VP, 6 DP and 6 LP sections of 6 different animals of each experimental group. The results are expressed as a percentage of Ki-67 positive cells (number of labeled nuclei x 100/total cell number).

Approximately 6,000 cells were counted per experimental group. For p63 index, the sections immunostaining with p63 antibody was used. This antibody labels the p63 protein in the nuclei of basal or progenitor cells in the epithelia. Morphometric analysis was performed in the same way described for Ki-67 index. Image acquisition and quantitative measurements were performed by an investigator who had no prior knowledge of animal identity or experimental group.

In Situ Cell Apoptosis Detection by TUNEL Assay

The apoptosis detection was based on the assay of terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) of fragmented DNA. This was essentially performed using the kit FragEL™ DNA (Calbiochem®, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's directions. Briefly, paraffin sections were deparaffinized, rehydrated and immersed in TBS buffer. The slides were treated with Proteinase K (1:100 in 10 mM Tris-HCl pH 8.0) for tissue permeabilization, at room temperature for 20 min. Endogenous peroxidase was blocked for 5 min in 3% H₂O₂ in methanol. The sections were incubated in a reaction mixture containing TdT enzyme for 90 min at 37 °C. The detection of TUNEL positive cells was performed with DAB for 5 min. The specimens were counterstained with hematoxylin and mounted in Permount. Morphometric analysis (TUNEL index) was performed in the same way described for Ki-67 index.

Western Blotting Analysis

Frozen samples from VP and DP from each experimental group were mechanically homogenized using a Polytron homogenizer (Kinematica Inc.; Lucerne, Switzerland) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, plus 0.25% Triton-X 100 for 30 sec at 4°C and centrifuged. The protein was extracted from the supernatant and quantified using the Bradford assay [25]. A protein sample (70 µg) was loaded onto a 10% SDS-PAGE gel under reducing conditions. After electrophoresis, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Sigma Co. Saint Louis, MO, USA). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20 (TBS-T) for 2 h. The blotting was incubated at 4°C overnight with mouse primary antibodies against proliferation cellular nuclear antigen (PCNA) (PC-10, Cell Signaling technology), PAR-4 (sc1666, Santa Cruz Biotechnology™) or with rabbit polyclonal antibodies against AR (sc816, Santa Cruz Biotechnology™), estrogen receptor alpha or ERα (cloneE115, Millipore™), estrogen receptor beta or ERβ (ab3577, Abcam Inc., Cambridge, MA), and goat polyclonal anti-β-actin (sc1615, Santa Cruz Biotechnology™); all antibodies were diluted in 1% BSA to the manufacturer's recommended concentration (1:500, 1:500, 1:750, 1:300, 1:200 and 1:1000, respectively). The membranes were washed in

TBS-T and incubated for 2 h at room temperature with respective peroxidase-conjugated secondary antibodies. After washing in TBS-T, the membranes were visualized using a chemiluminescence substrate kit (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent; Thermo Scientific™) according to the manufacturer's instructions, and the ECL signals were captured using a CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®; GE Healthcare™). The integrated optical densities (IODs) of the targeted protein bands were measured using Image J, which was downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), to compare the protein levels. AR, PCNA and MT expression were normalized to the β -actin values for VP and to the GAPDH values for DP. The normalized data are expressed as the means $\pm$ SD.

Statistical Analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine whether differences existed between groups and the Tukey–Kramer multicomparison post-test was employed. A p-value of $p < 0.05$ was considered significant. The statistical tests were performed using InStat (version 3.0; Graph-Pad, Inc., San Diego, CA, USA). The histopathological incidence of separate prostatic lobes was analyzed by Chi-square and prostatitis scores were analyzed by ANOVA followed by Fischer's exact test with significance accepted at $p < 0.05$.

RESULTS

Body Weight and Prostatic Lobe Weight

RP and NP rats showed no significant differences in the body weight, however, after 17 weeks of steroid treatment, both NPH and RPH presented reduced body weight, in which was statistically significant for RPH group (Table I). The prostatic lobe weights also appeared no different between NP and RP groups. In contrast, the NPH group presented an significant increase of the VP and DLP weight compared with the other groups (Table I).

Serum Hormone Levels

Plasma T level was slightly reduced in RP and RPH groups compared with NP and NPH, respectively. DHT plasma level was slightly reduced in RP group in relation of NP group, but was significantly reduced in RPH in relation of NPH (Table I). On the other hand, both T and DHT plasma levels were very similar between NP and NPH and between RP and RPH. No difference were observed in the E plasma levels comparing NP to RP animals and comparing NPH to RPH, but the hormone-treated animals presented about four times more E levels than untreated animals, which is in agreement with the T+E model (Table I).

Morphological and Histopathological analysis

Structural aspects of VP from different experimental groups were presented in Figure 1. In general view, it was observed acini recovered by simple secretory epithelium, dilated lumen and surrounded by prostatic stroma in the VP from NP and RP groups, and in the most part of VP from NPH and RPH groups (Fig. 1A-D). The measurement of the epithelial height was lower in RP and RPH when compared to NP and NPH groups respectively (Table I). Histopathological examination showed focal alterations, such as areas of glandular acini lined by metaplastic epithelium in RP group (Fig. 1B), hypertrophic stroma and atrophic acini with epithelium containing clear cells with vacuolized cytoplasm and atypical nuclei in RPH groups (Fig. 1E). Dysplastic and hyperplastic epithelium showing atypical cells were observed in VP from NPH and RPH group (Fig. 1F-H). Prostatic intraepithelial neoplasia with cribriform, papillary and signet ring-cell patterns were frequently observed in both groups (Fig. 1I-M). Moreover, atypical small acinar proliferation (Fig. 1N) and large chronic inflammation areas (Fig. 1O-P) was frequently observed in VP from RPH animals. The incidence of these alterations was determined and is shown in Table II. It was observed a higher incidence of hyperplasia and prostatitis in VP from RP in relation to NP group and higher incidence of metaplasia and PIN in RPH in relation to NPH group (Table II).

Examining the structural aspects of the DP, it was observed slight folded acini surrounded by a prostatic stroma in all experimental groups (Fig. 2A-D). However, in some areas of DP from RPH group presented atrophic glandular acini and hypertrophic stroma (Fig. 2D). Evaluating epithelial cell height, only epithelial cells of the DP from RPH group was lower than of the NPH group (Table I), while there was no difference between NP and RP groups. Histopathological examination showed slight alterations in the animals treated by T+E. Some of them were focal areas of atypical epithelial cells (Fig. 2E), epithelial hyperplasia (Fig. 2F-G), rare areas with PIN (Fig. 2H) and a lot of acini with epithelial cell shedding toward lumen (Fig. 2I-J). It was observed a low incidence of prostatitis, metaplasia, epithelial hyperplasia and PIN in this lobe and showed no significant differences between groups (Table II).

Morphological examination of LP showed similar glandular organization between groups. In general view, it was observed acini structures with dilated lumen, lined by regular tall columnar epithelium and surrounded by prostatic stroma (Fig. 3A-D). However, after hormone exposure, LP from RPH group was the most affected gland showing many areas containing atrophic acini with reduced lumen, epithelial disorganization, hypertrophic and hyperplastic stroma (Fig. 3D). Evaluating epithelial height, there was no statistical difference between groups (Table I). Histopathological examination showed different degree of alterations, such as hyperplasia (Fig. 3F), PIN (Fig. 3G), epithelial cells with many eosinophilic granules in the

cytoplasm (Fig. 3H-I), disorganized and atrophic epithelium containing atypical enlarged and clear cytoplasm (Fig. 3J) or migrant inflammatory cells (Fig. 3K) in the NPH (not shown) and RPH group. Moreover, inflammatory infiltrated causing glandular epithelium disorganization and chronic prostatitis showing inflammatory cells in nodular arrangement (Fig. 3L). The incidence of these alterations was presented in Table II. Note higher incidence of prostatitis and epithelial hyperplasia in LP from RPH in relation to NPH group.

Quantitative analysis of prostatitis score and PIN multiplicity (mean number of PIN foci per prostatic lobe from NPH and RPH groups) was showed in Figure 4. There was no difference of these parameters in VP, DP, LP from NP and RP groups and DP from NPH and RPH groups (data not shown). In despite of the incidence of prostatitis was slightly higher in VP and LP from RPH group, the most significant difference appeared after considering histological grading score (Fig. 4A) and histological aggressiveness score (Fig. 4B). PIN multiplicity analysis showed that VP and LP from RPH group presented about twice more PIN foci than NPH prostatic lobes (Fig. 4C).

To verify the presence of adenocarcinoma (CaP), it was performed immunohistochemical reaction for β -catenin, laminin (Fig. 5) and p63 (Fig. 6). It was observed positive immunostaining for β -catenin in the lateral membrane of epithelial cells of the prostatic lobes from all experimental groups, even at the PIN focus (Fig. 5A-C.). The laminin immunohistochemistry also showed an intense and continuous staining below epithelium in all areas of the prostatic lobes (Fig. 5D-F). In the same way, p63 immunostaining also detected the constant presence o basal cell in all prostatic lobes, in which seemed to be more frequent in the RPH group (Fig. 6). These results are consistent with absence of adenocarcinomas in all prostatic lobes of this study.

In all experimental groups, androgen receptor (AR) immunostaining was detected in the nuclei from columnar epithelial cells of the three prostatic lobes (Fig. 7). Apparently, the AR immunostaining was less intense in the nuclei of prostatic epithelial cells from VP and LP of RP group (Fig. 7A-J). The VP, DP and LP from NPH showed a higher density of AR-positive cells in the epithelium compared with RPH group (Fig. 7C-L). Furthermore, the epithelial cells from dysplastic areas were also AR-positive (Fig. 7D).

Ultrastructural analysis

The ultrastructural analysis was presented in Figure 8. The secretory epithelium from VP from NP group showed tall columnar cells with basal nuclei, secretory vesicles in the cellular cytoplasm and microvilli in the apical membrane (Fig. 8A-B). It was also observed a developed Golgi complex and flattened rough endoplasmic reticulum cisternae in the supranuclear and perinuclear areas (Fig. 8C-D). In VP from RP group was frequently observed atrophied secretory epithelium with cuboidal cells and irregular cytoplasmic projections in the basal region

(Fig. 8E-F). Interestingly, even in this atrophic epithelium, it was observed secretory vesicles, synthetic organelles inside of the cells and presence of the basal cells. In VP from NPH group was common to observe atypical areas with dilated RER cisterns and the presence of the lysosomes (Fig. 8G). Some epithelial cells presented many lipid droplets and dilated vacuoles in the cellular cytoplasm (Fig. 8H). These alterations were also observed in VP from RPH group. However, in this group, the most of prostatic epithelial cells exhibited great amount of dilated vacuoles, which in some cells they are around nuclei or compressing the nuclei (Fig. 8I-J). In other cells they appear to be coalesced forming a single large vacuole resembling signet ring-cell and cribriform PIN pattern.

The mainly characteristics of the secretory epithelium of the DP from NP group was columnar epithelial cells with a well-developed system of granular endoplasmic reticulum consisting of both flattened and dilated cisterns, a well-developed Golgi complex, many mitochondria and secretory vesicles (Fig. 8M). Despite of DP from the other groups have presented similar ultrastructural features, there were some particularities. For example, in RP group, it was frequently observed lysosomes vesicles associated to autophagic vacuoles beside nuclei (Fig. 8N). In NPH and RPH groups, there were observed many areas of altered epithelium exhibiting disorganized and dilated rough endoplasmic reticulum cisternae (Fig. 8O-P).

Epithelial Cell indexes

The p63 immunostaining has been detected in the nuclei of the VP, DP and LP epithelium from different experimental groups (Fig. 6). The measurement of positively stained basal cells nuclei showed no difference in basal cell index of VP or DLP between RP and NP group. However, after hormone exposure, the VP and LP from RPH exhibited twice more basal cells than NPH group (Table I).

The Figure 9 represents the Ki-67 immunostaining that has been detected in the nuclei of the VP, DP and LP epithelium from different experimental groups. No positive staining was observed in the negative control (data not shown). In despite a great number of Ki-67 positive nuclei after hormone exposure, mainly in the areas committed by PIN, ASAP and hyperplasia, quantitative analysis showed no difference in the proliferation index between groups NP and RP or between NPH and RPH (Table I).

The Figure 10 shows the typical morphology of apoptotic cells stained for TUNEL reaction found in the epithelium from the VP, DP and LP. Quantitative analyses showed that apoptotic or TUNEL index of epithelial cells were similar between NP and RP or NPH and RPH groups. However, after hormone exposure this index was about twice higher in DP and three times higher in LP in both groups when compared to NP and RP groups respectively (Table I).

Western blotting

The expression of AR, ER α , ER β , PCNA and PAR-4 in the VP and DP tissue from the different experimental groups was evaluated by western blotting (Fig. 11A). The western blotting results confirmed the decreased expression of AR in the VP and DP (Fig. 11B) from RP group compared to NP group, but this difference disappeared after hormone exposure. There was no difference in ER α (Fig. 11C) and ER β (Fig. 11D) between experimental groups when compared RP and NP or NPH and RPH groups. The prostatic lobe expression of PAR-4 (Fig. 11E) was not different between experimental groups, confirming the results obtained by TUNEL index. The analysis of PCNA protein tissue expression showed that this cell proliferation marker was increased only in VP of RPH group compared to NPH group (Fig. 11F).

DISCUSSION

Maternal nutritional status has been proposed to be the major programming influence on the developing fetus. This prenatal influence on non-communicable disease in later life has been termed fetal programming or imprinting. The validity of this concept is highly dependent on experimental studies in animals. The feeding of low-protein diets in rat pregnancy results in perturbations in fetal growth, metabolic and physiological disturbances of the fetus. In this sense, this model has been used to explore potential mechanisms of programming through which maternal diet may be a factor determining in cardiovascular disease and metabolic syndrome risk [13,26]. Moreover, gestational protein restriction can lead a high maternal estrogen [1], corticosteroids [27] and testosterone levels [26]. These condition associated with placental activity impaired, apparently in a paradoxical manner, allows these hormones to reach the fetus and impaired male sexual development and function [1,8,28], have shown that MPM decreased fertility rate and also reduces the serum concentrations of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone in male offspring [1]. Previous studies have demonstrated that MPM delays prostate development, growth and maturation until adulthood [29,30].

The present experiment analyze if MPM alters the male prostate lesions susceptibility when exposed to testosterone and estradiol in the adult age. Combined exposure to T+E is able to drive 25-45% PIN lesions in the separate prostate lobes of Sprague-Dawley rats following 16 week in adulthood [31,32]. In most other studies, silastic tubing implants were used for hormone delivery [33-35]. In contrast, we used commercially available slow-release hormone pellets in an attempt to ensure constant hormone release in order to make the model more uniform and reproducible. Silastic implants, if not carefully used and standardized, may lead to highly variable hormone release rates. For example, testosterone propionate is released from

such implants much faster than crystalline testosterone, resulting in very high initial serum concentrations and much lower levels after several weeks. In our study, the implants have kept the physiological levels of androgens (T and DHT) associated with a higher level of estradiol, almost four times higher than control levels as proposed by Prins et al. [18].

In this estrogenic condition, the male offspring from MPM presented the higher incidence of cellular dysplasia, prostatitis and prostatic intraepithelial neoplasia than control animals after combined exposure to T+E. The reason for this difference remains to be determined, however some altered parameters point to the existence of fetal/developmental programming or fetal hormonal imprinting. For example, lower prostate weight, reduced protein expression of androgen receptor, decreased plasma androgen levels and higher basal cells index in these animals. The highest incidence of prostatitis and PIN lesions in programmed male offspring after hormone exposure are relevant findings in this experimental model. PIN lesions have a recognized potential to progress to prostate cancer [36] and inflammation can also influence the appearance of prostatic carcinoma [37]. Chronic inflammation cause cell damage, promote cell replacement and create a microenvironment in tissue rich in cytokines and growth factors increasing cell replication, angiogenesis, tissue repair and thus influencing the onset of prostate cancer [38,39]. Furthermore, the presence of atypical small acinar proliferation (ASAP) associated PIN is usually correlated to subsequent cancer diagnosis [40].

The hormonal control of normal and abnormal prostate development and growth is complex and dependent on the ratio of androgen: estrogen, besides the epithelial-stromal interaction. The pathways involved in this process are not fully understood, but depend on a predominant action of androgens for phenotypic stability and secretory activity of the prostatic epithelium [32]. Studies have shown reduced level of androgen in male offspring from MPM [1,30], which was confirmed by our study. Notably, in our study we also have shown that even when testosterone supplementation has done through hormone implants, this hormonal difference can not be mitigated or reversed. This suggests that other mechanisms may have been triggered, such as aromatase, 5- α -reductase activities or others enzymes involved in the metabolism of steroids. Studies on aromatase or 5- α -reductase activities in male offspring from this model of malnutrition have not been performed yet and will be the subject of future investigations in our laboratory.

Sex steroid hormone exposure during development, particularly the estrogens, can reprogram the prostate leading to reduced androgen receptors expression [14] and impaired prostate growth and development [11]. Other effects described for perinatal estrogen exposure are reduced glandular weight, altered proportion between prostatic compartments [41] increase in the number of basal cells [15] and defect differentiation of prostatic epithelia of adult rats, predisposing to an inflammation, dysplasia and neoplasia [11,42,43], as observed in our experiment. It occurs because estrogen has a direct action on the epithelium via ER-beta or a

paracrine action via ER-alpha from stromal cells, which explains the thickening of the stroma and epithelial changes [44]. In our study, no difference was observed in the tissue expression of ERs between experimental groups. However, the high concentrations of serum estrogen levels, in both experimental groups, have induced the formation of a particular microenvironment within the prostate leading changes in epithelial cell morphology and function as observed by the first time at ultrastructural levels, such as a progressive vacuolization of the cytoplasm and formation of signet ring-cell and cribriform patterns.

CONCLUSION

The findings of this study support the idea that fetal programming by gestational protein malnutrition alters prostate response to sex hormones and also interferes in adult prostate susceptibility to diseases, which was evident upon exposure to T+E in adulthood. These findings on prostate health are directly relevant to humans at current MPM or hormone exposure in adult life.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by São Paulo Research Foundation, grants nº09/50204-6 and 09/52747-7. This article represents part of the PhD thesis developed by JCR to the Institute of Biosciences (UNESP), Brazil.

REFERENCES

1. Zambrano E, Rodriguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005;563:275-284.
2. Robinson JJ, Sinclair KD, McEvoy TG. Nutritional effects on fetal growth. *Anim Sci* 1999;68:315-331.
3. Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res* 2006;65(3):50-58.
4. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental and epigenetic pathways to obesity: an evolutionary-developmental perspective. *Int J Obes* 2008;32(7):62-71.
5. Langley-Evans S. Fetal growth markers may show nutritionally mediated effect. *BMJ* 2001;7(323):52.
6. Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol* 2006;572:97-108.

-
7. Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz PW. Prenatal origins of adult disease. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:132-138.
 8. Fernandez-Twinn DS, Ekizoglou S, Gusterson BA, Luan JA, Ozanne SE. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogenesis* 2007;28(3):545-552.
 9. Thomson AB, Anderson RA, Irvine DS, Kelnar CJ, Sharpe RM, Wallace WH. Investigation of suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis to restore spermatogenesis in azoospermic men treated for childhood cancer. *Hum Reprod* 2002;17(7):1715-1723.
 10. Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol* 2003;253:165-174.
 11. Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures predispose to prostate and carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol* 2007;23(3):374-382.
 12. Vicente LL, Moura EG, Lisboa PC, Costa AMA, Amadeu T, Mandarim-de-Lacerda CA, Passos MCF. Malnutrition during lactation is associated with higher expression of leptin receptor in pituitary of the adult offspring. *Nutrition* 2004;20:924-928.
 13. Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010;19(2):87-98.
 14. Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland. *Biol Reprod* 2001;65:1496-1505.
 15. Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Tebeau C, Putz O, Bieberich C. Influence of neonatal estrogens on rat prostate development. *Reprod Fertil Dev* 2001;13(4):241-252.
 16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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-76 rodent diet. *J Nut* 1993;123:1939-1951.
 17. Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated. *Fertil Steril* 2008;89:41.
 18. Prins GS, Ye SH, Birch L, Ho SM, Kannan K. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol* 2011;31(1):1-9.
 19. Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. *Prostate* 1996;28:124-28.
 20. Bostwick DG, Cheng L. Precursors of prostate cancer. *Histopathology* 2012;60(1):4-27.
 21. Bostwick, DG. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia: The most likely precursor of prostate cancer. *Cancer* 1995;75:1823-1836.

-
22. Sciarra A, Di Silverio F, Salciccia S. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link. *Eur Urol* 2007;52:964-972.
 23. Graham RC Jr, Karnovsky MJ. The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by coupled peroxidatic oxidation. *J Histochem Cytochem* 1965;13(7):604-605.
 24. Cota-Pereira G, Rodrigo FG, David-Ferreira JF. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. *Stain Technol* 1976;51:7-11.
 25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
 26. Gao H, Yallampalli U, Yallampalli C. Gestational protein restriction reduces expression of Hsd17b2 in rat placental labyrinth. *Biol Reprod* 2012;87(3):68.
 27. Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res* 2009;72(5):257-265.
 28. Gardner DS, Ozanne SE, Sinclair KD. Effect of the early-life nutritional environment on fecundity and fertility of mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:3419–3427.
 29. Ramos C da F, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJ. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl* 2010;12:180-185.
 30. Rinaldi JC, Justulin LA Jr, Lacorte LM, Sarobo C, Boer PA, Scarano WR, Felisbino SL. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Science* 2013; *in press*.
 31. Bosland MC, Ford H, Horton L. Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17 beta or diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 1995;16(6):1311-1317.
 32. Ho SM, Leung YK, Chung I. Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:177-193.
 33. Ofner P, Bosland MC, Vena RL. Differential effects of diethylstilbestrol and estradiol-17 beta in combination with testosterone on rat prostate lobes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;112(2):300–309.
 34. Lane KE, Ricci MJ, Ho SM. Effect of combined testosterone and estradiol-17 beta treatment on the metabolism of E2 in the prostate and liver of noble rats. *Prostate* 1997;30(4):256–262.
 35. Wang YZ, Wong YC. Sex hormone-induced prostatic carcinogenesis in the noble rat: The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of prostate cancer. *Prostate* 1998;35(3):165–177.
 36. Prins GS, Huang L, Birch L, Pu Y. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:1–13.
 37. Migliore L, Coppedè F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 2002;512(2-3):135-153.

-
38. Gilleran JP, Putz O, DeJong M, DeJong S, Birch L, Pu Y, Huang L, Prins GS. The role of prolactin in the prostatic inflammatory response to neonatal estrogen. *Endocrinology* 2003;144(5):2046-2054.
 39. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, Neson WG. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis* 2004;26:1170-1181.
 40. Brausi M, Castagnetti G, Dotti A, De Luca G, Olmi R, Cesinero AM. Immediate radical prostatectomy in patients with atypical small acinar proliferation. Over treatment? *J Urol* 2004;172(3):906-909.
 41. Arai Y, Suzuki Y, Nishizuka Y. Hyperplastic and metaplastic lesions in the reproductive tract of male rats induced by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1977;376(1):21-28.
 42. Santti R, Newbold RR, Mäkelä S, Pylkkänen L, McLachlan JA. Developmental estrogenization and prostatic neoplasia. *Prostate* 1994;24(2):67-78.
 43. Augusto TM, Felisbino SL, Carvalho HF. Prostatic remodeling after castration involves heparanase activation. *Cell Tissue Res* 2008;2:307-315.
 44. Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* 2008;73(3):233-244.

Table I. Quantitative analysis of the different parameters from animals and prostates.

Parameters	Experimental Groups			
	NP	RP	NPH	RPH
Body Weight (g) (n = 12)	519.71 ± 35.62 ^a	496.91 ± 32.96 ^{ab}	435.73 ± 31.74 ^b	375.35 ± 27.71 ^c
Hormone plasma levels (n = 12)				
Testosterone (ng/dL)	295.5 ± 27.3 ^a	193.2 ± 23.6 ^b	307.7 ± 48.9 ^a	221.2 ± 32.5 ^b
Dihydrotestosterone (ng/dL)	29.2 ± 2.3 ^a	22.4 ± 1.8 ^b	32.5 ± 5.6 ^a	17.7 ± 2.4 ^b
Estradiol (pg/mL)	10.7 ± 2.1 ^a	12.8 ± 2.3 ^a	49.8 ± 6.4 ^b	55.2 ± 9.6 ^b
Ventral Prostate (n = 6)				
Absolute weight (g)	0.54 ± 0.08 ^{ab}	0.50 ± 0.07 ^{ab}	0.69 ± 0.11 ^a	0.43 ± 0.10 ^b
Relative weight [†]	0.11 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.06 ^b	0.10 ± 0.01 ^a
Epithelial height (μm)	23.86 ± 0.61 ^a	18.13 ± 0.74 ^b	23.05 ± 0.87 ^a	16.31 ± 0.93 ^b
Basal cells index (%)	11.49 ± 1.79 ^a	15.69 ± 2.32 ^a	12.73 ± 2.82 ^a	23.61 ± 5.81 ^b
Epithelial cells proliferation index (%)	1.27 ± 0.09 ^a	1.76 ± 0.07 ^a	2.05 ± 0.08 ^{ab}	2.97 ± 0.05 ^b
TUNEL index (%)	1.84 ± 0.08	1.98 ± 0.09	2.16 ± 0.09	2.01 ± 0.12
Dorsolateral Prostate (n = 6)				
DLP absolute weight (g)	0.48 ± 0.08 ^a	0.45 ± 0.09 ^a	0.81 ± 0.10 ^b	0.54 ± 0.09 ^a
DLP relative weight [†]	0.09 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.05 ^b	0.11 ± 0.02 ^a
DP Epithelial height (μm)	18.44 ± 0.61 ^{ab}	17.64 ± 0.74 ^{ab}	21.96 ± 0.87 ^a	16,57 ± 0,93 ^b
DP Basal cells index (%)	10.62 ± 1.92	12.23 ± 2.01	13.31 ± 1.95	12,82 ± 2,92
DP Epithelial cells proliferation index (%)	0.85 ± 0.04 ^a	0.97 ± 0.06 ^a	2.03 ± 0.14 ^b	1,96 ± 0,07 ^b
DP TUNEL index (%)	0.79 ± 0.01	0.93 ± 0.09	1.93 ± 0.61	1,63 ± 0,22
LP Epithelial height (μm)	16.26 ± 0.93	15.13 ± 0.34	17.29 ± 0.81	16,42± 0,89
LP Basal cells index (%)	9.09 ± 1.72 ^a	10.42 ± 1.27 ^a	12.57 ± 1.81 ^a	22,73 ± 3,01 ^b
LP Epithelial cells proliferation index (%)	0.81 ± 0.05 ^a	0.84 ± 0.06 ^a	1.97 ± 0.09 ^b	1,98 ± 0,08 ^b
LP TUNEL index (%)	0.65 ± 0.01 ^a	0.75 ± 0.08 ^a	2.03 ± 0.19 ^b	2,02 ± 0,23 ^b

Values are expressed as mean ± SD. Values without a common letter differ $p < 0.05$. [†]relative weight prostate is the ratio between the weight prostate and body weight. NP, control diet group; RP, restrict-protein diet group; NPH, NP animals exposed to T+E; RPH, RP animals exposed to T+E; PND, post-natal day; VP, ventral prostate; DLP, dorsolateral prostate; DP, dorsal prostate; LP, lateral prostate.

Table II. Incidence of prostatic lesions in Wistar rats of 34 weeks-old.

Lesions (%)	Experimental Groups (N=12 animals/group)			
	NP	RP	NPH	RPH
Ventral Prostate				
Prostatitis	8	33	25	58
Metaplasia	17 ^a	42 ^a	58 ^a	100 ^b
Epithelial hyperplasia	17 ^a	42 ^a	58 ^a	92 ^b
PIN – prostatic intraepithelial neoplasia	0	0	42 ^a	83 ^b
ASAP - atypical small acinar proliferation	0	0	8	33
Dorsal Prostate				
Prostatitis	0	0	17	25
Metaplasia	0	0	8	17
Epithelial hyperplasia	0	8	25	33
PIN – prostatic intraepithelial neoplasia	0	0	8	8
ASAP - atypical small acinar proliferation	0	0	0	0
Lateral Prostate				
Prostatitis	17 ^a	50 ^b	42 ^{ab}	100 ^c
Metaplasia	17	17	33	42
Epithelial hyperplasia	25 ^a	42 ^a	50 ^a	92 ^b
PIN – prostatic intraepithelial neoplasia	0	0	42	75
ASAP - atypical small acinar proliferation	0	0	8	17

NP, control group; RP, restrict-protein diet group; NPH, NP animals exposed to T+E; RPH, RP animals exposed to T+E. Values are expressed as percentage. Values without a common letter differ $p < 0.05$.

Figure 1. Histological sections of the ventral (VP) prostatic lobes from control or NP group (A), maternal restrict-protein diet or RP group (B), NP animals after T+E exposure or NPH group (C,F,I,M) and RP animals after T+E exposure or RPH group (D-E,G-H,J-L,N-P) stained with hematoxylin-eosin. **(A)** Acini structures with large lumen (L) lined by regular tall columnar epithelium (Ep) and surrounded by a thick stroma (S). Focus on a clear supranuclear area corresponding to the Golgi complex (GC) is observed. **(B-D)** Glandular acini exhibited similar morphological aspects to NP group. Detail in (B) showing a metaplastic epithelium (arrows) next to a normal epithelium. Note in (D) reduced unfolding and atrophic epithelium presenting several cells with clear cytoplasmic vacuole (v). **(E)** Atrophic acini with dysplastic epithelium and hypertrophic stroma (S). Detail of vacuolized cells (v). **(F-H)** Detail of dysplastic epithelium showing atypical cells (arrows) with vacuoles inside the cytoplasm. sm, smooth muscle cells; bv, blood vessels. **(I-M)** Focal prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) with cribriform (I-J), papillary (K) and signet ring-cell patterns (L-M). Epithelial cells crowding, stratification and enlarged nuclei with variable size and shape confirmed the diagnostic; L, lumen. **(N)** Atypical small acinar proliferation (ASAP) and epithelial hyperplasia (Hp). Arrows are showing microacini. **(O)** Stromal inflammatory cell infiltration (#) and proliferative reaction (arrows) in the epithelium (Ep). bv, blood vessels. **(P)** Inflammatory cells in nodular arrangement (*) besides blood vessels (bv). Scale bars: A-E = 200 μ m; inset (A-B) = 50 μ m; F-H = 25 μ m; I-M = 50 μ m; N-O = 100 μ m; P = 300 μ m.

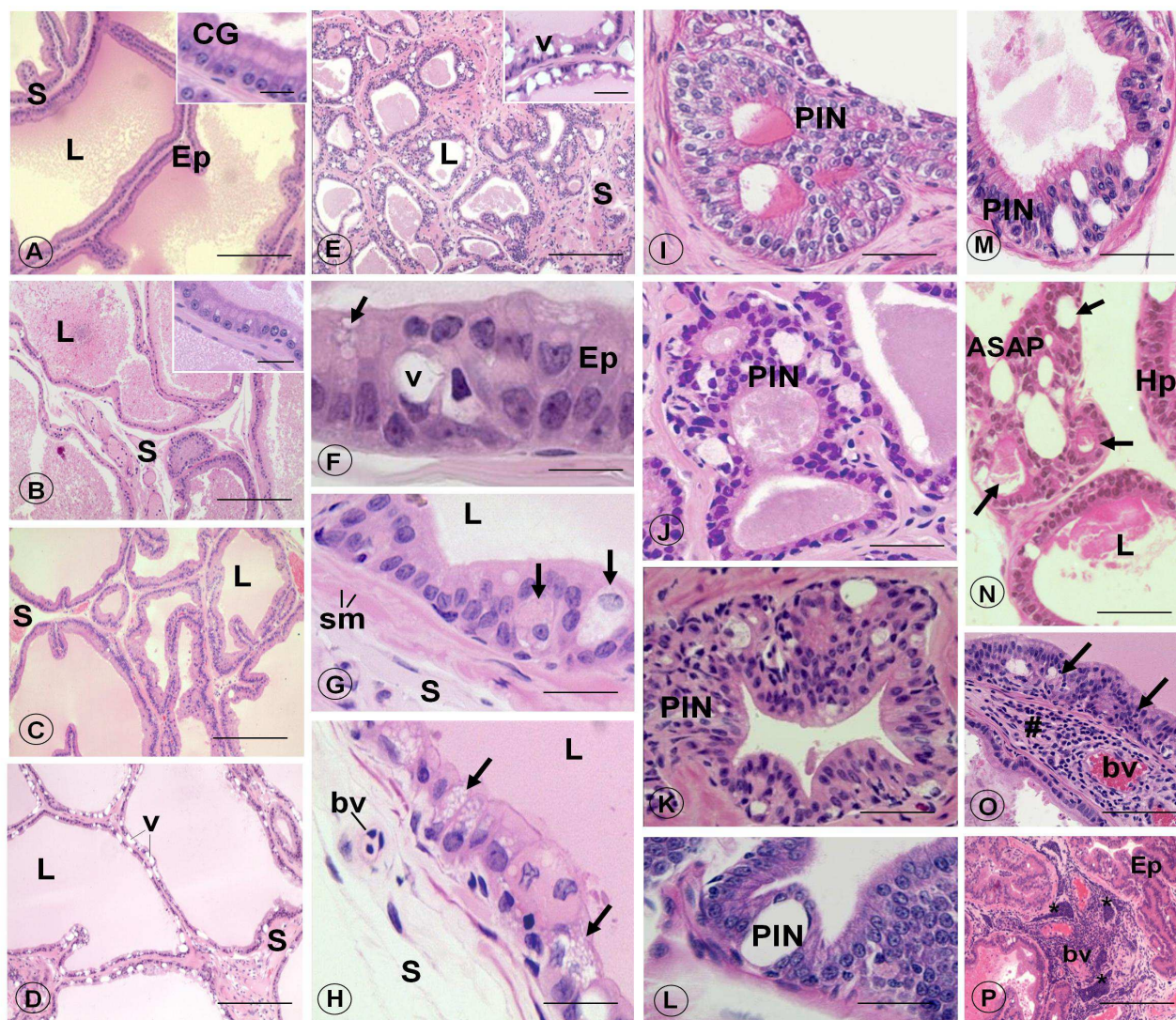


Figure 2. Histological sections of the dorsal (DP) prostatic lobes from control or NP group (A), maternal restrict-protein diet or RP group (B), NP animals after T+E exposure or NPH group (C,G) and RP animals after T+E exposure or RPH group (D-F,H-J) stained with hematoxylin-eosin. **(A)** DP showing folded prostatic acini surrounded by a thick stroma (S). Note detached epithelial cells (*) inside the lumen (L). **(B-D)** Glandular structure presenting similar morphological aspects to NP group. Note a great amount of detached epithelial cells (*) inside the lumen (L) in (C) and atrophic acini with reduced lumen (L) surrounded by a hypertrophic stroma (S) in (D). **(E)** Focus on epithelial cells with atypical phenotype (arrows). **(F-G)** Detail of focal epithelial hyperplasia (Hp) characterized by crowding cells and stratification. The cytoplasm presented plenty of clear vesicles (arrows). **(H)** Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) showing epithelial cells crowding, stratification and enlarged nuclei with variable size and shape. **(I)** Acini with lumen filled out by detached epithelial cells. **(J)** Detail of epithelial cell shedding toward lumen (*) from folded epithelium (arrowheads). Stroma with smooth muscle cells (sm) surrounding the glandular acini. Scale bars: A-D,I = 200 μ m; inset (A-D) = 50 μ m; E-H,J = 25 μ m.

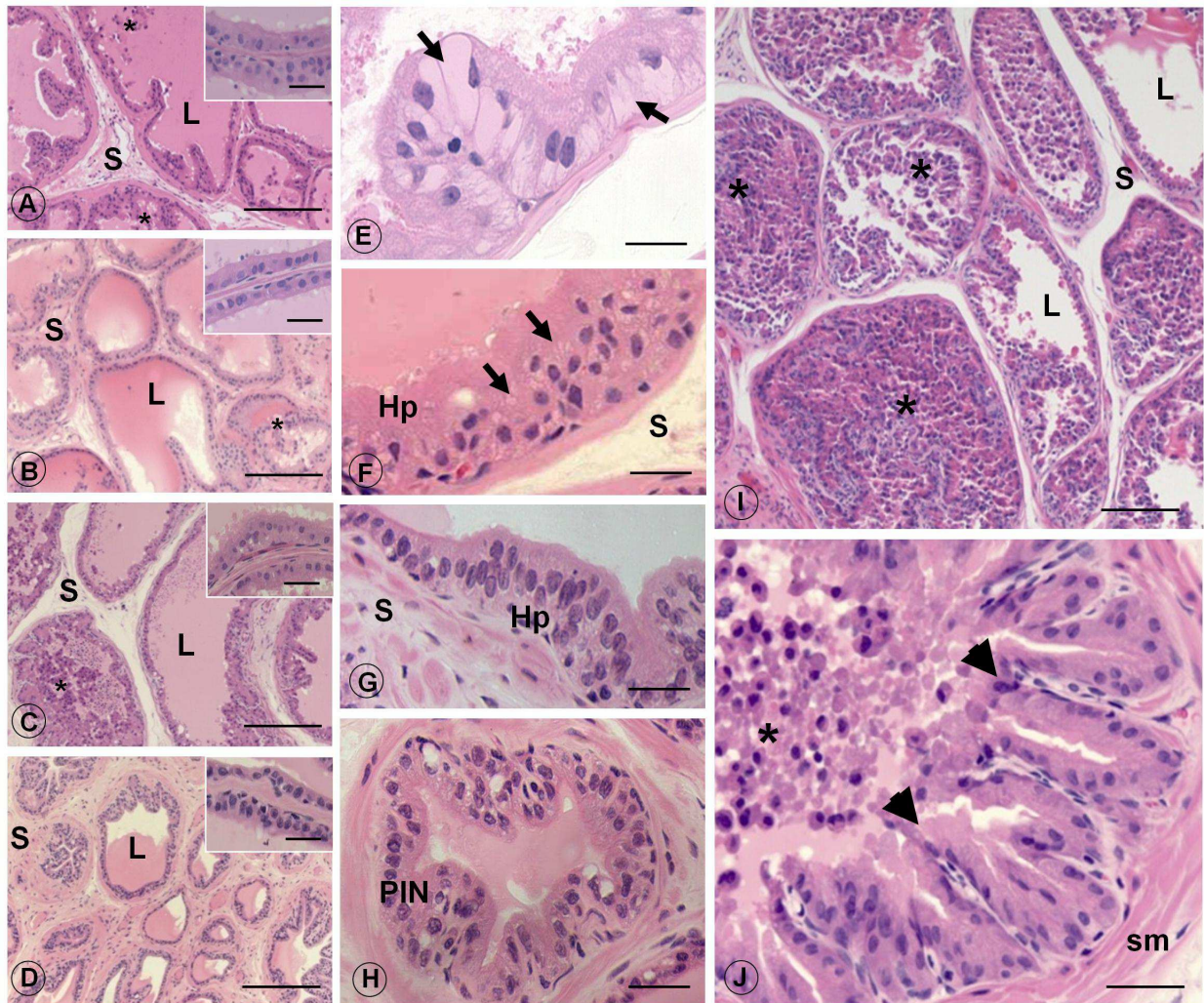
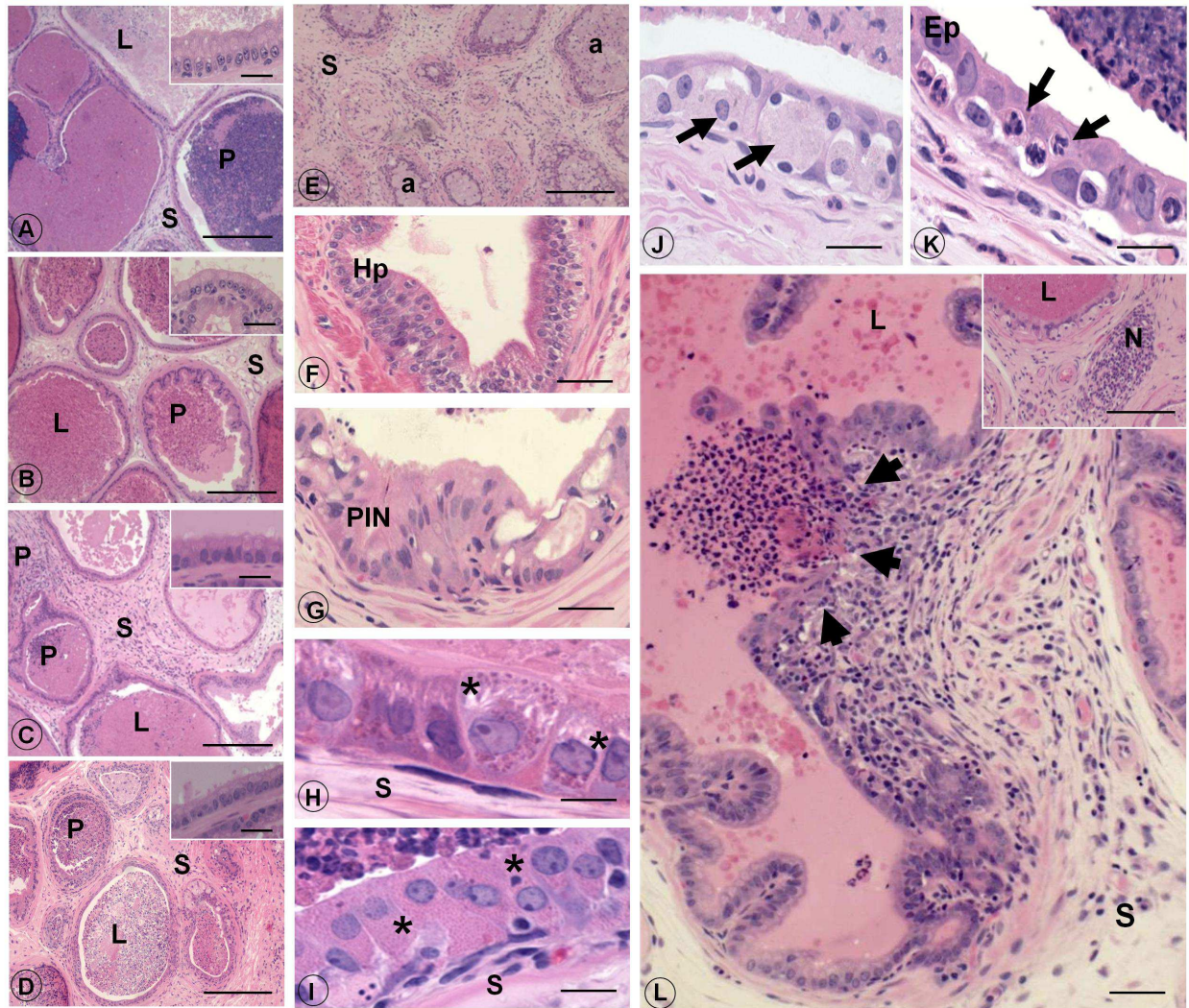


Figure 3. Histological sections of the lateral (LP) prostatic lobes from control or NP group (A), maternal restrict-protein diet or RP group (B), NP animals after T+E exposure or NPH group (C) and RP animals after T+E exposure or RPH group (D-L) stained with hematoxylin-eosin. **(A)** The acini structures showing prostatitis (P) inside the lumen (L). **(B-D)** Glandular structure presenting similar morphological aspects to NP group. Note intense inflammatory reaction (P); L, lumen; S, stroma. **(E)** LP showing epithelium disorganization, atrophic acini (a), hypertrophic and hyperplastic stroma (S). **(F)** Focal epithelial hyperplasia (Hp) characterized by crowding cells and stratification. **(G)** Focal prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) showing epithelial cells crowding, stratification and enlarged nuclei with variable size and shape. **(H-I)** Epithelial cells showing many eosinophilic granules in their cytoplasm (*). **(J)** Epithelial cells with atypical phenotype (arrows). **(K)** Disorganized and atrophic epithelium (Ep) containing migrant inflammatory cells (arrows). **(L)** Inflammatory infiltrated causing glandular epithelium disorganization (arrowheads) and stroma hypertrophy (S). Detail showing inflammatory cells with nodular arrangement (N). Scale bars: A-E = 200 μ m; inset (A-D) = 50 μ m; F-G,L = 50 μ m; H-K = 25 μ m.



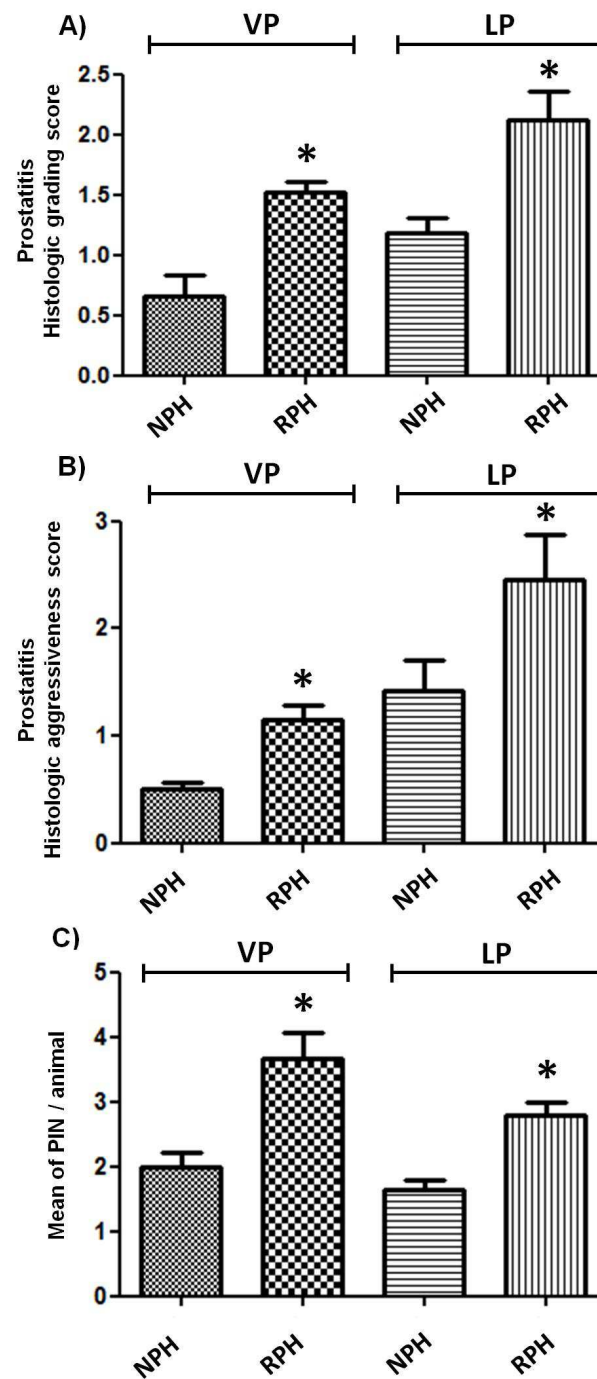


Figure 4. Histopathological analysis of prostatitis score and prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) multiplicity in the ventral (VP) and lateral (LP) prostatic lobes from NPH and RPH groups. **(A,B)** Prostatitis analysis considering **(A)** histological grading score and **(B)** histological aggressiveness score of prostatic inflammation. **(C)** PIN multiplicity analysis: mean number of PIN foci per prostatic lobe from both NPH and RPH groups. Values are expressed as mean $\pm$ SD. *denotes $p < 0.05$.

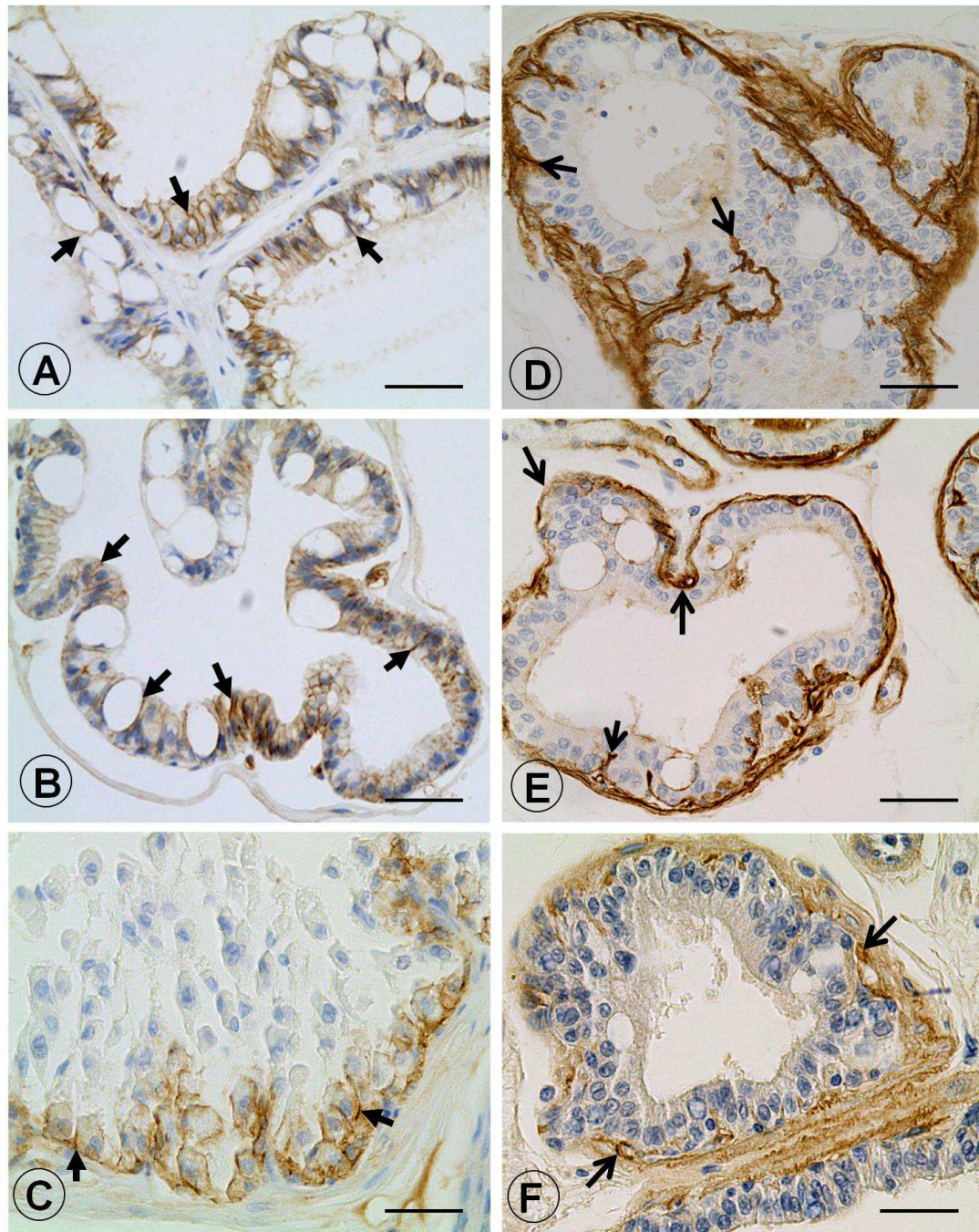


Figure 5. Representative sections of ventral (A,B,D,E), dorsal (C) and lateral (F) prostatic lobes from RPH group submitted to the immunohistochemistry for β -catenin (A-C) and laminin (D-F). **(A-C)** Note immunostaining for β -catenin on lateral membrane between epithelium cells (arrows) even in disorganized epithelial layer. **(D-F)** Note immunostaining for laminin showing continuous staining under epithelium cells (arrows). Scale bars = 25 μ m.

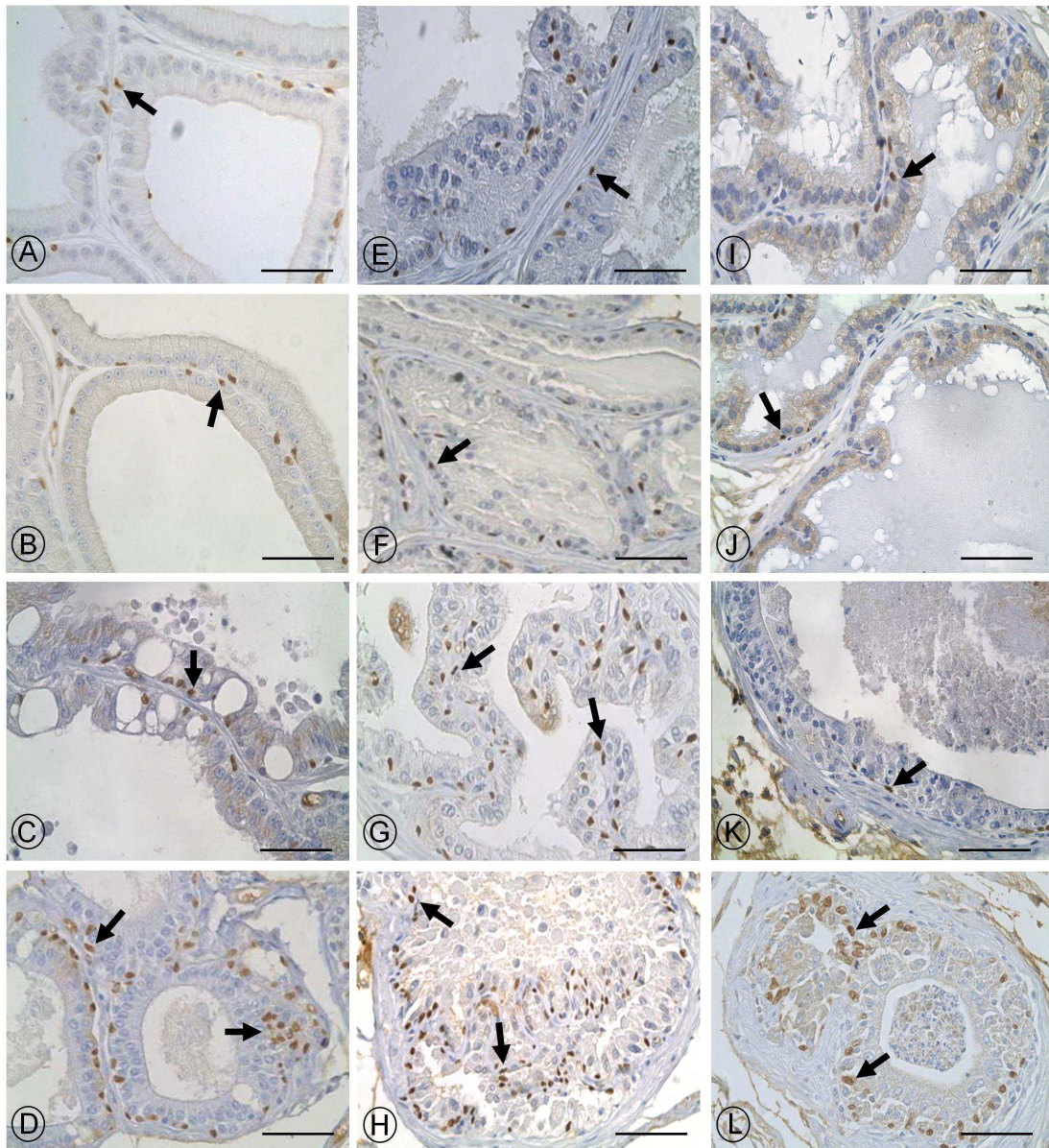


Figure 6. Representative images of immunohistochemistry reaction for p63 in the ventral (A-D), dorsal (E-H) and lateral (I-L) prostatic lobes from control or NP group (A,E,I), maternal restrict-protein diet or RP group (B,F,J), NP animals after T+E exposure (C,G,K) and RP animals after T+E exposure (D,H,L) in adult life. The arrows show positively stained basal cells nuclei that were used to determine the basal cells index. Note great number of basal cells in VP, DP and LP in RPH groups. This reaction was also useful to distinguish prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to malignant conditions of the prostate. Scale bars = 50 μ m.

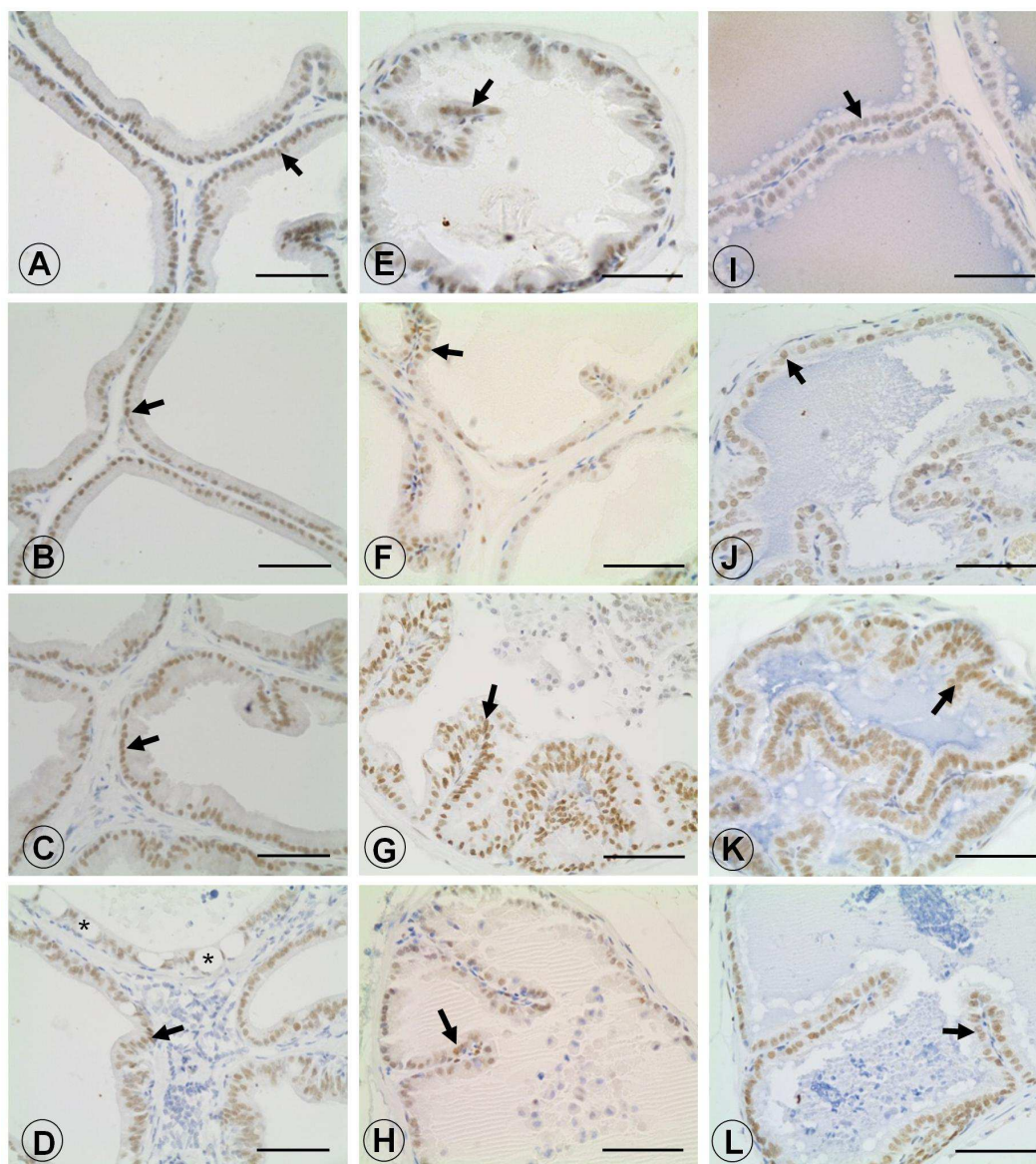
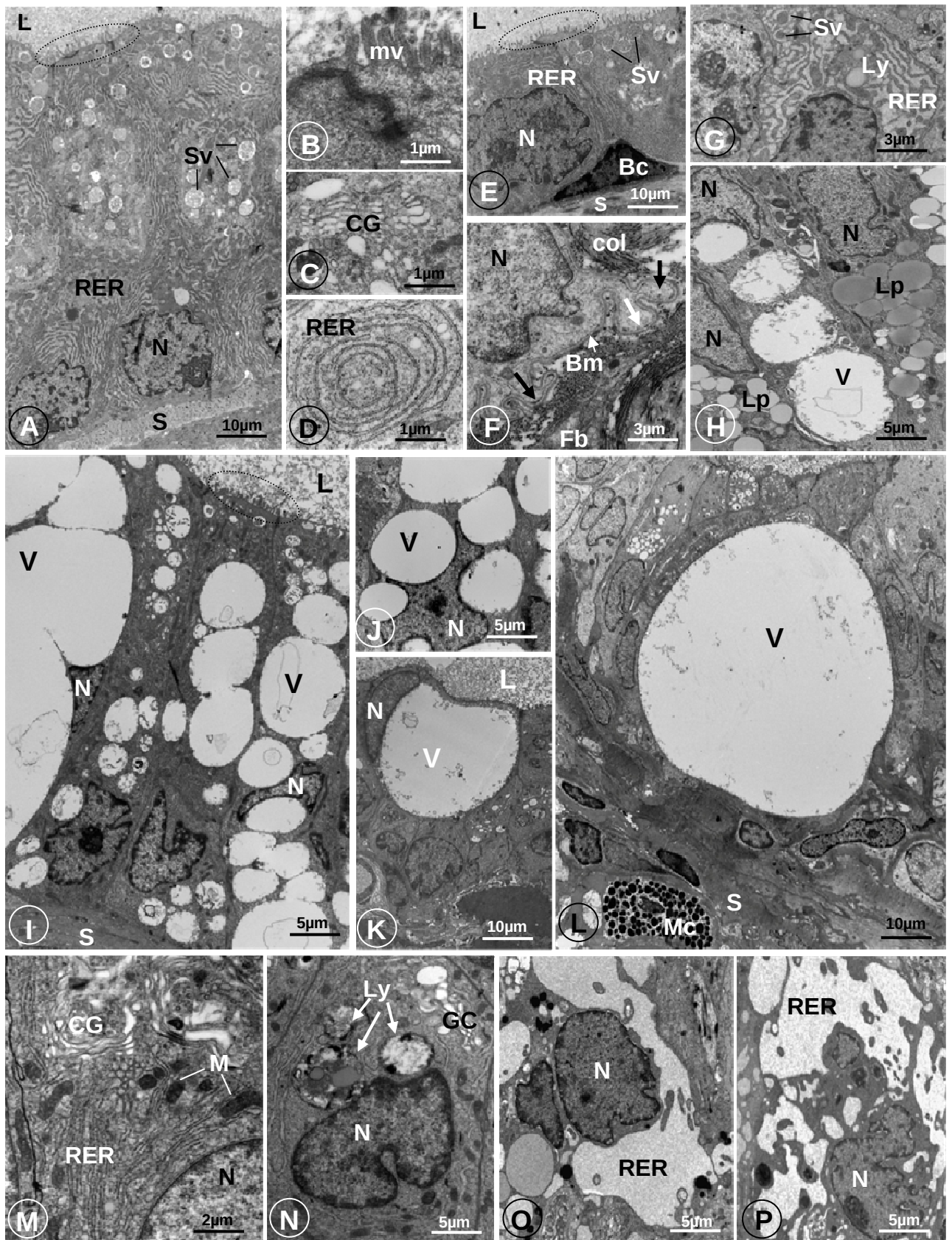


Figure 7. Representative images of immunohistochemistry reaction for Androgen receptor (AR) in the ventral (A-D), dorsal (E-H) and lateral (I-L) prostatic lobes from control or NP group (A,E,I), maternal restrict-protein diet or RP group (B,F,J), NP animals after T+E exposure (C,G,K) and RP animals after T+E exposure (D,H,L) in adult life. Note a uniform and high intensity of the positive immunostaining nuclei from VP, DP and LP of all experimental groups even in areas of altered epithelium (*). Scale bars = 50 μ m.

Figure 8. Ultrastructure of the ventral (A-L) and dorsal (M-P) prostatic lobes from control group or NP (A-D,M), maternal restrict-protein diet group or RP (E,F,N), NP after hormone exposure or NPH (G,H,O) and RP after hormone exposure or RPH (I-L,P) groups. *Ventral prostatic lobe:* **(A)** Typical tall columnar luminal cells with basal nuclei (N), parallel and flattened rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae, secretory vesicles (Sv) and microvilli (dashed circle) in the apical cytoplasm toward lumen (L). Note stroma (S) underlying the epithelium. **(B)** Apical region of luminal epithelial cells showing short and scattered microvilli (mv). **(C-D)** Supranuclear region of luminal epithelial cells showing typical Golgi complex (CG) and rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae. **(E)** Atrophic epithelium with cubical cells, nuclei (N), basal cell (Bc), parallel and flattened rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae, secretory vesicles (Sv), microvilli (dashed circle) in the apical cytoplasm and lumen (L). **(F)** Basal region of luminal epithelial cell showing irregular cytoplasmic projections (arrows) and basement membrane (Bm). Note stroma with abundant collagen fibers (col) and fibroblast (Fb). **(G)** Supranuclear region of luminal epithelial cells showing dilated rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae, lysosomes (ly) and secretory vesicles (Sv). **(H)** Tall unpolarized columnar epithelium showing lipid droplets (Lp) and dilated vacuoles (V); nuclei (N). **(I-L)** Tall columnar luminal cells showing nuclei (N), microvilli (dashed circle) in the apical cytoplasm and lumen (L). Stroma (S) underlying the epithelium, and mast cell (Mc). In the most of prostatic epithelial cells from rats of this experimental group exhibited great amount of dilated vacuoles (V), which in some cells they compress the nuclei and in others cells they appear to be coalesced forming a single large vacuole resembling signet ring-cell and cribriform PIN pattern. *Dorsal prostatic lobe:* **(M)** Supranuclear region of a typical luminal epithelial cell showing many mitochondria (M), parallel and flattened Golgi complex (CG) and rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae; nuclei (N). **(N)** Epithelial cell showing many lysosomes vesicles in the cytoplasm and Golgi complex (GC) cisternae; nuclei (N). **(O-P)** Altered epithelium exhibiting disorganized and dilated rough endoplasmic reticulum cisternae (RER); nuclei (N).



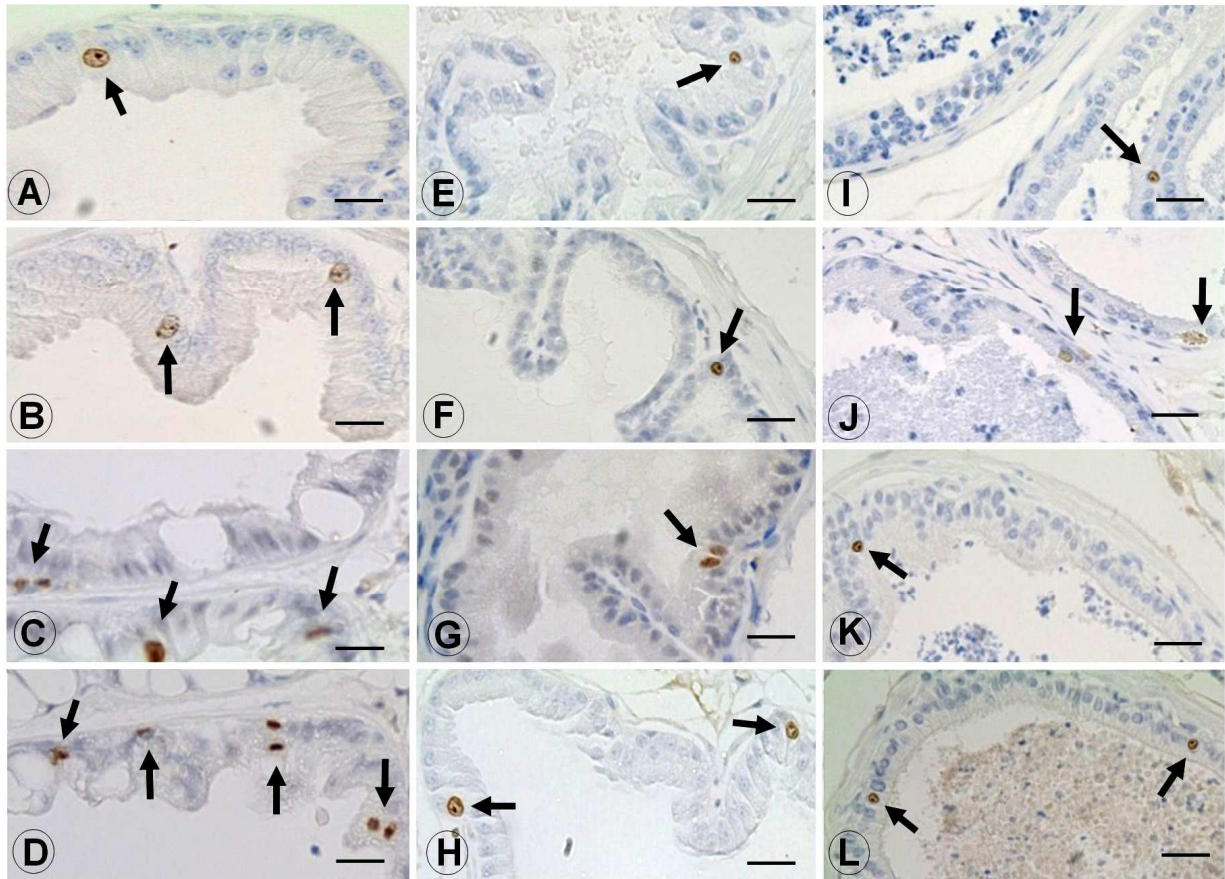


Figure 9. Representative images of immunohistochemistry reaction for a nuclear protein involved in cellular proliferation (Ki-67) in the ventral (A-D), dorsal (E-H) and lateral (I-L) prostatic lobes from control or NP group (A,E,I), maternal restrict-protein diet or RP group (B,F,J), NP animals after T+E exposure (C,G,K) and RP animals after T+E exposure (D,H,L) in adult life. Note a higher number of positive nuclei (arrows) of the epithelial cells from RP and RPH groups compared to NP and NPH groups respectively. Scale bars = 25 μ m.

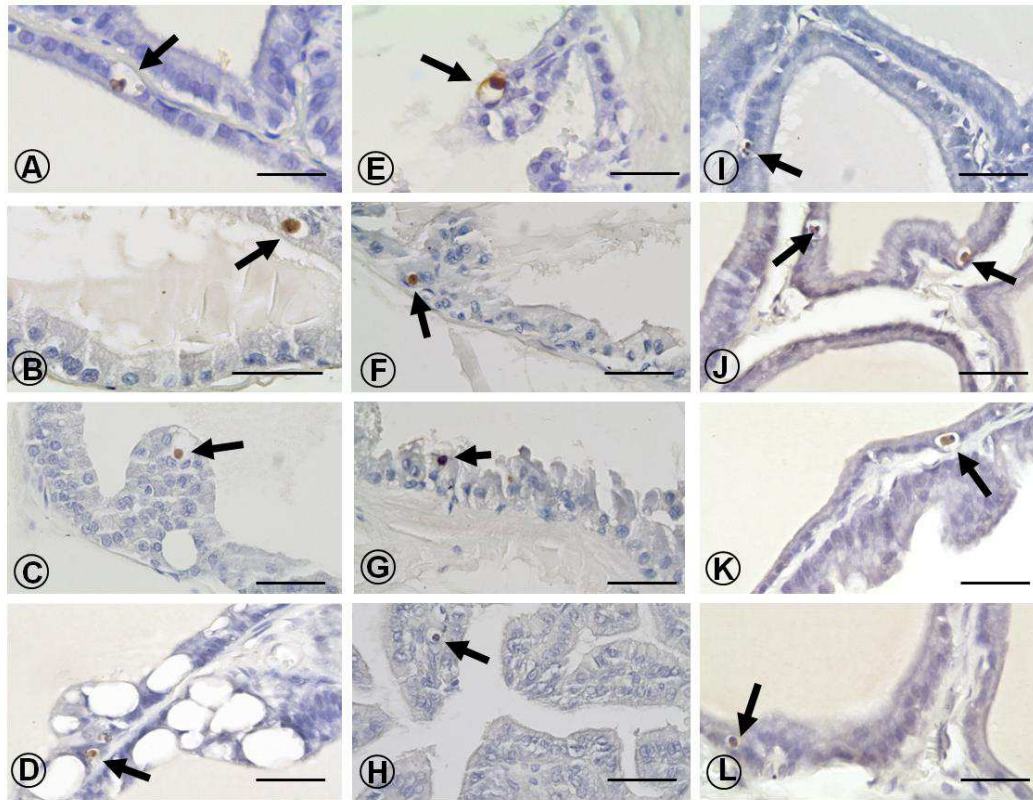


Figure 10. Representative images of TUNEL reaction in the ventral (A-D), dorsal (E-H) and lateral (I-L) prostatic lobes from control or NP group (A,E,I), maternal restrict-protein diet or RP group (B,F,J), NP animals after T+E exposure (C,G,K) and RP animals after T+E exposure (D,H,L) in adult life. The arrows indicate typical positively stained apoptotic epithelial cells that were used to determine the TUNEL index. Scale bars = 25 μ m.

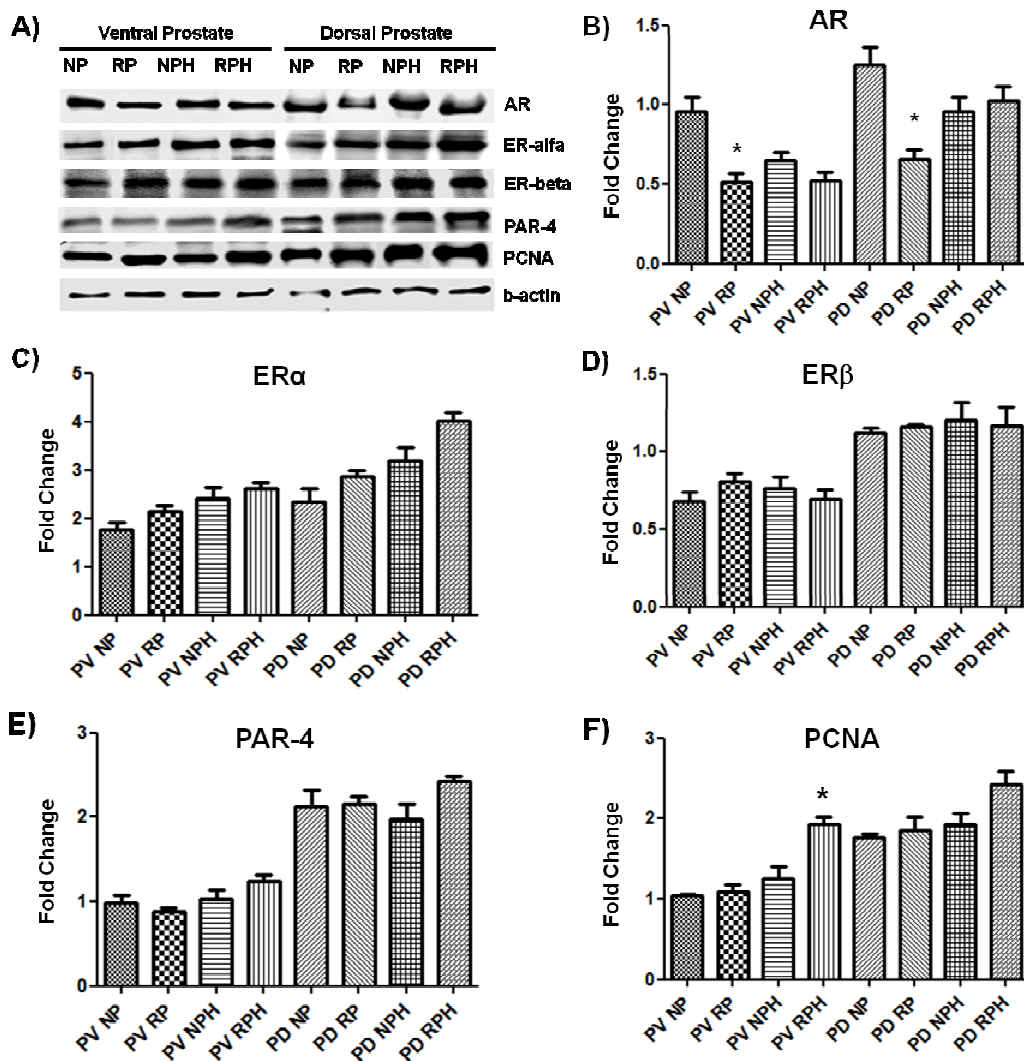


Figure 11. Analysis of protein tissue expression of androgen receptor (AR), estrogen receptor alfa (ER α) and beta (ER β), prostate apoptosis response-4 (PAR-4), proliferating cellular nuclear antigen (PCNA) and beta-actin (β -actin) in the ventral and dorsal prostate from control group (NP), maternal restrict-protein diet group (RP), NP and RP animals after T+E exposure in adult life (NPH and RPH groups respectively). **(A)** Representative image of western blottings. **(B-F)** Densitometry analysis of AR (B), ER α (C), ER β (D) PAR-4 (E) and PCNA (F) expression were normalized to β -actin expression and expressed as a fold change. There are no significant differences in ER α , ER β and PAR-4 expression after comparing NP with RP or NPH with RPH groups. Note significant decrease in AR expression of VP and DP from RP group in relation to NP group. PCNA expression was increased in VP from RPH in relation to NPH group. *indicates $p < 0.05$.

4.3 Capítulo III:

Restrição proteica gestacional altera o padrão de resposta da próstata de ratos adultos à manipulação hormonal

Jaqueline C Rinaldi^a, Livia M Lacorte^a, Flávia K Dellela^a, Ivan J Vechetti Junior^a, Wellerson R Scarano^a, Luis A Justulin Junior^b, Sergio L Felisbino^{a*}

^a*Departamento de Morfologia, Instituto de Biosciencias – Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil*

^b*Departamento de Morphologia, Faculdade de Odontologia – Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil*

*Correspondência para: Dr. Sérgio L. Felisbino, Departamento de Morfologia, Instituto de Biosciencias, Univ Estadual Paulista (UNESP), 18618-970, Botucatu, SP, Brasil.

Telephone/fax: +55 0XX 14 3880 0474

E-mail: felisbin@ibb.unesp.br

RESUMO

A programação fetal por restrição proteica materna durante a gestação (PFG) altera os níveis hormonais séricos de testosterona, corticosterona e estrógenos maternos, atrasando o crescimento e a maturação da próstata em ratos. Considerando a importância da próstata para o sucesso reprodutivo, e a alta incidência de lesões que acometem esse órgão nos últimos anos, este trabalho teve por objetivo investigar se a PFG altera o padrão de resposta do tecido prostático às manipulações hormonais de andrógenos e estrógenos. Para isso, ratos Wistar adultos nascidos de ratas alimentadas com dieta padrão (grupo NP, dieta AIN93G contendo 17% de proteína) ou dieta com restrição proteica (grupo RP, dieta AIN93G modificada contendo 6% de proteína) foram submetidos a ablação androgênica por 7 dias (castração cirúrgica) ou a castração química (0,08 mg/kg de 17 β -estradiol) ou suplementação androgênica (4 mg/kg de cipionato de testosterona) por 14 dias. Os órgãos do sistema reprodutor foram dissecados, pesados e as próstatas ventrais (PV) foram processadas para análise morfológica, morfométrica, imuno-histoquímica (Ki-67 e AR) e RT-PCR em tempo real (AR). Os principais resultados demonstram que a atrofia glandular provocada por castração cirúrgica foi mais acentuada no grupo NP, enquanto que a atrofia glandular por exposição ao estradiol foi mais intensa no grupo RP. Suplementação com testosterona (T) aumentou o peso glandular da próstata mais acentuadamente nos animais RP. Já os pesos da próstata dorsal e da vesícula seminal apresentaram um padrão de resposta contrário ao que foi observado para a PV. O tratamento com estradiol revelou uma maior incidência de prostatite e hiperplasia reativa no grupo RP em relação ao grupo NP. A castração cirúrgica aumentou a expressão do RNAm do AR na PV em ambos os grupos. O tratamento com estradiol, entretanto, promoveu um menor aumento na PV do grupo RP. O tratamento com T também aumentou a expressão de RNAm do AR, porém este aumento foi significativamente maior nos animais RP. Estes resultados sugerem que as alterações endócrinas desencadeadas pela PFG afeta o padrão de resposta da próstata e das outras glândulas sexuais acessórias à modulação hormonal na idade adulta. No caso do tecido prostático, a PFG induz uma resposta adaptativa ao menor estímulo androgênico e maior sensibilidade ao estímulo estrogênico, podendo interferir na resposta do tecido prostático às terapias hormonais para tratamento de lesões na idade senil.

Palavras-chave: castração, desnutrição proteico energética, estradiol, próstata, receptor de andrógeno, testosterona,

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento intrauterino representa um período de vulnerabilidade a perturbações tanto nutricionais quanto a agentes químicos ambientais. Assim, dependendo do tipo, da dose e do tempo de exposição ao insulto, as consequências são diversas, desde baixo peso ao nascimento, desvios de desenvolvimento, susceptibilidade a doenças na idade adulta e a morte (Langley-Evans e McMullen, 2010; Qasem *et al.*, 2012). Estes eventos que afetam o desenvolvimento do embrião/feto são coletivamente denominados de programação fetal (Lucas, 1991). Dentre os modelos conhecidos de programação fetal, a restrição proteica na dieta oferecida a ratas gestantes (PFG ou programação fetal gestacional) e/ou lactantes é um dos mais utilizados (Chen *et al.*, 2009; Langley-Evans e McMullen, 2010). Já está descrito que este tipo de malnutrição materna afeta de modo irreversível o funcionamento dos órgãos e sistemas bem como compromete sua longevidade (Qsem *et al.*, 2012). Isto se deve principalmente a alterações na expressão de genes que coordenam, pelo menos em parte, a taxa de proliferação celular e/ou diferenciação celular, proporção de tipos celulares em diferentes órgãos, além de alteração no padrão de resposta de diversas vias de sinalização.

Entretanto, a maior parte dos trabalhos descrevem os impactos da PGF sobre os sistemas cardiovascular e nervoso da prole, sendo escassos os estudos envolvendo o sistema genitourinário. Alguns autores demonstraram que a PFG compromete as funções reprodutivas uma vez que interfere no pico de testosterona do terço final da gestação, comprometendo o desenvolvimento de estruturas dependentes de andrógenos (Zambrano *et al.*, 2005; Fernandez-Twinn *et al.*, 2007). Também já foi observado que esse modelo experimental promove redução da distância ano-genital (Zambrano *et al.*, 2005; Rinaldi *et al.*, 2013), altera a os níveis de testosterona e estradiol (Teixeira *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2010), atrasa a puberdade (van Weissenbruch *et al.*, 2005; Noriega *et al.*, 2009), prejudica a taxa de fertilidade (Santos *et al.*, 2004; Zambrano *et al.*, 2005) e reduz a expressão de receptores de andrógenos no testículo (Rodrigues-Gonzales *et al.*, 2012).

A organogênese prostática é dependente de andrógenos, produzidos pelos testículos fetais (Thomson *et al.*, 2002), os quais masculinizam o trato reprodutor e conduzem a formação desta glândula (Cunha *et al.*, 1987). Estudos evidenciam que alterações na sinalização androgênica durante o desenvolvimento prostático resultaria em redução na morfogênese e crescimento do órgão (Marker *et al.*, 2003).

Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a PFG atrasa o desenvolvimento, o crescimento e a maturação da próstata, interferindo também na sua morfologia. Estes efeitos são provavelmente devidos à desregulação da sinalização androgênica desde o período intrauterino até a idade adulta. Além disso, os animais que sofreram programação fetal, quando expostos a condições adversas (como por exemplo a exposição à

combinação de hormônios esteróides: estradiol+testosterona), apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões, provavelmente por um mecanismo de *imprinting estrogênico* (Rinaldi *et al.*, dados não publicados).

A importância dos hormônios sexuais para o desenvolvimento e manutenção da morfofisiologia prostática já estão bem estabelecidos (Marker *et al.*, 2003). Além disso, tratamentos para lesões prostáticas, tais como prostatites, hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata também envolvem terapias hormonais (Schröder *et al.*, 2012). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a programação fetal por restrição proteica altera o padrão de resposta do tecido prostático quando submetidos a diferentes manipulações hormonais, tais como a ablação androgênica por castração cirúrgica, exposição ao 17 β -estradiol ou suplementação de ciproionato testosterona.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foram aprovados Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Biociências de Botucatu - SP (Protocolo 140/09). Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos (n=12) e fêmeas (n=24), pesando de 250 a 300 g, fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. Durante o experimento, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP sob condições padronizadas de temperatura ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$), alternando fotoperíodo de 12h claro/12h escuro.

Após executar procedimento de acasalamento, as ratas prenhes foram colocadas em gaiolas individuais. Nesse dia, as ratas começaram a ser alimentadas com ração padrão para ratos (grupo NP, n=12, AIN93G contendo 17% de proteína) ou dieta com restrição proteica (grupo RP, n=12, dieta AIN93G modificada contendo 6% de proteína) de acordo com o estabelecido por Reeves *et al.* (1993). Após o nascimento, todos os animais foram alimentados com dieta padrão até o final do experimento. No DPN 22 os descendentes machos e fêmeas foram separados das mães, sendo que 4 machos de cada ninhada foram transferidos para gaiolas coletivas para aguardar a divisão dos grupos experimentais na idade adulta. No DPN 150, 48 animais NP e RP foram divididos nos diferentes grupos experimentais descritos a seguir (n=12 animais/grupo). *Grupo veículo*: animais NP e RP receberam injeção subcutânea de óleo de milho (1 mL/kg em dias alternados). *Grupo testosterona*: animais NPT e RPT receberam injeção subcutânea de ciproionato de testosterona (4 mg/kg em dias alternados e dissolvidos em 1mL de óleo de milho; Sigma Co, St Louis, MO, USA) (Justulin *et al.*, 2010). *Grupo estradiol*: animais NPE e RPE receberam

injeção subcutânea de 17 β -estradiol (0,08 mg/kg em dias alternados e dissolvidos em 1mL de óleo de milho; Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) (Bernoulli *et al.*, 2008). *Grupo Castrado*: ratos NPc e RPc foram anestesiados com 0,25 mL/100g da combinação de Dopalen/Anasedan (1:1, Vetbrands®, Paulínea, SP, Brasil) e então, submetidos à castração cirúrgica via escrotal.

Após 7 dias de castração e 14 dias de tratamento os animais foram pesados e sacrificados. Em seguida, os órgãos da reprodução (testículo, epidídimo, vesícula seminal, próstata ventral, dorsolateral e anterior) foram coletados, dissecados, identificados e pesados em balança analítica. Amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas (4000rpm/20min) e a concentração plasmática de testosterona e estrógeno foram quantificadas pelo método Imuno-enzimático de Quimioluminescência. As análises descritas a seguir foram restritas à próstata ventral (PV) dos diferentes grupos experimentais, sendo que os outros lobos prostáticos, assim como o testículo e a vesícula seminal foram utilizados para se determinar a variação de peso frente aos diferentes tratamentos.

Análise Morfológica

As PVs foram fixadas em metacarn (70% metanol, 20% clorofórmio e 10% ácido acético) por um período de 5h. Após a fixação, o material foi desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes de 4 μ m foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso. Alguns fragmentos foram desidratados até álcool 95%, embebidos em resina metacrilato (Historesin - Leica) e posteriormente incluídos em moldes plásticos. Cortes de 4 μ m foram produzidos com navalha de vidro em micrótomo rotativo automático, coletados e armazenados em estufa a 40°C até o momento de uso. Alguns cortes em resina foram corados em Hematoxilina-Eosina para uma análise geral da estrutura glandular, pelo picrossírius (Junqueira *et al.*, 1979) e pela Reticulina de Gömori (Gömori, 1937, modificado, em Taboga e Vidal, 2003), para a análise das fibras do sistema colágeno. Os cortes foram observados em microscópio Leica DMLB.

Análise estereológica e morfométrica

A análise morfométrica altura do epitélio foi efetuada em cortes de historesina corados com H.E. Foram executadas 20 medidas interativas, utilizando-se objetiva de 40x em pelo menos 20 campos da PV de 6 animais de cada grupo. Os resultados foram expressos em μ m. A análise estereológica da fração volumétrica do lúmen, do epitélio e do estroma foi efetuada em cortes de historesina corados com H.E. de acordo com o sistema de contagem dos pontos pela grade de Weibel (Weibel *et al.*, 1966). As medidas foram executadas em 10 campos escolhidos ao acaso (objetiva de 20x) de 6 diferentes animais por grupo. Os resultados foram expressos em percentagem (%). A análise morfométrica da área ocupada por fibras colágenas foi efetuada em cortes de historesina corados pelo picrossírius. Foram realizadas medidas interativas (por

detecção automática da cor vermelha pelo software de análise de imagem LEICA Qwin Versão 3.1 para Windows™), em objetiva de 20x, em 10 campos microscópicos da PV de 6 animais de cada grupo. A análise quantitativa da incidência de metaplasia, infiltrado inflamatório (prostatite) e hiperplasia reativa à inflamação foi executada em 3 campos da PV de 6 animais de cada grupo. O resultado foi expresso em número absoluto e percentagem (%).

Imuno-histoquímica

Cortes em Paraplast foram desparafinizados, hidratados e submetidos a recuperação antigênica por tratamento com tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0 em panela de pressão por 35 min. Após o resfriamento, as lâminas foram mergulhadas por 15 min em solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em tampão fostato-salina (PBS) para o bloqueio das peroxidases endógenas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e embebidos em solução contendo 3% de albumina de soro bovino para o bloqueio das interações proteína-proteína não-específicas. Posteriormente, os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário contra Ki-67 (Dako Cytomation) e contra o receptor de andrógeno (Santa Cruz Biotechnology). Os cortes foram lavados em PBS e incubados com respectivo anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase. A marcação foi revelada pela diaminobenzidina e os cortes foram contra-corados com hematoxilina. Os cortes foram observados em microscópio Leica DMLB e as imagens capturadas por camera digital.

Avaliação quantitativa de células em proliferação e em apoptose

O anticorpo Ki-67 é um marcador da fase S do ciclo celular e foi utilizada para determinar o índice de proliferação de células epiteliais. A contagem de células Ki-67 positivas foi executada em 10 campos da PV de 6 animais por grupo, utilizando-se a objetiva de 40x. Para executar o índice de proliferação foi utilizada a fórmula: número de núcleos Ki-67 positivos x 100/número total de núcleos de células epiteliais do campo analisado. Os resultados foram expressos em percentagem (%). Para contagem de células em apoptose, foram utilizados cortes em resina corados com H.E. A contagem foi executada em 10 campos da PV de 6 animais por grupo, utilizando-se a objetiva de 40x. A identificação das células apoptóticas seguiu alguns critérios descritos por Kerr *et al.* (1994) uma massa condensada fortemente eosinofílica de citoplasma contendo um núcleo de cromatina condensada, homogênea e bem basofílica; 2) citoplasma claro com fragmentos nucleares de cromatina condensada. Foram consideradas para contagem apenas as células presentes no epitélio secretor, não sendo contadas as células apoptóticas presentes no estroma ou lúmen. O índice apoptótico foi determinado da mesma forma que o índice de proliferação.

Expressão gênica do RNAm para o receptor de andrógeno (AR) por RT-qPCR

Para a extração do RNA total das amostras de PV foi utilizado o reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop com base na densidade óptica (OD) por leitura de absorbância à 260 nm. Além disso, as razões das absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm, forneceu uma estimativa da qualidade da extração. A qualidade (integridade) do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S em gel de agarose. O RNA total (2 µg) foi tratado com a enzima DNase para remoção de possível DNA genômico contaminante, conforme as instruções do protocolo “Deoxyribonuclease I - Amplification Grade” (Life Technologies). A partir do RNA total purificado foi feita a transcrição reversa utilizando-se o Kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica do receptor de andrógeno (NM_012502) e da Beta Actina (NM_031144) foi detectada no “Sistema Real Time PCR 7300” (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). O gene da beta actina foi usado como referência para normalizar a quantificação do RNAm do gene alvo, receptor de andrógeno. As reações foram realizadas em duplicata e as condições das reações foram 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de denaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 min.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo (Livlak & Schmittgen, 2001). A linearidade e a eficiência da PCR em tempo real foram deduzidas a partir da inclinação da curva-padrão gerada pelo software 7300 System SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para cada um dos genes analisados.

Análises estatísticas

As análises comparativas foram executadas em pares, ou seja entre animais NP e RP submetidos a cada tratamento separadamente. O teste estatístico t Student foi utilizado para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa Instat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS OBTIDOS

Peso Corpóreo e Peso da Próstata

Os dados referentes ao peso corpóreo dos animais, bem como o peso dos órgãos no dia do sacrifício estão apresentados na Tabela 1. Os diferentes tratamentos não afetaram peso corporal dos animais, que variou de 404 a 453 g. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa no peso dos testículos, epidídimos e da próstata anterior entre os grupos experimentais. Entretanto, os tratamentos afetaram os pesos da vesícula seminal (VS), das

próstatas ventral (PV) e dorsolateral (PDL) diferentemente. Enquanto a VS dos animais NP foi mais responsiva a castração cirúrgica (NPc), a VS dos animais RP foi mais responsiva à castração química (NPE), evidenciado pela significativa redução do peso glandular. Do mesmo modo, a VS dos animais NP também se mostrou mais responsiva à suplementação hormonal com testosterona (NPT), cujo o peso 30% maior em comparação ao peso da VS do grupo RPT. A suplementação hormonal com testosterona também levou a um maior aumento de peso da PDL do grupo NPT do que a do grupo RPT. Em contrapartida, a PV foi mais responsiva no grupo RPT, sendo o seu peso 32% maior em relação ao grupo NPT.

Dosagens Hormonais

Os dados referentes as dosagens hormonais são apresentados na Figura 1. Os níveis séricos de T foram menores no grupo RP em relação ao NP. Após suplementação com testosterona (grupos NPT e RPT) foi observado um aumento similar no nível sérico deste hormônio em ambos os grupos. Os animais submetidos à castração cirúrgica (NPc e RPc) ou química (NPE e RPE) apresentaram drástica e similar redução dos níveis séricos de T em relação ao grupo controle. Os níveis séricos de estradiol foram aproximadamente 4 vezes maiores nos animais NPE e RPE em relação aos demais grupos, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os grupos NP e RP.

Análises Histológicas e Morfométricas

Os aspectos histológicos da PV dos diferentes grupos experimentais são demonstrados na Figura 2. O grupo NP apresentou ácinos dilatados revestidos por epitélio colunar alto secretor apoiado em um delicado estroma (Fig. 2A e B). Nos animais RP, os ácinos demonstraram luz menos dilatada e com muitas dobras epiteliais, além de espessamento no compartimento estromal (Fig. 2C e D). Esses dados foram confirmados pela análise quantitativa (Tabela 2).

Nas PVs dos grupos submetidos à castração cirúrgica ou química por estradiol observou-se diminuição do lúmen glandular e espessamento do compartimento estromal (Fig. 2E-L, Tabela 3). Embora a castração cirúrgica ou química tenham provocado atrofia glandular, os efeitos da castração cirúrgica foram mais evidentes no grupo NPc, enquanto os efeitos da castração por estradiol foram mais evidentes no grupo RPE (Fig. 2G e H, Tabela 2). A PV dos grupos NPT (Fig. 2M e N) e RPT (Fig. 2O e P) demonstraram características de glândulas hipertróficas por processo de síntese de secreção, evidenciado por lúmen amplo e células epiteliais colunares altas com destacado complexo de Golgi supranuclear.

A análise morfométrica demonstrou que não houve diferenças estatísticas significantes na altura das células secretoras entre os grupos NP e RP ou entre os grupos NPc e RPc (Tabela 2). Entretanto, a altura média do epitélio da PV dos animais submetidos a castração química por estradiol foi 25% menor nos animais RPE em relação ao grupo NPE. Já com a suplementação

com testosterona, a altura das células epiteliais do grupo RPT foi 22% maior que no grupo NPT (Tabela 2).

A análise estereológica demonstrou que a fração volumétrica do compartimento epitelial não se alterou significativamente entre os diferentes grupos experimentais. O compartimento estromal apresentou uma maior fração volumétrica nos animais RP e RPc em relação aos animais NP e NPc. Já a fração volumétrica luminal foi maior nos animais RPc em relação aos NPc e foi menor nos animais RPE em relação ao grupo NPE (Tabela 2). A análise das lâminas coradas por picrossírius demonstrou que a desnutrição proteica materna promoveu aumento na fração volumétrica ocupada pelo colágeno no estroma da PV do grupo RP (Fig. 3C), comparado ao grupo NP (Fig. 3A). Nos grupos que receberam estradiol, observou-se diferença ainda maior, com 50% de aumento na fração volumétrica de colágeno no grupo RPE (Fig. 3K) comparado com o grupo NPE (Fig. 3I). Entretanto, a fibrose induzida pela castração cirúrgica foi mais intensa nos animais NPc (Fig. 3E) em relação ao grupo RPc (Fig. 3G). Não houve alteração neste parâmetro nos grupos NPT e RPT (Fig. 3M e O, respectivamente). Esses dados foram confirmados pelas análises quantitativas (Tabela 2).

As análises das fibras do sistema colágeno mostraram que as fibras de colágenos do tipo I organizam-se na região subepitelial e no estroma intersticial, predominando na base do epitélio sob a forma de fibras espessas e sustentando as dobras epiteliais (evidenciado em marrom pela reticulina de Gomori na Fig. 3). O colágeno do tipo III foi identificado também envolvendo o epitélio e as dobras epiteliais e compondo o estroma interalveolar. Essas fibras estão intimamente associadas a base do epitélio e envolvendo as células estromais bem como as células musculares lisas (evidenciado em preto pela reticulina de Gomori na Fig. 3). Comparando-se os grupos NP e RP nos diferentes tratamentos pode-se observar que os aspectos de atrofia glandular descritos na Figura 2 se refletiram no grau de condensação das fibras estromais. Ou seja, a condensação das fibras colágenas pela castração cirúrgica foi mais evidente no grupo NPc, enquanto que por castração por estradiol foi mais evidente no grupo RPE (Fig. 3).

Avaliação quantitativa de células em proliferação e em apoptose

O índice de proliferação celular nos diferentes grupos experimentais foi avaliado pela reação imuno-histoquímica contra o antígeno Ki-67. Os grupos NP (Fig. 4A) e RP (Fig. 4B) apresentaram poucas células em proliferação. De forma interessante, tanto os grupos NPc (Fig. 4C) e RPc (Fig. 4D), quanto os grupos NPE (Fig. 4E) e RPE (Fig. 4F), apesar de passarem pelo processo de castração cirúrgico e químico, respectivamente, ainda apresentaram algumas células positivas para Ki-67. Já os grupos NPT (Fig. 4G) e RPT (Fig. 4H), que receberam testosterona exógena, demonstraram maior índice de proliferação de células epiteliais. Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 2. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos NP e RP nos diferentes tratamentos.

A Figura 5 apresenta células com típicos aspectos morfológicos de apoptose em todos os grupos experimentais. A análise quantitativa foi apresentada na Tabela 2. A quantificação revelou que não houve diferença significativa nos índices de apoptose das células epiteliais da PV dos animais NP e RP nos diferentes tratamentos. Entretanto, como consequência da castração cirúrgica ou química, os índices de apoptose tanto nos animais NPc e NPE quanto nos animais RPc e RPE eram significativamente maiores em relação ao grupo veículo.

Análise Histopatológica

A análise histopatológica revelou que as alterações mais frequentes foram metaplasia epitelial, infiltrado inflamatório (prostatite) no compartimento estromal e/ou luminal e hiperplasia epitelial reativa à prostatite. Imagens destas alterações são apresentadas na Figura 6.

Metaplasia epitelial é uma alteração no tipo do epitélio, que de cilíndrico, passou a ser cúbico ou até pavimentoso (Fig. 6A-C). Essas áreas foram observadas com maior frequência nos animais RP e RPE sendo que nos outros grupos houve uma baixa incidência (Tabela 3). Também foi observado a presença da prostatite no compartimento estromal (Fig. 6D e E) e/ou luminal (Fig. 6F e G) da PV dos diferentes grupos experimentais. Comparativamente, incidência de prostatite foi mais significativa na PV dos grupos RP e RPE em relação aos grupos NP e NPE respectivamente (Tabela 3). Notavelmente, o tratamento com estradiol intensificou o quadro de prostatite tanto nos animais NP quanto RP de modo que foi possível observar, inclusive, as células inflamatórias organizadas em arranjo nodular (detalhe da Fig. 6E). O epitélio acinar adjacente as áreas com prostatite apresentou as células epiteliais desorganizadas e algumas vezes constituindo mais de uma camada de núcleos celulares, caracterizando o quadro de hiperplasia reativa à prostatite (Fig. 6D e F). A incidência desta alteração foi estatisticamente maior no grupo RPE em relação ao grupo NPE (Tabela 3). Por outro lado, o tratamento com testosterona reduziu significativamente a incidência destas três lesões nas PVs dos animais NPT e RPT.

Análise imuno-histoquímica para AR

A análise da expressão tecidual do AR revelou intensa marcação positiva nos núcleos das células epiteliais secretoras da PV dos diferentes grupos experimentais, com exceção dos grupos castrados, nos quais foi observada uma fraca marcação nuclear associada com uma difusa marcação citoplasmática no epitélio e em células estromais (Fig. 7).

Análise da expressão gênica do AR por RT-qPCR

Foi observada uma maior expressão do RNAm nos animais RP em relação ao grupo NP (*fold change*=1,6). Após o tratamento com testosterona, a expressão do RNAm para AR dobrou na PV de ambos os grupos NPT e RPT, e manteve uma maior expressão no grupo RPT (*fold*

change=1,8). Como esperado, a castração cirúrgica e a castração química com estradiol promoveram um expressivo aumento na expressão do RNAm do AR, porém este aumento foi significativamente menor nos animais RPc e RPE (Fig. 8).

DISCUSSÃO

Em ratos adultos, a próstata é composta de um complexo sistema de ramificações de ductos, túbulos e alvéolos. Anatomicamente é dividida em 4 lobos conforme a posição em relação a uretra: próstata ventral, dorso-lateral (ou separados, próstata dorsal e lateral) e próstata anterior (Marker *et al.*, 2003). A próstata ventral não apresenta homologia com a próstata humana, entretanto, é o principal órgão alvo de investigação. Esta preferência se justifica, principalmente, no seu maior tamanho e no seu fácil e rápido acesso no momento da dissecação entre os diferentes lobos da próstata do rato. Por consequência, o lobo ventral é o mais bem descrito em termos de morfologia, variação morfofuncional, regulação hormonal, proliferação e morte celular, regulação por fatores parácrinos e efeitos de diferentes fármacos. Desta forma, nossa escolha em analisar a PV também se baseou nestes critérios e também para permitir uma melhor comparação com os resultados já descritos na literatura (Prins *et al.*, 2001; Roy-Burman *et al.*, 2004).

Sabe-se que níveis séricos constantes de andrógenos são essenciais para manutenção da integridade e função da próstata. E seus efeitos são desencadeados através do receptor de andrógeno (Taplin e Ho, 2001). Assim, mudanças na expressão gênica do AR são diretamente relacionadas a alterações na morfofisiologia da glândula prostática (Cunha *et al.*, 2004). Além dos andrógenos, os estrógenos também apresentam papel importante na homeostasia glandular, pois estão envolvidos no controle da proliferação celular, progressão de lesões e na carcinogênese (Harkonen e Makela, 2004).

Nossos resultados demonstram que apesar da PV dos animais NP e RP apresentarem semelhanças em alguns aspectos morfológicos, o padrão de resposta obtido após a manipulação hormonal revelou-se diferente entre eles. Os dados das análises morfológicas, morfométricas de fração colágena, fração volumétrica do lumen e do estroma, altura de epitélio e expressão gênica de AR dos animais NPc, RPc, NPT e RPT indicam uma adaptação dos animais RP aos níveis séricos reduzidos de andrógenos, mas com significativa sensibilidade de resposta a suplementação androgênica.

Por outro lado, a administração de estrógeno nestes animais RP levou a uma maior redução do peso glandular, ao acúmulo de fibras colágenas no estroma prostático, atrofia epitelial e maior incidência de prostatite, e menor expressão do RNAm do AR. Estes aspectos, principalmente o padrão de expressão gênica do RNAm para o AR, são semelhantes aos observados por Prins (1992) em animais estrogenizados no período neonatal, o qual é atribuído a um *imprinting* estrogênico do tecido prostático. Além disso, a condensação estromal após castração e após o tratamento com estrógeno observadas em nosso estudo estão de acordo com outros estudos

descritos na literatura (Vilamaior *et al.*, 2000; Antonioli *et al.*, 2004; Garcia-Florez *et al.*, 2005; Felisbino *et al.*, 2007; Justulin-Junior *et al.*, 2010).

Notavelmente, os resultados do nosso estudo também indicam que outros órgãos dependentes de andrógenos, tais como a VS e a PDL dos animais RP apresentaram um padrão de resposta, avaliada pelo peso glandular, diferente da PV quando tratados pela castração cirúrgica, estradiol ou testosterona, sugerindo que a PFG tem efeitos órgão-específicos. Os mecanismos moleculares desta ação diferencial da PFG permanecem por ser determinados, porém estudos na literatura mostram que a VS e a PDL podem apresentar respostas diferentes da PV em várias condições experimentais (Banerjee *et al.*, 1995; Justulin-Junior *et al.*, 2006; Porto *et al.*, 2011) e que estas diferenças são atribuídas em partes pelas diferenças na origem embrionária, na composição tecidual e na expressão de receptores androgênicos e estrogênicos (Prins e Birch, 1997). Além disso, vários fatores de crescimento e fatores de transcrição, tais como FGF10, Wnt, Shh, BMPs, IGFs, TGFs, e GH, alguns comuns e outros específicos, estão atuando de maneira coordenada, temporal e espacialmente, na morfogênese inicial dos lobos prostáticos e da vesícula seminal neste período gestacional, os quais certamente podem ser alterados pela PGF (Huang *et al.*, 2009; Renolds e Kyprianou, 2006).

Concluindo, as respostas diferenciais à testosterona e ao estradiol na vida adulta sugerem que a programação fetal induzida pela restrição proteica materna modifica o padrão de resposta das células prostáticas às manipulações hormonais, tornando a próstata mais susceptível ao desenvolvimento de afecções com a idade e possivelmente mais ou menos responsivas às terapias hormonais para o tratamento destas afecções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonioli E, Della-Colleta HH, Carvalho HF (2004). Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *J Androl.* 25:50-56.
- Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR (1995). Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. *Endocrinology.* 136(10):4368-4376.
- Bernoulli J, Yarkin E, Laakso A, Anttinen M, Bosland M, Vega K, Kallajoki M, Santti R, Pylkkänen L (2008). Histopathological evidence for an association of inflammation with ductal pin-like lesions but not with ductal adenocarcinoma in the prostate of the noble rat. *Prostate.* 15;68(7):728-739.
- Chen JH, Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins J, Ozanne SO (2009). Maternal Protein Restriction Affects Postnatal Growth and the Expression of Key Proteins Involved in Lifespan Regulation in Mice. *PLOSone.* 4(3):e4950.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Ver.* 8:338-362.

- Cunha GR, Ricke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92(4):221-236.
- Felisbino SL, Justulin Junior LA, Carvalho HF, Taboga SR (2007). Epithelial-stromal transition of MMP-7 immunolocalization in the rat ventral prostate following bilateral orchiectomy. *Cell Biol Int.* 31(10):1173-1178.
- Fernandez-Twinn DS, Ekizoglou S, Gusterson BA, Luan J, Ozanne SE (2007). Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogenesis.* 28:545–552.
- García-Flórez M, Oliveira CA, Carvalho HF (2005). Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz J Med Biol Res.* 38:487-497.
- Gömori G (1937). Silver impregnation of reticulum in paraffin sections. *Am. J. Pathol.* 13:993-1002.
- Härkönen PL, Mäkelä SI (2004). Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92(4):297-305.
- Huang L, Pu Y, Hu WY, Birch L, Luccio-Camelo D, Yamaguchi T, Prins GS (2009). The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol.* 328:188-199.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue sections. *J Histochem.* 11:447–455.
- Justulin LA Jr, Della-Coleta HH, Taboga SR, Felisbino SL (2010). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int J Androl.* 33(5):696-708.
- Justulin LA Jr, Ureshino RP, Zanoni M, Felisbino SL (2006). Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell Biol Int.* 30:354-364.
- Kerr JFR, Winterford, CM, Harmon BV (1994.) Morphological criteria for identifying apoptosis. In Celis, J.E. (ed.), *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, San Diego, USA. p. 319–329.
- Langley-Evans SC, McMullen S (2010). Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract.* 19(2):87-98.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 25:402-408.
- Liviak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 25(4):402-408.
- Lucas A (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 156:38-50.
- Marker, PC; Donjacour, AA; Dahiya, R; Cunha, GR (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Develop Biol.* 253:165-174.
- Noriega NC, Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Gray LE Jr (2009). Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicol Sci.* 111(1):163-178.

- Porto EM, Dos Santos SA, Ribeiro LM, Lacorte LM, Rinaldi JC, Justulin LA Jr, Felisbino SL (2011). Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. *Microsc Res Tech.* 74(11):1040-1048.
- Prins GS (1992). Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology.* 130(6):3703-3714.
- Prins GS, Birch L (1997). Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology.* 138(5):1801-1809.
- Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Christopher T, Oliver P (2001). Influence of neonatal estrogens on rat prostate development *Reprod Fertil Dev.* 13:241-52.
- Qasem RJ, Yablonski E, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'mello AP (2012). Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav.* 105:1182–1193.
- Ramos CF, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJ (2010). The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl.* 12:180–185.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993). 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-76 rodent diet. *J Nut.* 123:1939–1951.
- Reynolds AR, Kyprianou N (2006). Growth factor signaling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol.* 147(2):144-152.
- Rinaldi JC, Justulin LA Jr, Lacorte LM, Sarobo C, Boer PA, Scarano WR, Felisbino SL (2013). Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Science. in press.*
- Rodríguez-González GL, Viguera-Villaseñor RM, Millán S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz F (2012). Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J Dev Orig Health Dis.* 3(5):321-326.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB (2004). Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer.* 11(2):225-54.
- Santos AM, Ferraz MR, Teixeira CV, Sampaio FJ, Ramos CF (2004). Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. *Horm Metab Res.* 36:27–33.
- Schröder F, Crawford ED, Axcróna K, Payne H, Keane TE (2012). Androgen deprivation therapy: past, present and future. *BJU Int.* 6:1-12.
- Taboga SR, Vidal BC (2003). Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 35:1–6.
- Taplin ME, Ho SM (2001). Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(8):3467-3477.
- Teixeira CV, Silandre D, de Souza Santos AM, Delalande C, Sampaio FJ, Carreau S, Ramos C. (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol.* 192(2):301-311.

- Thomson AB, Anderson RA, Irvine DS, Kelnar CJ, Sharpe RM, Wallace WH (2002). Investigation of suppression of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis to restore spermatogenesis in azoospermic men treated for childhood cancer. *Hum Reprod.* 17(7):1715-1723.
- van Weissenbruch MM, Engelbregt MJ, Veening MA, van Weissenbruch HA (2005). Fetal nutrition and timing of puberty. *Endocr Dev.* 8:15-33.
- Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF (2000). Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate.* 45:253-258.
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF (1966). Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 30:23–38.
- Zambrano, E; Rodriguez-González, GL; Guzmán, C; García-Becerra, R; Boeck, L; Díaz, L; Menjivar, M; Larrea, F; Nathanielsz, PW (2005). A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol.* 563:275-284.

Tabela 1. Dados biométricos de ratos Wistar machos e órgãos do sistema reprodutor dos diferentes grupos experimentais

Parâmetros	Grupos Experimentais							
	Veículo		Castrados		Estradiol		Testosterona	
	NP	RP	NPc	RPc	NPE	RPE	NPT	RPT
Peso corporal (g)	411,88±20,12	404,01±21,43	453,41±32,33	409,32±22,17	418,43±29,22	407,35±30,27	442,56±23,76	437,61±31,24
Peso absoluto da PV (g)	0,51±0,03	0,42±0,01	0,12±0,02	0,10±0,02	0,19±0,03	0,20±0,03	0,58±0,03	0,76±0,02*
Peso relativo da PV	0,124±0,02	0,104±0,01	0,026±0,001	0,024±0,001	0,045±0,001	0,049±0,001	0,131±0,001	0,174±0,001*
Peso absoluto da PDL (g)	0,32±0,02	0,35±0,03	0,15±0,01	0,18±0,02	0,26±0,02	0,27±0,02	0,53±0,03	0,40±0,02*
Peso relativo da PDL	0,08±0,001	0,08±0,001	0,03±0,001	0,05±0,001	0,06±0,001	0,06±0,001	0,12±0,001	0,09±0,001*
Peso absoluto da PA (g)	0,21±0,01	0,20±0,01	0,009±0,001	0,012±0,001	0,13±0,01	0,10±0,01	0,41±0,04	0,38±0,05
Peso relativo da PA	0,05±0,001	0,05±0,001	0,001±0,001	0,001±0,001	0,03±0,001	0,02±0,001	0,09±0,001	0,08±0,001
Peso absoluto da VS (g)	1,23±0,10	1,17±0,11	0,34±0,09	0,58±0,09*	0,65±0,09	0,43±0,09*	1,82±0,13	1,28±0,12*
Peso relativo da VS	0,31±0,005	0,29±0,003	0,09±0,001	0,15±0,001*	0,15±0,001	0,10±0,001*	0,35±0,003	0,28±0,002*
Peso absoluto do T (g)	3,34±0,49	3,12±0,18	-	-	3,57 ± 0,58	3,56 ± 0,52	2,82±0,45	2,89±0,48
Peso relativo do T	0,74±0,08	0,71±0,06	-	-	0,69 ± 0,12	0,71 ± 0,11	0,70±0,11	0,71±0,12
Peso absoluto do E (g)	1,36 ± 0,14	1,34 ± 0,22	-	-	1,44 ± 0,16	1,43 ± 0,18	1,18±0,22	0,99±0,19
Peso relativo do E	0,26 ± 0,03	0,25 ± 0,03	-	-	0,32 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,28±0,06	0,23±0,05

Valores expressos em média ± desvio padrão. n=12 animais por grupo. Prole de gestação com dieta normoproteica (NP); Prole de gestação com restrição proteica na dieta (RP); animais NP e RP após procedimento de castração cirúrgica (NPc e RPc); animais NP e RP após tratamento subcutâneo com 17 β-estradiol (NPE e RPE); animais NP e RP após tratamento subcutâneo com cipionato de testosterona (NPT e RPT). PV=próstata ventral; PDL=próstata dorsolateral; PA=próstata anterior; VS=vesícula seminal; T=testículos; E=epidídimo. * indica diferença estatística com $p < 0,05$ entre os animais NP e RP por tratamento separadamente.

Tabela 2. Dados morfométricos da próstata ventral dos diferentes grupos experimentais

Parâmetros	Grupos Experimentais							
	Veículo		Castrados		Estradiol		Testosterona	
	NP	RP	NPc	RPc	NPE	RPE	NPT	RPT
Altura do epitélio (μm)	22,74 $\pm$ 1,86	22,07 $\pm$ 1,98	12,27 $\pm$ 1,41	15,44 $\pm$ 1,95	20,48 $\pm$ 2,11	15,14 $\pm$ 2,26*	24,36 $\pm$ 2,02	30,92 $\pm$ 2,89*
Índice de proliferação (%)	1,27 $\pm$ 0,09	1,56 $\pm$ 0,07	0,03 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,08	0,09 $\pm$ 0,10	2,98 $\pm$ 0,52	2,62 $\pm$ 0,33
Índice de apoptose (%)	0,44 $\pm$ 0,18	0,68 $\pm$ 0,19	2,57 $\pm$ 0,12	2,83 $\pm$ 0,17	2,14 $\pm$ 0,13	2,42 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,06
Fração colágena (%)	2,61 $\pm$ 0,79	3,63 $\pm$ 0,12*	8,17 $\pm$ 0,81	5,14 $\pm$ 1,35*	2,78 $\pm$ 0,85	4,16 $\pm$ 0,92*	1,82 $\pm$ 0,73	2,02 $\pm$ 0,39
<i>Fração volumétrica:</i>								
Epitélio (%)	33,71 $\pm$ 0,98	32,31 $\pm$ 1,22	33,68 $\pm$ 1,47	30,57 $\pm$ 3,89	29,61 $\pm$ 3,1	35,87 $\pm$ 3,35	31,63 $\pm$ 3,27	33,99 $\pm$ 3,23
Lumen (%)	50,89 $\pm$ 0,92	46,86 $\pm$ 1,36	16,83 $\pm$ 4,22	29,52 $\pm$ 2,09*	39,24 $\pm$ 4,78	26,87 $\pm$ 4,64*	52,44 $\pm$ 5,61	48,63 $\pm$ 3,62
Estroma (%)	15,40 $\pm$ 3,89	20,83 $\pm$ 3,91*	49,49 $\pm$ 3,72	39,91 $\pm$ 5,09*	31,15 $\pm$ 2,78	37,26 $\pm$ 2,64*	15,93 $\pm$ 1,01	17,38 $\pm$ 3,72

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. n=6 animais por grupo. Animais controle (NP); animais submetidos a restrição proteica durante o desenvolvimento intrauterino (RP); animais após procedimento de castração cirúrgica (NPc e RPc); animais após suplementação subcutânea com 17 β -estradiol (NPE e RPE); animais após suplementação subcutânea com cipionato de testosterona (NPT e RPT). * indica $p < 0,05$ entre os animais NP e RP por tratamento separadamente.

Tabela 3. Análise histopatológica da próstata ventral dos diferentes grupos experimentais

Incidência	Grupos Experimentais							
	Veículo		Castrados		Estradiol		Testosterona	
	NP	RP	NPc	RPc	NPE	RPE	NPT	RPT
Metaplasia epitelial	2/18 (11%)	11/18* (61%)	1/18 (6%)	1/18 (6%)	3/18 (16%)	10/18 (55%)	0/18 (0%)	0/18 (0%)
Prostatite	1/18 (6%)	9/18* (50%)	3/18 (16%)	5/18 (28%)	9/18 (50%)	18/18* (100%)	0/18 (0%)	3/18 (16%)
Hiperplasia associada à inflamação	2/18 (11%)	7/18 (38%)	3/18 (16%)	3/18 (16%)	7/18 (38%)	15/18* (83%)	0/18 (0%)	1/18 (6%)

Os dados estão expressos como números absolutos e porcentagem de incidência. n = 3 campos histológicos de cada 6 animais por grupo. Animais controle (NP); animais submetidos a restrição proteica durante o desenvolvimento intrauterino (RP); animais após procedimento de castração cirúrgica (NPc e RPc); animais após suplementação subcutânea com 17 β -estradiol (NPE e RPE); animais após suplementação subcutânea com cipionato de testosterona (NPT e RPT). * indica $p < 0,05$ entre os animais NP e RP por tratamento separadamente.

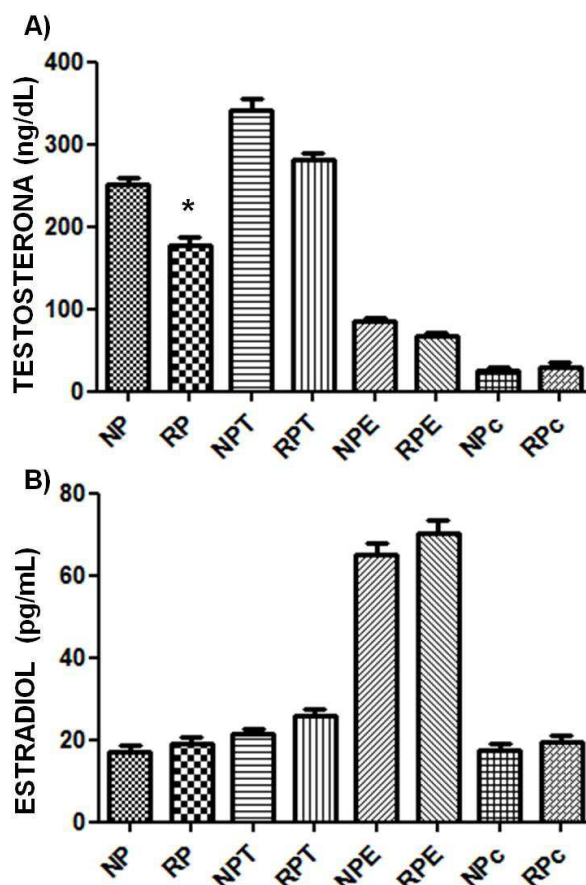


Figura 1. Gráfico apresentando os níveis séricos médios de testosterona (A) e estradiol (B) dos animais controle (NP) e dos animais submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP) que receberam veículo, animais NP e RP após castração cirúrgica (NPc e RPc) ou castração química com estradiol (NPE e RPE) ou suplementação hormonal com testosterona (NPT e RPT). Valores apresentados em média $\pm$ desvio padrão. * indica $p < 0,05$ entre os animais NP e RP por tratamento separadamente.

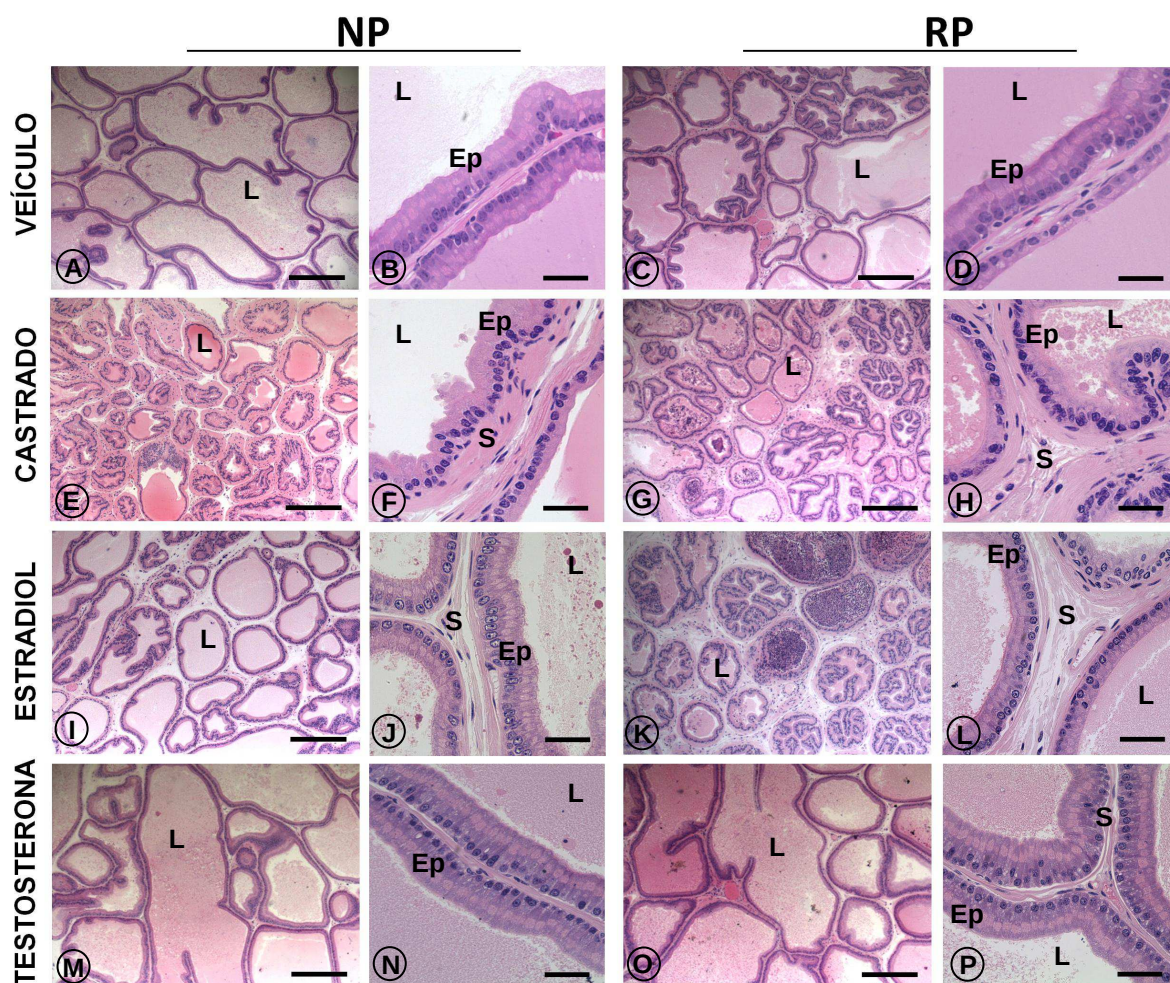


Figura 2. Imagens representativas de cortes histológicos do lobo prostático ventral dos diferentes grupos experimentais corados por H.E. Animais controle (NP) ou animais submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP) que receberam veículo (A-D), animais NP e RP após castração cirúrgica (E-H) ou castração química com estradiol (I-L) ou suplementação hormonal com testosterona (M-P). Notar diferenças no grau de atrofia glandular após castração cirúrgica e por tratamento com estradiol entre os animais NP e RP. Observar resposta funcional ao tratamento com testosterona nos dois grupos, evidente pela redução das dobras epiteliais e aumento do lúmen. Ep, epitélio; S, estroma; L, lúmen. Barra: A,C,E,G,I,K,M e O = 200 μ m; B,D,F,H,J,L,N e P = 30 μ m.

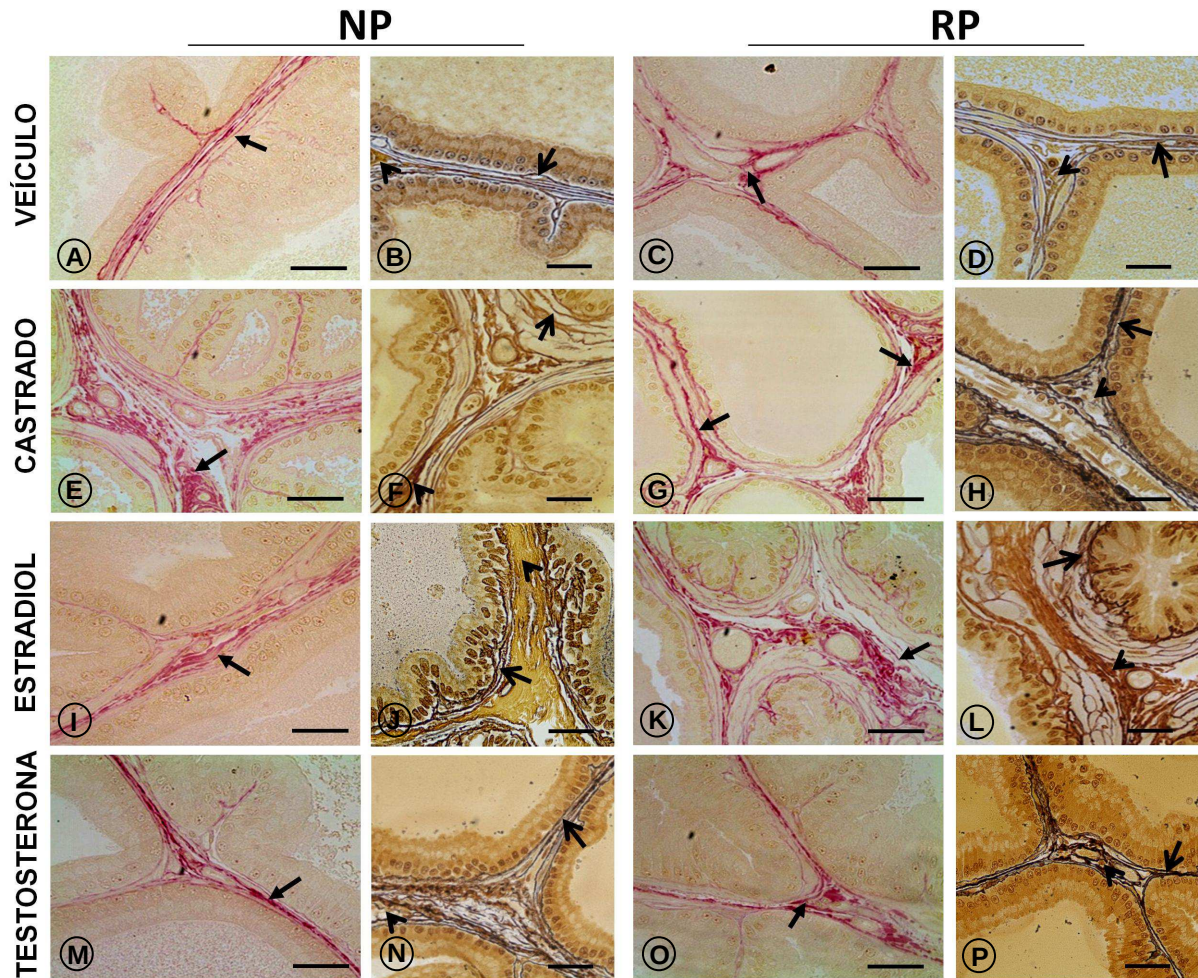


Figura 3. Imagens representativas de cortes histológicos do lobo prostático ventral dos diferentes grupos experimentais corados por picrossirius (A,C,E,G,I,K,M e O) ou pela impregnação por prata pela técnica da reticulina de Gomori (B,D,F,H,J,L,N e P). Animais controle (NP) ou animais submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP) que receberam veículo (A-D), animais NP e RP após castração cirúrgica (E-H) ou castração química com estradiol (I-L) ou suplementação hormonal com testosterona (M-P). A coloração de picossírius evidenciou as fibras colágenas do estroma peritubular e intersticial em vermelho (setas), enquanto que a reticulina de Gomori evidencia o colágeno tipo III em preto (setas), e as fibras colágenas do tipo I em marrom (cabeças de seta). Pode-se notar diferenças no grau de condensação das fibras colágenas após castração cirúrgica e por tratamento com estradiol entre os animais NP e RP. Barra = 30 μ m.

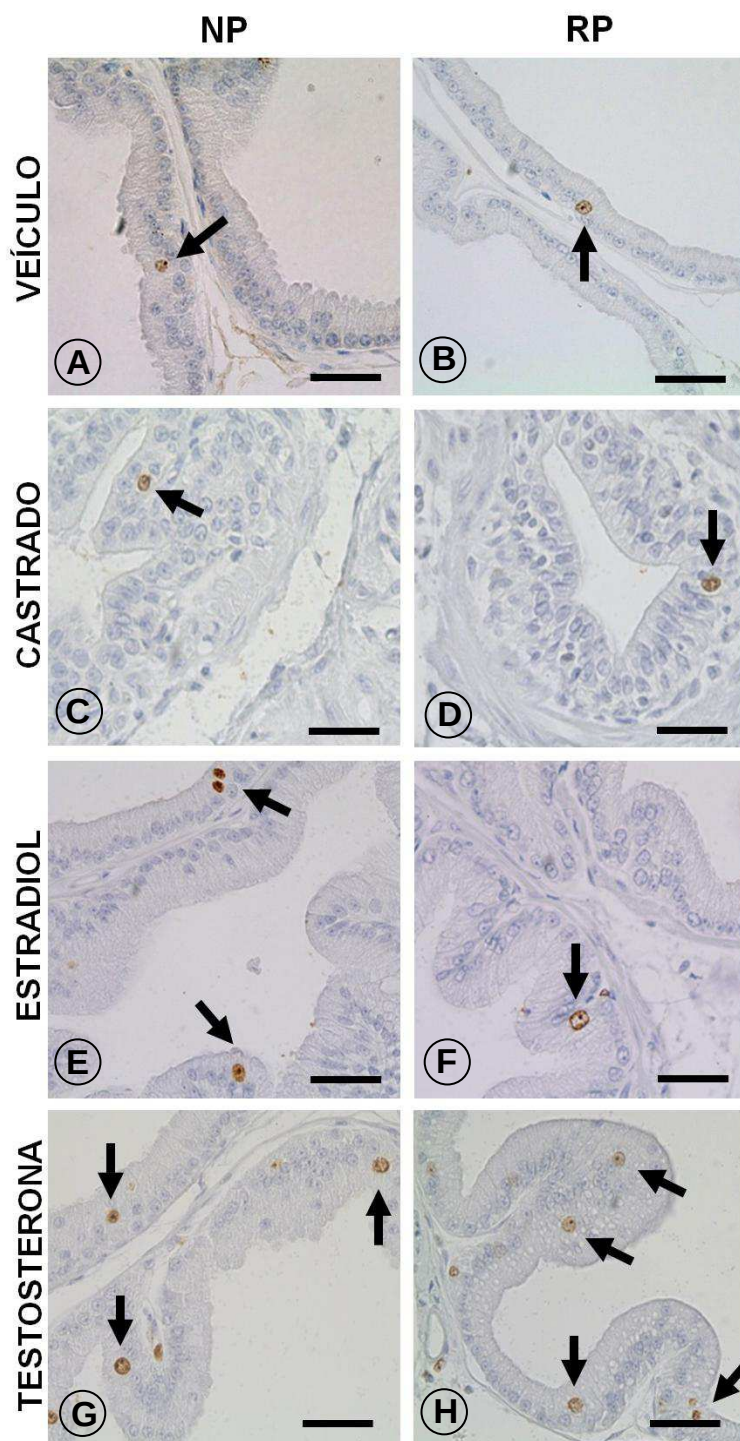


Figura 4. Imagens representativas da reação imuno-histoquímica para Ki-67 no lobo prostático ventral dos animais controle (NP) ou animais submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP) que receberam veículo (A-B), animais NP e RP após castração cirúrgica (C-D) ou castração química com estradiol (E-F) ou suplementação hormonal com testosterona (G-H). As setas apontam núcleos positivos para Ki-67, os quais estão presentes mesmo nos animais castrados e são mais abundantes nos animais tratados por testosterona. Barra = 30 μ m.

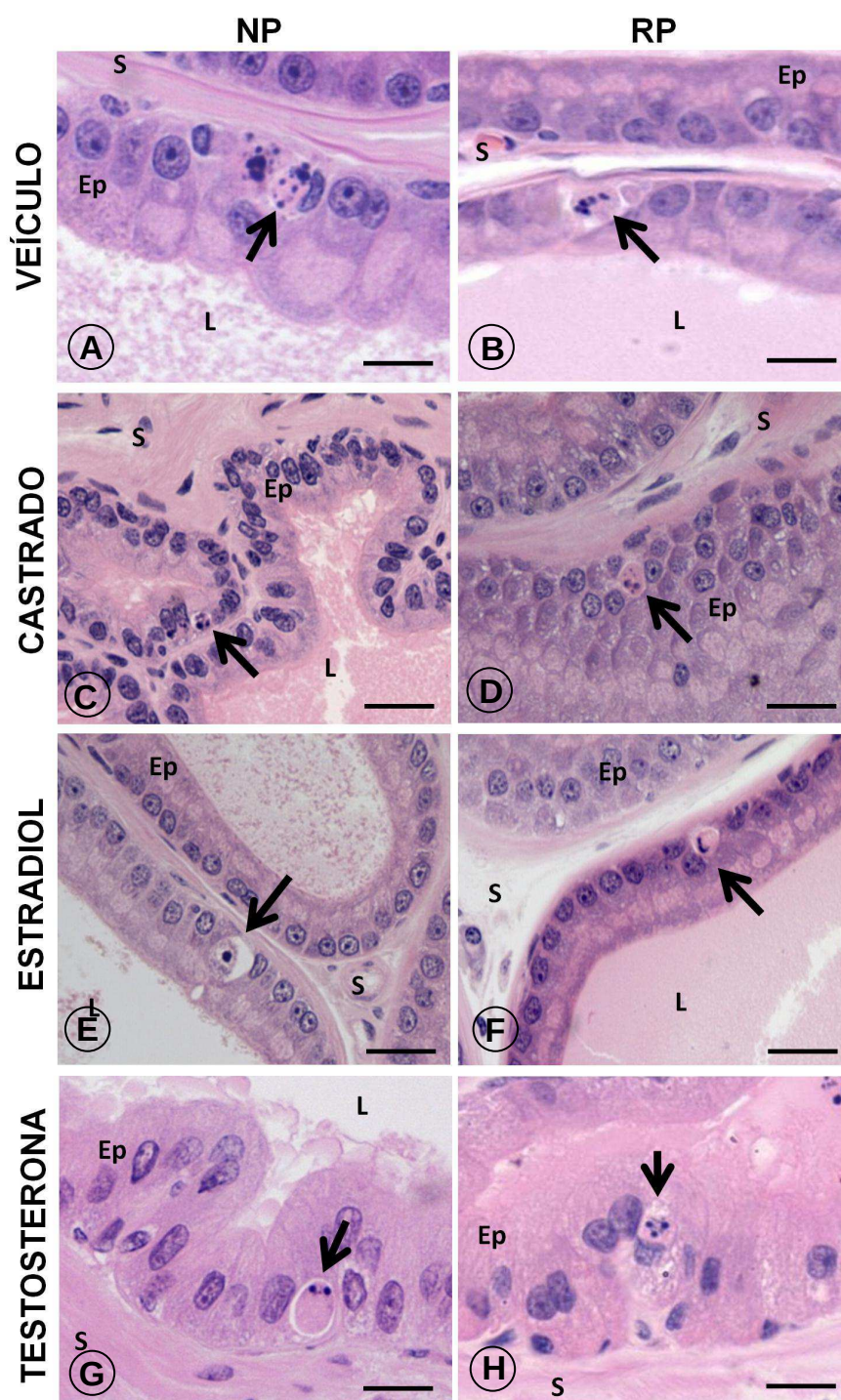


Figura 5. Imagens representativas do lobo prostático ventral coradas em H.E. dos animais controle (NP) ou animais submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP) que receberam veículo (A-B), animais NP e RP após castração cirúrgica (C-D) ou castração química com estradiol (E-F) ou suplementação hormonal com testosterona (G-H). As setas apontam células com típicos aspectos morfológicos de apoptose, os quais foram utilizados para contagem e determinação do índice apoptótico. Ep, epitélio; S, estroma; L, lúmen. Barra = 20 μ m.

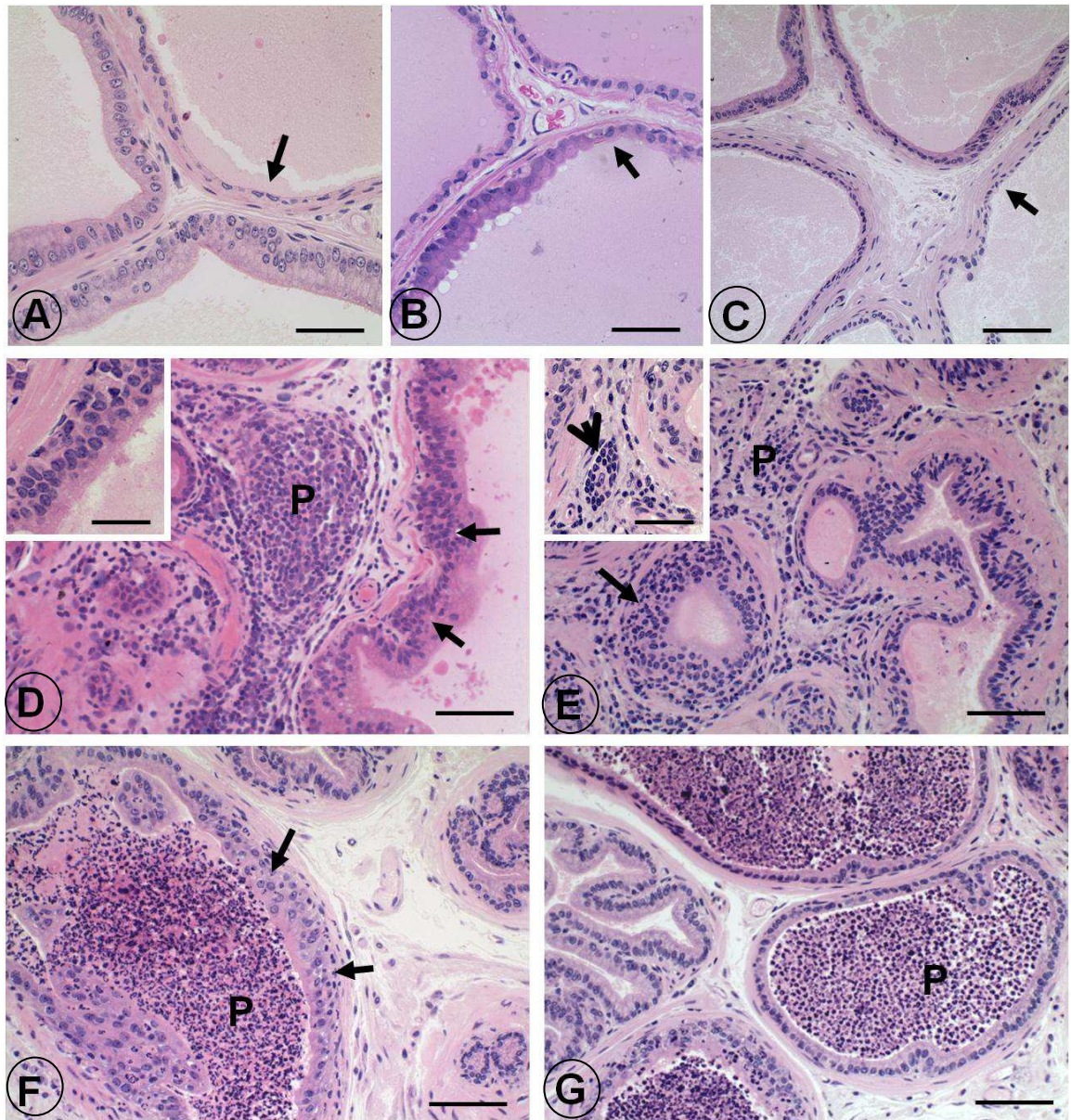


Figura 6. Imagens representativas do lobo prostático ventral coradas em H.E. dos animais controle ou NP (A), animais submetidos a restrição proteica durante a gestação ou RP (B), animais RP após castração química com estradiol (C-F) e animais NP após castração química com estradiol (G). (A-C) As setas apontam área de epitélio metaplásico. (D-E) Infiltrado inflamatório ou prostatite (P) no compartimento estromal. As setas indicam hiperplasia epitelial reativa à prostatite que pode ser melhor visualizada no detalhe em D. Em E, o detalhe demonstra as células inflamatórias em arranjo nodular. (F-G) Presença de prostatite (P) do lúmen acinar. As setas indicam hiperplasia epitelial reativa à prostatite. Barra: A-C, detalhe em D e E = 30 μ m; D-G = 100 μ m.

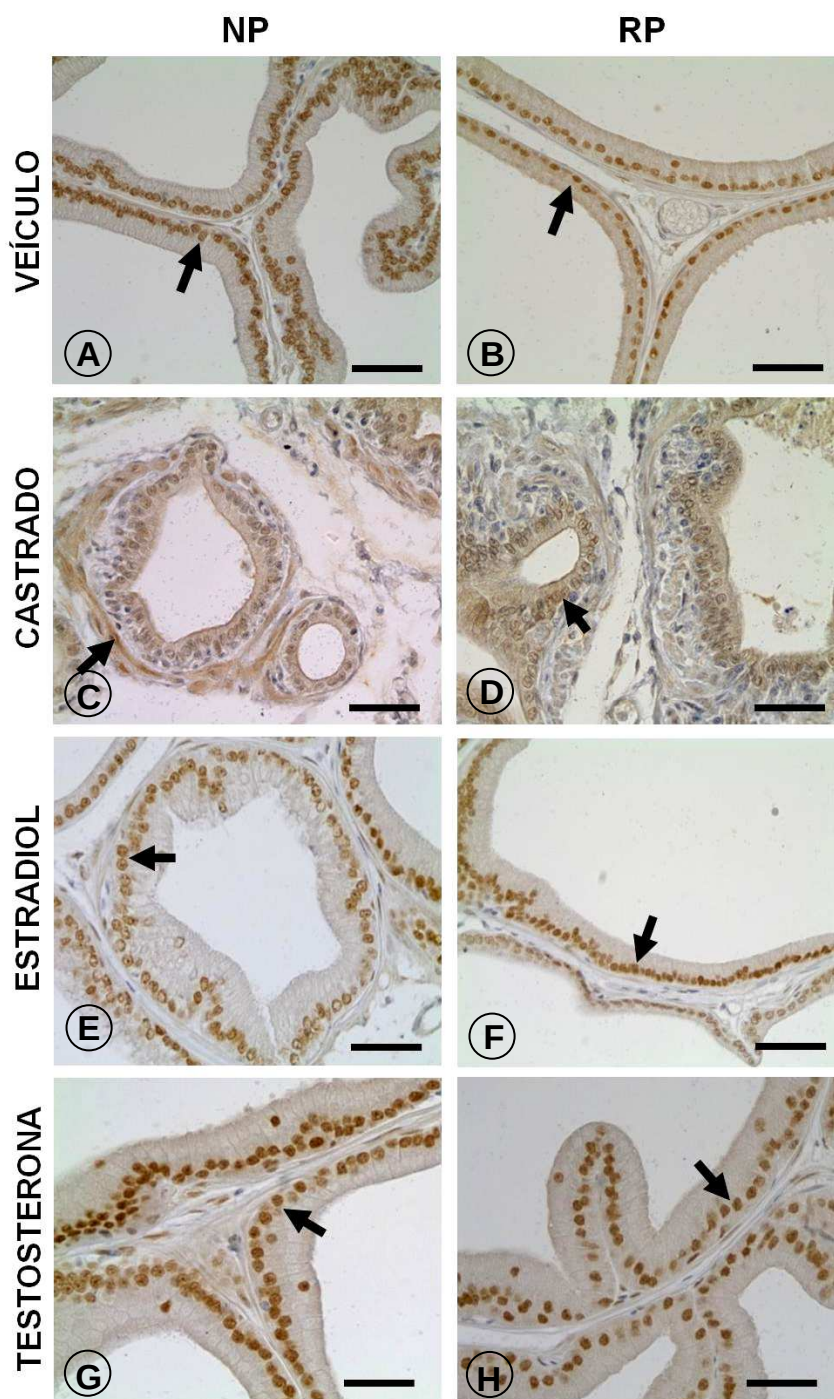


Figura 7. Imagens representativas da reação imuno-histoquímica para receptor de andrógeno (AR) no lobo prostático ventral dos animais controle (NP) ou animais submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP) que receberam veículo (A-B), animais NP e RP após castração cirúrgica (C-D) ou castração química com estradiol (E-F) ou suplementação hormonal com testosterona (G-H). As setas apontam células AR-positivas. Pode-se notar que, após a castração cirúrgica, a intensidade da reação nuclear do AR é significativamente reduzida e que o AR aparece no citoplasma e nas células estromais em ambos os grupos, mas principalmente no grupo NP. Barra = 30 μ m.

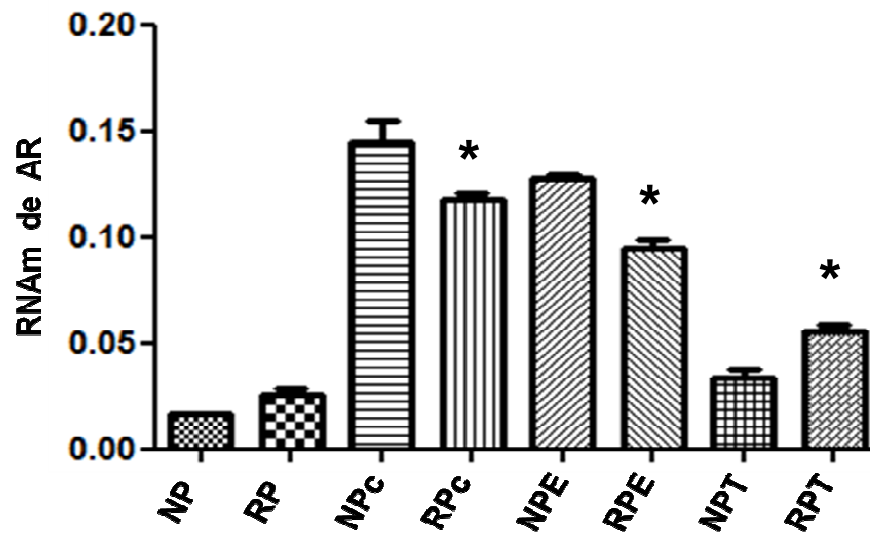


Figura 8. Análise de RT-qPCR dos níveis de RNAm do AR da PV dos animais NP (controle) e RP (submetidos a restrição proteica durante a gestação) após castração cirúrgica (NPc e RPc), castração química com estradiol (NPE e RPE) ou suplementação hormonal com testosterona (NPT e RPT). Nota-se um significativo aumento dos níveis de RNAm de AR após a castração cirúrgica e tratamento com estradiol, o qual é significativamente menor na PV dos animais RP. Por outro lado, após o tratamento com testosterona, os níveis de RNAm do AR são maiores nos animais RP. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. * indica $p < 0,05$ entre os animais NP e RP por tratamento separadamente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Experimentos em animais relacionados à programação nutricional são importantes no sentido de corroborar a hipótese proposta por *Barker et al. (1994)*. Nossos experimentos demonstram que a deficiência de um único grupo de nutrientes (proteína) foi suficiente para promover a programação fetal, com consequências para o sistema reprodutor masculino, em especial para a próstata.

As principais consequências da PFG na prole de machos foram a diminuição de peso corpóreo ao nascimento, recuperado somente na idade adulta e a diminuição da DAG, a qual revela que o desenvolvimento de órgãos dependentes de andrógenos, como é o caso da próstata, foram afetados.

Avaliando os impactos da PFG sobre a próstata, foi identificado que este tipo de insulto promove atraso do desenvolvimento, crescimento e maturação prostática, alterando permanentemente a estrutura glandular. A PFG também altera o padrão de resposta aos hormônios sexuais na vida adulta, com consequente aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões proliferativas e inflamatórias.

Considerando o conjunto de resultados obtidos neste trabalho, mas principalmente, a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões, maior número de células basais, menor expressão do receptor de andrógeno e uma alterada resposta à exposição exógena aos hormônios sexuais, podemos concluir que os animais programados pela PFG apresentam características de animais que sofreram *imprinting* estrogênico.

Populações vulneráveis à programação fetal por restrição proteica devem também estar atentas para questões de saúde do sistema reprodutor e urogenital masculino.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (INTRODUÇÃO)

obs: estão de acordo com as normas Vancouver.

Abdollah F, Briganti A, Suardi N, Castiglione F, Gallina A, Capitanio U *et al.* Metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia: evidence of a potential relationship, hypothesized etiology, and prevention. *Korean J Urol.* 2011;52(8):507-16.

Arrighi S, Aralla M, Genovese P, Picabea N, Bielli A. Undernutrition during fetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats. *Theriogenology.* 2010;74(9):1661-9.

Atanassova N, McKinnell C, Turner KJ, Walker M, Fisher JS, Morley M *et al.* Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology.* 2000;141(10):3898-907.

Augusto TM, Felisbino SL, Carvalho HF. Prostatic remodeling after castration involves heparanase activation. *Cell Tissue Res.* 2008;2:307-15.

Aumüller G, Seitz J. Protein secretion and secretory process in male accessory Sex gland. *Int Rev of Citol.* 1990;121:127-231.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol.* 2003;18:733-6.

Barker DJP, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth MEJ. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 1989;298:564-7.

Bennis-Taleb N, Remacle C, Hoet JJ, Reusens B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr.* 1999;129(8):1613-9.

Berry PA, Maitland NJ, Cllins AT. Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;288:30-7.

Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology.* 2001;142(7):2841-53.

Bostwick DG, Brawer MK. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer.* 1987;59:788-94.

Bostwick DG, Cooner WH, Denis L, Jones GW, Scardino PT, Murphy GP. The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. *Cancer.* 1992;70:291-301

Bostwick DG. Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. *Eur Urol.* 1996;30:145-52.

Brameld JM, Buttery PJ, Dawson JM, Harper JM. Nutritional and hormonal control of skeletal-mucle cell growth and differentiation. *Proc Nutr Soc.* 1998;57(2):107-117.

Brandes D. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int Rev Cytol.* 1966;20:207-76.

- Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP *et al.* Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest.* 1997;100(7):1768-74.
- Calder PC, Jackson AA. Undernutrition, infection and immune function. *Nutr Res Rev.* 2000;13(1):3-29.
- Carretero J, Vazquez G, Blanco E, Rubio M, Santos M, Martin-Clavijo A *et al.* Immunohistochemical evidence of the presence of aromatase p450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Res.* 1999;295(3):419-23.
- Carson C, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2003;61:2-7.
- Chan QK, Lam HM, Ng CF, Lee AY, Chan ES, Ng HK *et al.* Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. *Cell Death Differ.* 2010;17(9):1511-23.
- Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhau HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol.* 2005;173(1):10-20.
- Corbier P, Edwards DA, Roffi J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1992;100:127-31.
- Coupé B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(3):R813-24.
- Cunha GR, Bigsby RM, Coople PS, Sugmura Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. *Cell Diff.* 1985;17:137-48.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrinol Rev.* 1987;8:338-62.
- Cunha GR, Ricke W, Thomson, Marker P, Risbridger G, Hayward SW *et al.* Hormonal, cellular and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92:221-36.
- Czyż J, Szpak K, Madeja Z. The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nat Rev Urol.* 2012;9(5):274-82.
- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes.* 1991;40:115-20.
- Dasgupta S, Srinidhi S, Vishwanatha JK. Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: Molecular insights and future challenges. *J Carcinog.* 2012;11:4.
- De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA *et al.* Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology.* 2003;62 Suppl 5A:55-62.
- De Nunzio C, Aronson W, Freedland SJ, Giovannucci E, Parsons JK. The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases. *Eur Urol.* 2012;61(3):560-70.

- De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F *et al.* The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol.* 2011;60(1):106-17.
- Dejana E. Endothelial adherens junction implication in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1996;98:1949-53.
- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;88(1-3):15-22.
- Ellem SJ, Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen: Androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;118(4-5):246-51.
- Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Pré-natal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(6):E1702-14.
- Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res.* 2009;72(5):257-65.
- Gao F, Liu YC, Hou XZ. Effect of maternal undernutrition during late pregnancy on hormonal status and metabolic changes in neonatal lambs. *Czech J Anim Sci.* 2013;58(1):15-20.
- Gill-Sharma MK, Dsouza S, Padwal V, Balasinor N, Aleem M, Parte Pet *et al.* Antifertility effects of estradiol in adult male rats. *J Endocrinol Invest.* 2001;24(8):598-607.
- Gorbachinsky I, Akpınar H, Assimós DG. Metabolic syndrome and urologic diseases. *Rev Urol.* 2010;12:157-80.
- Graham S, Gandelman R. The expression of anogenital distance data in the mouse. *Physiol Behav.* 1986;36(1):103-4.
- Griffiths K, Morton MS, Nicholson RI. Androgens, androgens receptors, antiandrogens and treatment of prostate cancer. *Eur Urol* 1997;32:24-40.
- Habib S, Zhang Q, Baum M. Pré-natal programming of hypertension in the rat: Effect of postnatal rearing. *Nephron Extra* 2011;1:157-65.
- Hall BR. *Developmental Biology and Cellular Skeletal Biology.* New York: Academic; 1978.
- Harper CE, Patel BB, Cook LM, Wang J, Shirai T, Eltoum IA, *et al.* Characterization of SV-40 Tag rats as a model to study prostate cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:30.
- Hay ED. *Cell biology of the extracellular matrix.* New York: Plenum; 1981.
- Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod.* 1991;45(2):308-21.
- Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol.* 1997;79:18-26.
- Ho SM, Leung YK, Chung I. Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1089:177-93.
- Hsing AW, Reichardt JKV, Stanczyk FZ. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate.* 2002;52:213-35.

- Hu WY, Shi GB, Lam HM, Hu DP, Ho SM, Madueke IC *et al.* Estrogen-initiated transformation of prostate epithelium derived from normal human prostate stem-progenitor cells. *Endocrinology* 2011;152(6):2150-63.
- Huang L, Pu Y, Alam S, Birch L, Prins GS. Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl*. 2004;25(3):330-7.
- Huang L, Pu Y, Hu WY, Birch L, Luccio-Camelo D, Yamaguchi T, Prins GS. The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol*. 2009;328:188-99.
- Hudson DL, Guy AT, Fry P, O'Hare MJ, Watt FM, Masters JRW. Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: Identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(2):271-8.
- Imperato-McGinley J, Zhu YS. Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;198(1-2):51-9.
- Iwata T, Shultz D, Hicks J, Hubbard GK, Mutton LN, Lotan TL *et al.* MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in Mouse luminal epithelial cells. *Plos ONE*. 2010;5(2):e9427.
- Jarred RA, McPherson SJ, Bianco JJ, Couse JF, Korach KS, Risbridger GP. Prostate phenotypes in estrogen-modulated transgenic mice. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(4):163-8.
- Klink JC, Miocinovic R, Galluzzi CM, Klein EA. High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Korean J Urol*. 2012;53:297-303.
- Sharifi N, Auchus RJ. Steroid biosynthesis and prostate cancer. *Steroids*. 2012;77:719-26.
- Korach KS. Surprising places of estrogenic activity. *Endocrinology*. 1993;132(6):2277-8.
- Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract*. 2010;19(2):87-98.
- Langley-Evans SC, Sculley DV. Programming of hepatic antioxidant capacity and oxidative injury in the ageing rat. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(6-7):804-12.
- Lee C, Sensibar JÁ, Dudek SM, Hiipakka S, Liao S. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod*. 1990;43:1079-86.
- Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40:565-75.
- Lee VW, Bremner WJ, Cumming IA, de Kretser DM, Findlay JK. Effects of LH-RH infusion, castration and cryptorchidism on gonadotrophin and testosterone secretion in developing rams. *J Reprod Fertil Suppl*. 1981;30:111-8.
- Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas*. 2009;63:142-8.
- Lukacs RU, Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Witte ON. Isolation, cultivation and characterization of adult murine prostate stem cells. *Nat Protoc*. 2010;5(4):702-13.
- Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA *et al.* ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell*. 2010;17(4):319-32.

- Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 2003;253:165-74.
- McCarthy MM, Konkle AT. When is a sex difference not a sex difference? *Front Neuroendocrinol.* 2005;26(2):85-102.
- McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 2005;85:571– 633.
- McNeal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol.* 1986;17:64-71.
- Miki, J. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. *Int J Urol.* 2009;17:139-47.
- Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate.* 1996;28:124-8.
- Nonneman DJ, Ganjam VK, Welshons WV, Vom Sall FS. Intrauterine position effects on steroid metabolism and steroid receptors of reproductive organs in male mice. *Biol Reprod.* 1992;47:723-9.
- Noriega NC, Howdeshell KL, Furr J, Lambright CR, Wilson VS, Gray LE Jr. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats. *Toxicol Sci.* 2009;111(1):163-78.
- Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ, Platz EA, De Marzo AM, Isaacs WB, Neson WG. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis.* 2004;26:1170-81.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr.* 2001;130:2582-9.
- Price D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. *Nat Can Inst Monogr.* 1963;12:1-27.
- Prins GS, Birch L, Habermann H, Chang WY, Christopher T, Oliver P *et al.* Influence of neonatal estrogens on rat prostate development *Reprod Fertil Dev.* 2001;13:241-52.
- Prins GS, Tang WY, Belmonte J, Ho SM. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102(2):134-8.
- Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM. Developmental estrogen exposures predispose to prostatic carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol.* 2007;23(3):374-82.
- Prins GS, Birch L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology.* 1995;136(3):1303-14.
- Prins GS, Cooke PS, Birch L, Donjacour AA, Yalcinkaya TM, Siiteri PK *et al.* Androgen receptor expression and 5 alpha-reductase activity along the proximal-distal axis of the rat prostatic duct. *Endocrinology.* 1992;130(5):3066-73.

- Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*. 2008;73(3):233-44.
- Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson JA *et al*. Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*. 1998;139(3):874-83.
- Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. 2008;76:641-59.
- Prins GS. Developmental estrogenization of the prostate gland. In: Naz R, editor. *Prostate basic and clinical aspects*. New York: CRC;1997. p.245–63.
- Putz O, Schwartz CB, Kim S, LeBlanc GA, Cooper RL, Prins GS. Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: I. Effects on the prostate gland. *Biol Reprod*. 2001;65:1496-505.
- Qasem RJ, Yablonski E, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'mello AP. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav*. 2012;105(5):1182-93.
- Qian J, Wollan P, Bostwick DG. The extent and multicentricity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in clinically localized prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 1997;28:143-8.
- Ramos C da F, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJ. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl*. 2010;12:180-5.
- Reynolds AR, Kyprianou N. Growth factor signaling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 2:S144-52.
- Rittmaster RS, Fleshner EN, Thompson IM. Pharmacological Approaches to Reducing the Risk of Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2009;55:1064–74.
- Rivas A, Fisher JS, McKinnell C, Atanassova N, Sharpe RM. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: Evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinology*. 2002;143(12):4797-808.
- Robinson JJ, Sinclair KD, McEvoy TG. Nutritional effects on fetal growth. *Anim Sci*. 1999;68:315-31.
- Rochel-Maia SS, Santos FC, Alonso-Magdalena P, Góes RM, Vilamaior PS, Warner M *et al*. Estrogen receptors alpha and Beta in male and female gerbil prostates. *Biol Reprod*. 2013;88(1):7.
- Rodríguez-González GL, Viguera-Villaseñor RM, Millán S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz F *et al*. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J Dev Orig Health Dis* 2012;3(5):321-6.
- Roy-Burman P, Wu H, Powell WC, Hagenkord J, Cohen MB. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11(2):225-54.

- Santos AM, Ferraz MR, Teixeira CV, Sampaio FJ, da Fonte Ramos C. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. *Horm Metab Res.* 2004;36(1):27-33.
- Santti R, Newbold RR, Mäkelä S, Pylkkänen L, McLachlan JA. Developmental estrogenization and prostatic neoplasia. *Prostate.* 1994;24(2):67-78.
- Schauer IG, Rowley, DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82:200-10.
- Sciarra A, Di Silverio F, Salciccia S. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link. *Eur Urol.* 2007;52:964-72.
- Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(6):479-88.
- Shabsigh A, Tanji N, D'Agate V, Burchardt T, Burchardt M, Hayek O *et al.* Vascular anatomy of the rat ventral prostate. *Anat Rec.* 1999;256:403-11.
- Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Itmann MM, Rubin MA *et al.* 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 Res.* 2004;64:2270-305.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:10-29.
- Steers W. 5-alpha-reductase activity in the prostate. *Urology.* 2001;58 Suppl 6A:17-24.
- Stoker TE, Robinette CL, Cooper RL. Perinatal exposure to estrogenic compounds and the subsequent effects on the prostate of the adult rat: Evaluation of inflammation in the ventral and lateral lobes. *Reprod Toxicol.* 1999;13(6):463-72.
- Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM. Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(8):946-55.
- Takeda I, Lasnitzki I, Mizuno T. Analysis of prostatic bud induction in by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. *J Endocrinol.* 1986;110:467-70.
- Takeda I, Suematsu N, Mizuno T. Transcription of prostatic steroid binding protein (PSBP) gene is induced by epithelial-mesenchymal interaction. *Development.* 1990;110:273-81.
- Teixeira CV, Silandre D, de Souza Santos AM, Delalande C, Sampaio FJ *et al.* Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol.* 2007;192(2):301-11.
- Timms GB, Hofkamp LE. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82:173-83.
- Timms GB, Mohs TJ, Didio LJ. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J Urol.* 1994;151:1427-32.
- Timms GB, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(19):7014-9.

- Tomas D, Spaji CB, Milosevic M, Demirovic A, Marusic Z, Ruslin B. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence free survival in prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol*. 2010;44(5):284-90.
- Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L, Hanson MA. Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol*. 2003;547:77-84.
- Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GR, Rowley DR. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res*. 2002;62(11):3298-307.
- Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*. 2001;166 (6): 2472-83
- Un-no T, Hayami S, Nobata S, Sudoko H, Honma S, Fujita K *et al*. Neonatal exposure to estrogen in the Wistar rat decreases estrogen receptor-beta and induces epithelial proliferation of the prostate in the adult. *Urol Int*. 2007;79:345-51.
- Van Weissenbruch MM, Engelbregt MJ, Veening MA, Van Weissenbruch HA. Fetal nutrition and timing of puberty. *Endocr Dev*. 2005;8:15-33.
- Vermeulen A. Testosterone in plasma. A physiopathological study. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 1973;35(2):95-180.
- Vilamaior PS, Felisbino SL, Taboga SR, Carvalho HF. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *Prostate*. 2000;45:253-8.
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*. 1979;17(2):159-63.
- Wang Z, Luque RM, Kineman RD, Ray VH, Christov KT, Lantvit DD *et al*. Disruption of growth hormone signaling retards prostate carcinogenesis in the Probasin/Tag rat. *Endocrinology*. 2008;149(3):1366-76.
- Weihua Z, Lathe R, Warner M, Gustafson JA. An endocrine pathway in the prostate, ER β , AR, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol and CYP7B1, regulates the prostate growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(21):13589-94.
- Weinstein MH, Epstein J. Significance of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy. *Hum Pathol*. 1993;24:624-9.
- Welsh M, Saunders PT, Fisker M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB *et al*. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest*. 2008; 118(4):1479-90.
- Wu JD, Haugk K, Woodke L, Nelson P, Coleman I, Plymate SR. Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. *J Cell Biochem*. 2006;99:392-401.
- Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L *et al*. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol*. 2005;563:275-84.
- Zeng L, Kyprianou N. Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2005;8(1):7-13.

ANEXO I



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **69/08-CEEA**, sobre “Programação fetal por restrição protéica in útero: alterações morfofuncionais na próstata ventral do rato Wistar”, sob a responsabilidade de **SÉRGIO LUIS FELISBINO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de **02/10/2008**.

Botucatu, 2 de outubro de 2008.



Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA



NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA

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

ANEXO II

Imagens do protocolo experimental executado no experimento apresentado no capítulo II



Figura 1. Fotos do procedimento cirúrgico de inserção dos implantes subcutâneos nos animais controle (NP) ou submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP) no dia pós-natal 120. **(A-C)** Embalagens contendo os implantes estéreis constituídos por matriz biodegradável (Innovative Research of America, Inc. Sarasota, Flórida). Os implantes promovem liberação diária de 0,8 mg de propionato de testosterona e 0,08 mg de 17β -estradiol. **(D)** Posicionamento do rato na mesa cirúrgica seguida de tricotomia da região dorsolateral direita. **(E)** Incisão de 0,6 cm acompanhada de divulsão dos tecidos. **(F)** Procedimento de inserção dos implantes na loja cirúrgica. **(G)** Retalho cirúrgico reposicionado e suturado com fio de nylon (Nylon[®] 4.0, Ethicon), deixando os implantes completamente submersos.

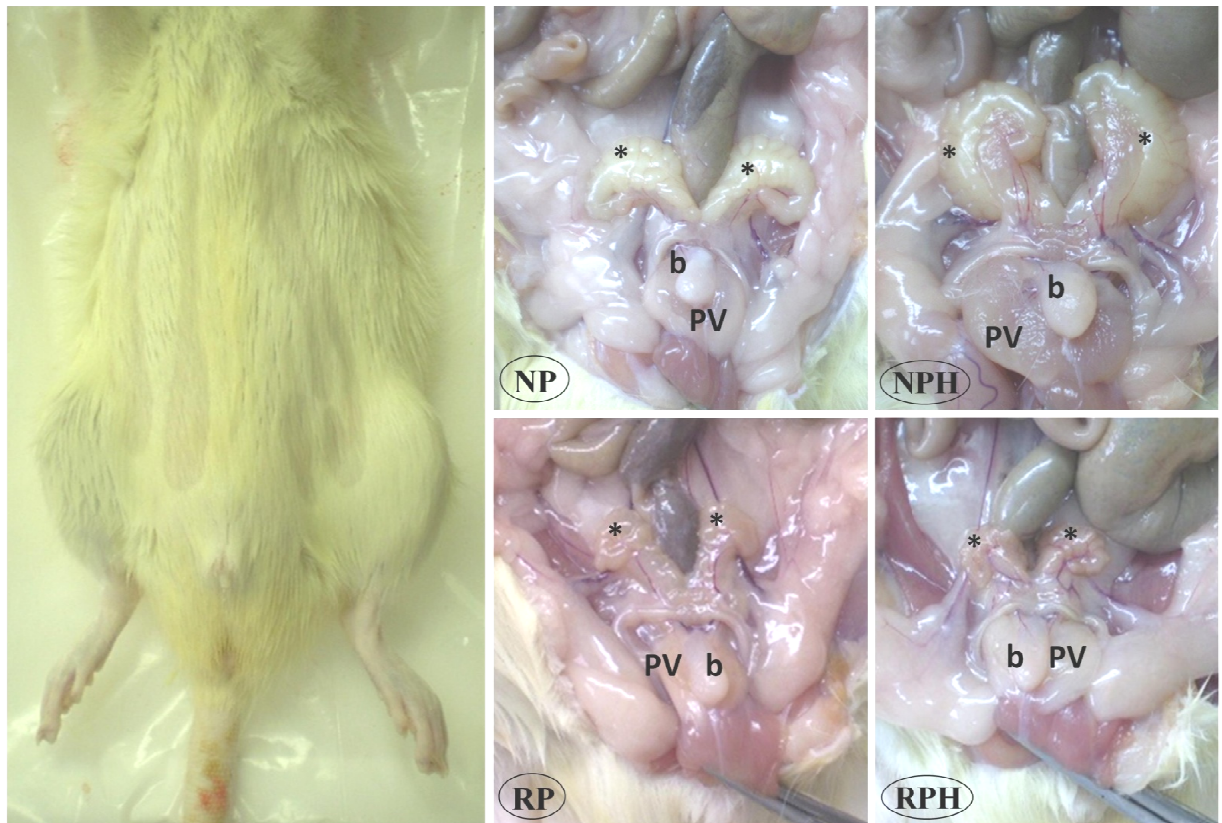


Figura 2. Imagens obtidas no dia do sacrifício e coleta dos órgãos da reprodução. Observe posicionamento do animal antes da abertura cirúrgica da cavidade peritoneal (a direita). Após incisão e divulsão dos tecidos, observa-se as vesículas seminais (*), próstata ventral (PV) e bexiga urinária (b) dos animais controle (NP), animais submetidos a restrição proteica durante a gestação (RP), animais NP e RP após exposição hormonal (NPH e RPH respectivamente) através dos implantes de testosterona e estradiol (T+E). Note os efeitos da programação fetal por restrição proteica gestacional e da exposição combinada de T+E sobre o aspecto macroscópico das vesículas seminais e da próstata ventral dos animais.

Anexo III

Estágio de doutorado realizado na *University of Illinois at Chicago, USA, UIC Medical Center, Urology Department, Andrology Laboratory*



1. Universidade de Ilinóis em Chicago

Ilinóis é um dos 50 estados dos Estados Unidos, localizado na Região Centro-Oeste do país, no qual Springfield é a capital do estado. Ilinóis é o quinto estado mais habitado do país, sendo que 65% da população vive na região metropolitana de Chicago, o segundo maior centro de manufatura do país (atrás somente de Los Angeles) e o segundo maior centro financeiro dos Estados Unidos (atrás somente de Nova Iorque). A primeira instituição de educação superior de Ilinóis foi a *Faculdade de Ilinóis*, fundada em 1809, em Jacksonville. Atualmente, o estado possui 175 diferentes instituições de ensino superior, dos quais 60 são públicas e 115 são privadas. A maior instituição de educação superior do estado é o *Sistema de Universidades de Ilinóis*. Particularmente a UIC (*University of Illinois at Chicago*) é uma das universidades mais procuradas por estrangeiros pois caracteriza-se pela alta qualidade de ensino e pesquisa. Como uma das 200 melhores instituições de pesquisa do mundo, a UIC concentra atualmente 15 faculdades acadêmicas, incluindo o Colégio de Medicina, o maior dos EUA, que educa um em cada seis médicos no país. A UIC foi criada em 1982 pela fusão de várias faculdades privadas, incluindo o Colégio de Farmácia de Chicago, que abriu em 1859, o Colégio de Médicos e Cirurgiões (1882), e do Colégio Colombiano de Odontologia (1891). Através de sua história, a UIC tem sido líder no desenvolvimento de um novo modelo de ensino superior, sendo uma universidade que prioriza a pesquisa acima de tudo.



2. Dra. Gail Susan Prins

Dra. Prins é professora de urologia e fisiologia na escola de medicina da UIC. Ela é membro da Associação Americana de Banco de Tecidos, da Associação Americana de Medicina Reprodutiva, da Sociedade Americana de Andrologia e da Sociedade Americana de Urologia. Além disso, ela também é diretora do laboratório de andrologia do Departamento de Urologia e diretora do laboratório de ciências da reprodução do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, ambos na UIC. Através destes laboratórios, a Dra. Prins e seu grupo executam pesquisa e extensos serviços de diagnóstico e terapêutico de fertilidade masculina (espermograma, ensaios de penetração

do espermatozóide), bem como a preparação de amostras de sêmen para inseminação artificial terapêutica.

Com histórico científico invejável (20 anos de pesquisa), os principais enfoques de seus trabalhos são: controle hormonal do desenvolvimento da glândula prostática e efeitos da reprogramação celular através de estrogênios naturais e ambientais após o envelhecimento. Atualmente, a Dra. Prins tem fomento do Instituto Nacional de Ciência de Saúde Ambiental (NIEHS) intitulado: “Bases epigenéticas no processo da carcinogênese da próstata após exposição ao estrogênio”. Ela e seu grupo estão empenhados em identificar os genes responsáveis por aumentar a susceptibilidade ao câncer de próstata em indivíduos expostos ao estradiol durante a morfogênese prostática. Também objetivam caracterizar as vias celulares e moleculares pelo qual o estrogênio provoca o *imprinting* hormonal nas células prostáticas. Particularmente, o papel dos genes Wnt e Hox no controle do desenvolvimento normal e anormal da próstata (para mais detalhes: <http://www.uic.edu/labs/prins/index.htm>).

Recentemente, a Dra. Prins e seu grupo padronizaram o uso do “modelo humanizado” para estudo da carcinogênese prostática. Trata-se da formação de um organóide em cultura a partir da associação das células epiteliais prostáticas humanas e as células mesenquimais do seio urogenital de roedores. Após 24h de incubação em cultura sob estímulo androgênico, o organóide é implantado sob a cápsula do rim de camundongos NUDE e submetidos à exposição dos hormônios sexuais para indução de carcinogênese. Este modelo representa um grande progresso para a compreensão do papel dos hormônios sexuais na iniciação e promoção do câncer de próstata. Além disso, ele também permite efetuar testes terapêuticos contra o câncer, pois é possível avaliar celular e molecularmente, diversas vias de sinalização em um tecido cujo epitélio é de origem humana, expressando inclusive, o PSA.

A Dra. Prins é uma pesquisadora mundialmente conhecida por suas publicações envolvendo modelos de carcinogênese, exposição neonatal ao estradiol e ao bisfenol-A. Inclusive, o protocolo utilizado no experimento que gerou o segundo artigo desta tese (citado na seção resultados) foi baseado nos trabalhos da referida pesquisadora.

3. Aprendizado durante o estágio

O estágio de doutorado realizado no laboratório de Andrologia da Dra. Gail S Prins teve início em abril de 2012 e término em julho de 2012. Durante estes 3 meses tive oportunidade de participar de palestras ministradas aos pós-graduandos da UIC e do mini-curso intitulado “Manejo de animais de laboratório”. Além disso, pude acompanhar a rotina de diversos alunos e entrar em contato com diferentes técnicas e projetos. Nesse período foi possível aprender:

- confeccionar implantes de liberação lenta de hormônios (técnica padronizada pelo prof. Dr. Maarten Bosland);
- isolar, cultivar e caracterizar células-tronco prostáticas a partir de biópsias de próstata humana;
- coletar e dissecar próstata de ratos neonatos com intuito de analisar o crescimento da glândula em meio de cultura e avaliar a sua resposta à manipulação hormonal (exposição ao estradiol, testosterona, E+T, bisfenol-A) por 5 ou 10 dias;
- formação de organóide para execução do rinoimplante (modelo humanizado), uma das técnicas mais inovadoras da atualidade para avaliar a resposta das células epiteliais humanas a diferentes drogas candidatas a ação anti-tumoral (Fig. 1);
- técnica de MTT para avaliar toxicidade e proliferação celular;
- técnicas de western blotting e PCR para análise da expressão proteica e gênica.

Também foi possível apresentar parte dos resultados dessa tese para a Dra. Gail S Prins e para o Dr. Maarten C Bosland, que me ajudaram a analisar e classificar as lesões observadas, e com quem pude discutir idéias para a próxima etapa desse projeto, a ser desenvolvido na forma de pós-doutorado.

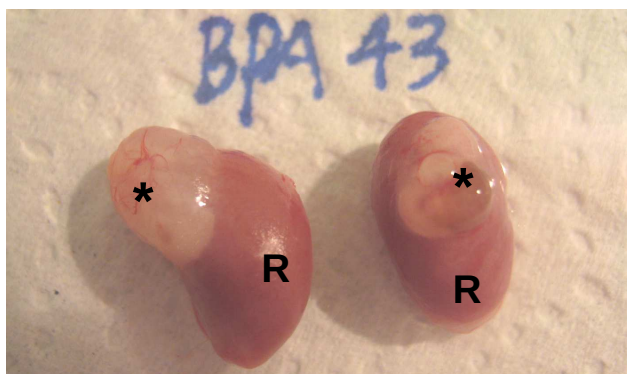


Figura 1. Imagem do organóide (*) crescendo abaixo da cápsula do rim (R). Este rinoimplante foi coletado de animal exposto ao bisfenol-A (BPA) por via oral.

O responsável pela orientação em laboratório foi o Dr. Guambin Shi, pós-doutorando do laboratório e cujo projeto em desenvolvimento tem como objetivo elucidar se o estradiol e o hormônio do crescimento (GH) interferem na capacidade de autorrenovação e proliferação das células tronco/progenitoras prostáticas em tecido normal e no câncer.

Para obtenção destas células, cinco animais controle (ratos *wild type* ou *WT*) e cinco animais *knockout* para GH (ratos *Dwarf* ou *DW*) foram sacrificados, a PV e a PDL foram coletadas em placas contendo PBS. Imediatamente após a coleta as próstatas foram fragmentadas e incubadas em solução contendo collagenase 0,1% por 2h em estufa a 37°C. Todos os procedimentos foram executados em condições de assepsia, com material estéril e em câmara de fluxo laminar e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% com atmosfera úmida. Em seguida as amostras foram centrifugadas (4000 rpm por 5 min),

ressuspensas em PBS e cultivadas por 7 dias em placas de cultura de 6 poços com PrEGM (Lonza) (Fig. 2A-F). Após a primeira passagem celular, as células foram tripsinizadas (Fig. 2G-H) e congeladas a -80°C para posterior cultivo em sistema 3D (para mais detalhes: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914459>).

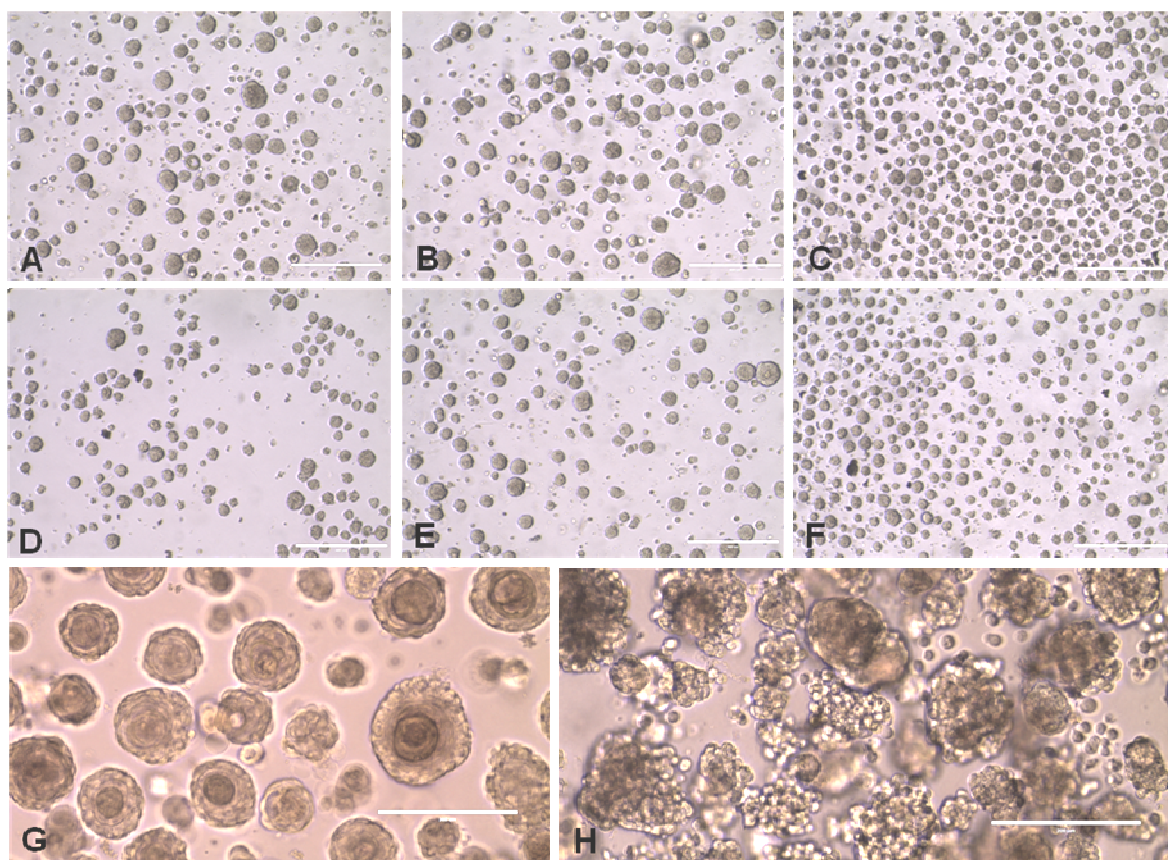


Figura 2. Cultura primária de células tronco/progenitoras do lobo prostático ventral (A,D), dorsal (B,E) e lateral (C,F) de rato controle (A-C) e *knockout* para hormônio do crescimento (D-F). (G) Detalhe das prostasferas formadas pelas células tronco/progenitoras após sete dias em cultura; (H) Foto após tripsinização das prostasferas para individualização celular. Barra: A-F=400 µm; G-H=200 µm.

Quando todas as amostras foram obtidas, as células foram descongeladas e ressuspensas em 1:1 matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA)/PrEGM (Lonza), plaqueadas em placas de 12 poços com 1 mL de PrEGM e cultivadas a 37°C em 5% CO₂. O meio foi trocado a cada três dias. A formação das prostasferas (colônia de células tronco/progenitoras) foram monitoradas em tempo real usando microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 e AxioCam (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood, NY). Após dez dias em cultura, o matrigel foi digerido em dispase (1mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA) por 30 min. As esferas foram resuspensas em tripsina 0,05% por 10 min, filtradas (40µm) e contadas.

Para investigar se as células tronco/progenitoras responderiam a exposição ao hormônio de crescimento, 1x10⁵ células foram coletadas, congeladas e submetidas ao protocolo de PCR em tempo real para a análise de expressão gênica de GHR e IgF-1R. O resultado desta análise está apresentado na Figura 3. Tanto a PV quando a PDL dos WT ou

DW apresentam expressão gênica de receptores ao GH. Entretanto, note que a expressão de GHR na PV foi semelhante entre os grupos, mas na PDL a expressão foi menor no DW. Já a expressão de IGF-1R foi maior tanto em PV quanto em PDL dos animais DW em relação aos animais WT.

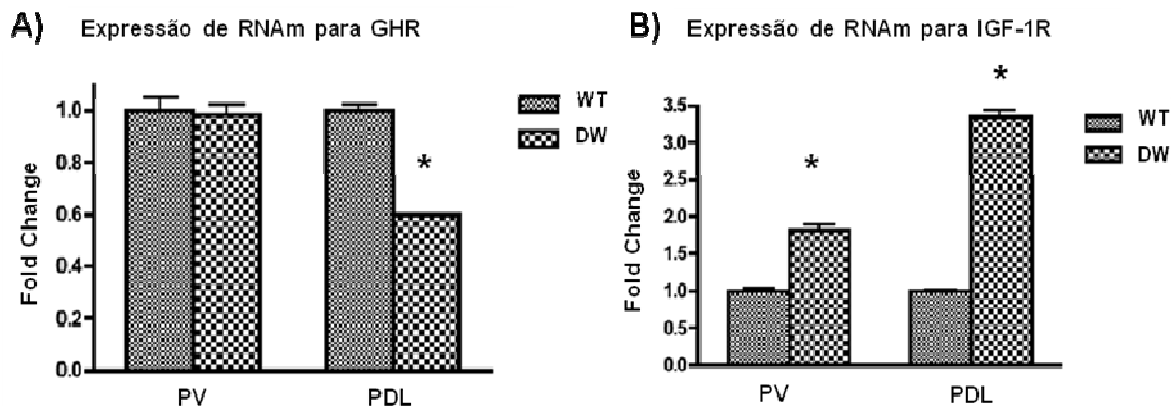


Figura 3. Análise da expressão gênica de receptor para hormônio de crescimento ou GHR **(A)** e receptor para fator de crescimento semelhante a insulina ou IGF-1R **(B)** em próstata ventral (PV) e dorsolateral (PDL) de ratos controle ou *wild type* (WT) e ratos *knockout* para GH ou *Dwarf* (DW).

Sabe-se que as células tronco/progenitoras tanto do rato controle quanto do *knockout* apresentam potencial de responder ao GH, o próximo passo foi avaliar o quanto estas células são responsivas ao GH. Para atingir esse objetivo, 1×10^5 células provenientes de PV e PDL do rato WT ou DW foram cultivadas durante 5 dias em meio PrEGM *free* (sem BPE, ou seja, qualquer hormônio de crescimento), em meio PrEGM contendo 10 nM de GH ou ainda contendo 100 nM de GH. Ao final do experimento, houve contagem do número de esferas em câmara de *newbauer*.

Os resultados deste teste demonstraram que a ausência de fator de crescimento no meio de cultura inviabilizou o crescimento celular e, portanto, não foi identificada a presença de prostasferas na placa. Mesmo quando adicionado GH no meio de cultura, as células tronco/progenitoras de PV controle não foram capazes de formar colônias e, portanto, também foram excluídas da contagem de prostasferas. O interessante é que a PV dos animais DW cresceram, formaram cerca de 3 mil colônias ou prostasferas independentemente da adição ou não de GH no meio de cultura. Outro resultado interessante refere-se ao padrão de resposta da PDL, note que enquanto a resposta das células tronco/progenitoras da PDL do rato DW foi dose dependente, no rato controle ela apresentou cerca de 2 mil colônias, independente da adição ou não do GH no meio (Fig. 4). Assim, estes resultados preliminares indicam que somente a PDL dos animais DW foram capazes de responder ao GH adicionado no meio de cultura.

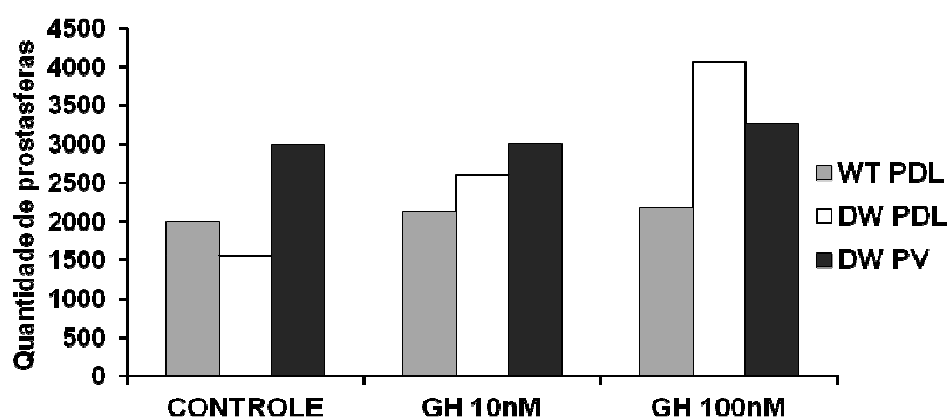


Figura 4. Gráfico apresentando a quantidade de colônias de células tronco/progenitoras (prostasferas) provenientes dos lobos prostáticos ventral (PV) ou dorsolateral (PDL) de animais controle (WT) e animais *knockout* para GH (DW) em meio de cultura PrEGM+BPE (controle) sem a adição de GH, com a adição de 10 nM ou 100 nM de GH.

4. Conclusões sobre o estágio

O estágio de doutorado realizado no laboratório da Dra. Prins me proporcionou uma importante experiência com cultura celular e a convivência com pesquisadores renomados, comprometidos com ciência de qualidade. As discussões semanais com a Dra. Prins, com o seu grupo de pesquisa e com outros colaboradores ensinaram-se que o sucesso e o diferencial das pesquisas em um país de primeiro mundo não se resumem apenas a infraestrutura e às facilidades financeiras, mas deve-se também à determinação e ao trabalho em grupo. E por fim, a execução deste projeto-piloto foi importante para o grupo da Dra. Prins, pois auxiliou a pesquisadora na aquisição de *grant* ou financiamento para um projeto a ser executado entre 2013-2018, projeto que avaliará o papel do GH, GHR e IGF-1R nas *cancer stem cells* durante o processo de carcinogênese.



Imagem de arquivo pessoal. Da esquerda para a direita: Dr. Guang-Bin Shi, Dr. Wen-Yang Hu, Lynn Birch (secretária), Dan-Ping Hu (técnica), Dra. Gail S Prins, Eu, Esther Calderon e Ikenna Madueke.



UNIVERSITY OF ILLINOIS AT CHICAGO

Date: June 30, 2012.
 From: Gail S. Prins, Ph.D.
 To: Jaqueline de Carvalho Rinaldi

Department of Morphology
 Institute of Biosciences
 São Paulo State University (UNESP)
 Distrito de Rubião Jr., S/N - P.O. Box 510
 Zip Code 18618-000 Botucatu - SP - Brazil

Student Intern Evaluation

This memo is written to formally describe the intern's relation with others, her communication skills and comments on intern's performance during the internship program. Jaqueline was a visiting research traineeship in my laboratory within the Department of Urology, University of Illinois at Chicago. The effective date for this position was April 1, 2012 through June 30, 2012.

Jaqueline is friendly and communicates well with everyone. She has spent time with all members of my lab eagerly learning their research projects and methods. She has the opportunity to work encompass both animal and human models and include whole animal and cell culture studies. Jaqueline spent several weeks with each lab member observing and performing actual hands-on lab techniques: RT-PCR, tissue and cell culture, immunohistochemistry, immunofluorescence, general histology, rodent surgeries, etc. She was given her own research project to start up. Specifically, to grow primary cultures of prostate epithelial cells and stem cells. The project also involved rat prostate tissue dissections. She has had the opportunity to present to my lab updates on her UIC research project as well as a talk on her own thesis research work.

This was an excellent opportunity to enhance her graduate research training and teach her new methodologies that she might use when she return to Brazil. Jaqueline has been an excellent member of our lab. She is a hard working and productive student. She quickly picks up new skills and she contributes to a positive atmosphere in my lab.

Gail S. Prins, PhD

Professor of Physiology
 College of Medicine
 Department of Urology (MC955)
 820 S. Wood Street
 Chicago, IL 60612-7316