



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Fabiola Choqueta de Tolêdo**

**“Restrição protéica *in utero*: desenvolvimento sexual e  
histofisiologia do sistema reprodutivo de ratos machos”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Fabiola Choqueta  
de Tolêdo  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,  
na área de Biologia Celular.

  
Orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

**Campinas, 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**T575r**

Tolêdo, Fabiola Choqueta de  
Restrição protéica *in utero*: desenvolvimento sexual e  
histofisiologia do sistema reprodutivo de ratos machos /  
Fabiola Choqueta de Tolêdo. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Wilma de Grava Kempinas.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dieta com restrição de proteínas. 2. Rato. 3.  
Reprodução animal. 4. Puberdade. 5. Espermatozoides.  
I. Kempinas, Wilma De Grava. II. Universidade Estadual  
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** *In utero* protein restriction: sexual development and histophysiology of the rat male reproductive tract.

**Palavras-chave em inglês:** Protein-restricted diet; Rats; Animal reproduction; Puberty; Spermatozoa.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Wilma De Grava Kempinas, Arielle Cristina Arena, Sérgio Luis Felisbino.

**Data da defesa:** 26/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 26 de fevereiro de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)



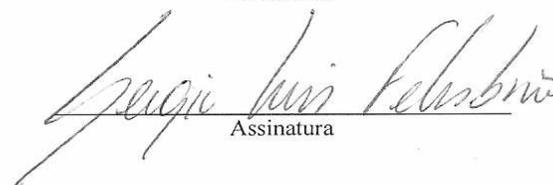
Assinatura

Profa. Dra. Arielle Cristina Arena



Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino



Assinatura

Profa. Dra. Estela Sasso Cerri

---

Assinatura

Profa. Dra. Raquel Fantin Domeniconi

---

Assinatura

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.*

*Fernando Pessoa*

## ***Dedicatória***

*Este trabalho é dedicado...*

*Aos meus pais João e Tereza e à minha irmã Alessandra que sempre apoiaram e torceram por mim, incondicionalmente. Sem o amor e o apoio deles nenhuma conquista da minha vida seria possível.*

*Ao meu grande amor, André, por ser meu porto seguro e meu estímulo para crescer em todos os momentos desta e de outras caminhadas. Obrigada por todo companherismo, compreensão, respeito, paciência e amor sem o qual não poderia ser totalmente feliz. Amo você.*

## *Agradecimentos*

*À Deus por ter permitido que o meu caminho cruzasse com o caminho de tantas pessoas maravilhosas. Foram tantos os momentos de satisfação e alegria que as dificuldades encontradas parecem tão insignificantes. Obrigada Pai.*

*À minha grande orientadora Wilma De Grava Kempinas, pela oportunidade, confiança, incentivo e amizade durante todos estes anos. Obrigada pelas broncas, elogios, força, preocupações, e, principalmente pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Serei eternamente grata.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.*

*Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.*

*À Lílian A. S. Panagio, secretária da pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, IB, Unicamp, por estar sempre pronta a nos ajudar.*

*Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu pela oportunidade oferecida para realização deste experimento.*

*Aos funcionários do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu pela colaboração.*

*Ao técnico do Laboratório de Embriologia, José Eduardo, por sempre estar pronto a ajudar.*

*À Dra Janete Aparecida Anselmo Franci e ao Dr. Ruither de Oliveira Gomes Carolino do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP, pela colaboração nas análises hormonais.*

*Aos técnicos do Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu pelo auxílio na produção das rações.*

*Aos professores Edson Rosa Pimentel, João Ernesto de Carvalho, Shirlei Maria Recco-Pimentel, Mary Anne Heidi Dolder por terem feito parte de minha banca de qualificação, me ajudando a crescer profissionalmente.*

*Aos professores Luis Fernando Barbisan, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira e Arielle Cristina Arena pela avaliação prévia deste trabalho, colaborando para o enriquecimento do mesmo.*

*À professora Patrícia Aline Bôer pela colaboração na execução deste projeto.*

*Aos animais utilizados por terem cedido suas vidas para realização deste estudo, e que esses resultados sejam suficientemente sólidos para mostrar a importância da nutrição materna sobre o desenvolvimento do sistema reprodutivo dos descendentes.*

*À minha mãe, meu pai e minha irmã que com todo esforço sempre me ajudaram a vencer os desafios.*

*À toda minha família, cunhados, sogros, tios, tias, primos e primas que mesmo com toda distância sempre fizeram parte da minha vida.*

*Aos amigos do laboratório Reprotox Ana Sílvia, Ana Luisa, Daniela, Carlinha, Denise, Fernanda, Luís, Nilson, Thais, pela colaboração e principalmente pelos momentos maravilhosos que passamos juntos. Agradeço a Flavinha pela amizade e por todos os momentos compartilhados durante o desenvolvimento deste projeto. Em especial, agradeço as minhas grandes e eternas amigas do laboratório Ana Paula, Carla, Juliana, Glaura e Marina pela amizade, alegria, força, carinho e ensinamentos. Vocês fazem parte desta vitória. Levarei no coração um pedacinho de cada uma. Amo vocês!*

*“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas quando parte, nunca vai só nem nos deixa a sós. Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si mesmo”.*

*(Khalil Gibran)*

## SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>01</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>03</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>05</b>
<b>2. Objetivo .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Capítulo .....</b>	<b>17</b>
<b>Artigo 1 .....</b>	<b>18</b>
<b>Artigo 2 .....</b>	<b>45</b>
<b>4. Conclusões Finais .....</b>	<b>79</b>
<b>5. Referências da Introdução .....</b>	<b>80</b>

## RESUMO

Nos últimos anos vem aumentando o reconhecimento mundial sobre a relevância da nutrição como pilar básico para o desenvolvimento econômico e social. Em países em desenvolvimento como o Brasil, por exemplo, a desnutrição é um problema sócio-econômico causado pela má alimentação e pela baixa renda. O nascimento de crianças com baixo peso é reconhecido como um importante problema de saúde pública, com efeitos devastadores no desenvolvimento, na sobrevivência e na saúde humana. Milhares de crianças têm seu crescimento retardado pela má nutrição, no entanto poucos trabalhos relacionam a desnutrição protéica materna e o desenvolvimento do sistema reprodutor. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o impacto da desnutrição protéica *in utero* sobre parâmetros morfofuncionais do trato reprodutivo masculino em diferentes fases do desenvolvimento sexual: pré-puberal, peripuberal e adulta, assim como sobre a instalação da puberdade em filhotes fêmeas, utilizando o rato como modelo experimental. Para tanto, foram obtidas ratas prenhes e divididas em dois grupos experimentais: grupo que recebeu ração padrão (n=12, grupo RP, 17% de proteína) e grupo que recebeu ração hipoprotéica (n=16, grupo RH, 6% de proteína) durante toda a prenhez. Durante a lactação os dois grupos experimentais receberam ração padrão. No 20º dia gestacional, 10 ratas (grupo RP n=4, grupo RH n=6) foram sacrificadas procedendo-se em seguida a laparotomia para avaliação da performance reprodutiva das progenitoras. As demais ratas prenhes (grupo RP n=8, grupo RH, n=10) foram mantidas para permitir o nascimento e amamentação dos filhotes. A restrição protéica provocou redução do peso placentário, aumento do consumo de ração das progenitoras durante o início da gestação e redução deste consumo no final da gestação e início da lactação. No entanto, esta variação no consumo de ração não foi suficiente para compensar o efeito da dieta hipoprotéica sobre o organismo materno e fetal, uma vez que o ganho

de peso das progenitoras durante a gestação e o peso dos filhotes nas diferentes fases do desenvolvimento apresentaram redução significativa. Os filhotes fêmeas do grupo RH tiveram aumento da distância anogenital, sugerindo um processo de masculinização do fenótipo feminino. Nos filhotes de ambos os sexos a restrição protéica *in utero* provocou atraso no início da puberdade. Nos filhotes machos a restrição protéica provocou redução do peso testicular na fase pré-puberal e no adulto provocou danos em alguns parâmetros morfofuncionais do sistema reprodutivo reduzindo o peso do ducto deferente, o número de células de Sertoli, a motilidade espermática, a produção diária de espermatozóides e a reserva espermática na cauda do epidídimo. Os níveis séricos de testosterona foram reduzidos em 27% quando comparado ao grupo RP. Por outro lado, a incidência de espermatozóides com anormalidades morfológicas e retenção de gota citoplasmática aumentou. Assim, conclui-se que a restrição protéica *in utero*, nestas condições experimentais, provocou restrição de crescimento, comprometeu o desenvolvimento sexual, atrasando o início da puberdade e provocando danos espermáticos no adulto.

## ABSTRACT

In the past few years the worldwide recognition of the relevance of nutrition as a basis for social and economic development has been growing. In developing countries such as Brazil undernutrition is a socioeconomic problem caused by poor nutrition and low income. The birth of children with low birth weight is considered an important public health problem, with devastating effects on human development, survival and health. Although millions of children have their growth retarded due to poor nutrition, few works relate maternal proteic undernutrition to the development of the reproductive system. Thus, the objective of the present work was to evaluate the impact of *in utero* proteic undernutrition on morphofunctional endpoints in the male reproductive tract during the following phases of sexual development: prepubertal, peripubertal and adult, as well as on the installation of puberty in the female pups, utilizing the rat as the experimental model. For this, pregnant female rats were obtained and divided into two experimental groups: one treated with standard chow (SC, n=12, 17% protein) and the other treated with hypoproteic chow (HC, n=16, 6% protein) throughout gestation. During the lactation period the two groups received standard chow. On the 20<sup>th</sup> gestational day 10 rats (SC n=4, HC n=6) were sacrificed and laparotomy was performed to evaluate maternal reproductive performance. The remaining pregnant rats (SC n=8, HC n=10) were left to deliver and nurse the offspring. The proteic restriction provoked reduction in the placental weight, increase in the maternal chow consumption at the beginning of pregnancy and reduction at the end of pregnancy and beginning of lactation. However, this variation in the chow consumption was not sufficient to compensate for the hypoproteic effect on the maternal and fetal organisms, since the maternal weight gain over gestation and the weight of the pups in the different phases of the development

were significantly reduced. The anogenital distance increased in the female pups of the HC group suggesting a process of masculinization of the female phenotype. In both sexes the *in utero* proteic restriction delayed pubertal installation. In the male offspring the proteic restriction caused reduction in the testicular weight at prepuberty and, at adulthood, damage to some of the morphofunctional endpoints of the reproductive system by reducing: the vas deferens weight, number of Sertoli cells, sperm motility, daily sperm production and sperm reserves in the epididymal cauda. Serum testosterone levels were lowered by 27% compared to the SC group. On the other hand, the incidence of sperm cells with morphological abnormalities and retention of the cytoplasmatic droplet increased. It was concluded that the proteic restriction *in utero*, in these experimental conditions, restricted growth, compromised the sexual development by delaying the beginning of puberty and led to damage in adulthood.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da morfologia e fisiologia do sistema reprodutor masculino do rato

No rato, o período crítico de desenvolvimento e diferenciação sexual do sistema reprodutor vai do 12º dia de gestação até o final da lactação (Sommer et al., 1996; Peterson et al., 1997; McIntyre et al., 2003).

O sistema reprodutor masculino do rato, assim como na maioria dos mamíferos, é composto por testículos (gônadas), epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais e órgão copulador.

Cada testículo pode ser, funcionalmente e anatomicamente, dividido em duas partes: tecido intersticial e túbulos seminíferos, responsáveis pela esteroidogênese e pela espermatogênese, respectivamente (Rodrigues & Favaretto, 1999). Os túbulos seminíferos são constituídos pelo tecido peritubular e epitélio seminífero composto pelas células de Sertoli e células germinativas (espermatogônias, espermátocitos e espermátides, em animais adultos). A espermatogênese é um processo elaborado pelo qual células-tronco espermatogoniais tornam-se células haplóides altamente diferenciadas, os espermatozóides (Clermont, 1972). O tecido intersticial fica entre os túbulos seminíferos e possui vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células intersticiais ou de Leydig responsáveis pela produção de andrógenos, principalmente testosterona a qual posteriormente pode ser convertida em uma variedade de outros esteróides (Russell *et al.*, 1990). A função testicular é regulada por uma série de relações entre o hipotálamo, a hipófise, os hormônios testiculares e o compartimento germinativo (Sokol, 1997).

Nos mamíferos em geral, incluindo o rato, os epidídimos são divididos anatomicamente em três regiões conhecidas como cabeça (com o segmento proximal), corpo e cauda (Reid &

Cleland, 1957). Estas porções são subdivididas histologicamente em zonas que são designadas de acordo com a altura do epitélio e a distribuição e quantidade dos tipos celulares. Seu epitélio pseudoestratificado ciliado possui seis tipos celulares: basais, principais, estreitas, halos, claras e apicais (Hermo & Robaire, 2002). Já se sabe que em todas as espécies que estão sendo estudadas é necessário que o espermatozóide passe pela região proximal do epidídimo para que ocorra o processo de maturação espermática (capacidade para motilidade, reconhecimento e penetração pela zona pelúcida do oócito) (Jones, 1999). Há evidências de que este processo de maturação ocorra pela ação de proteínas do epidídimo produzidas e secretadas sob controle de andrógenos (Orgebin-Crist & Jahad, 1978).

A vesícula seminal consiste de um ducto único muito dilatado e enovelado. Este ducto é revestido por um epitélio pseudo-estratificado pregueado, constituído por células epiteliais secretoras e células basais. A camada muscular lisa que reveste o órgão é constituída por duas lâminas: uma interna, de fibras circulares, e outra externa, de fibras longitudinais. A luz é ocupada pelo produto de secreção, de aspecto hialino (Hayward *et al.*, 1996a; 1996b).

A próstata é formada por um conjunto de glândulas tubuloalveolares ramificadas, cujos ductos desembocam na uretra prostática. O epitélio é colunar simples formado por células secretoras, basais e neuroendócrinas. Ela é envolta por uma cápsula fibroelástica rica em músculo liso, que envia septos para o interior da glândula. No homem, este órgão é compacto (alobular) apresentando três zonas: central, periférica e de transição. No rato, a próstata é dividida em quatro pares de lóbulos definidos como próstata anterior, dorsal, ventral e lateral (Roy-Burman *et al.*, 2004).

Os produtos de secreção da vesícula seminal e próstata contribuem para a nutrição e suporte dos espermatozóides fora do trato genital masculino. As funções destas glândulas são

dependentes de estímulo androgênico como a testosterona, que atua diretamente nos órgãos sexuais acessórios masculinos (Mann, 1974).

Os hormônios desempenham um papel vital para o início e a manutenção da função reprodutiva masculina (Meeker *et al.*, 2007). O GnRH liberado pelo hipotálamo age na hipófise estimulando a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). O FSH sustenta a espermatogênese dentro dos túbulos seminíferos e estimula a formação dos receptores de gonadotrofinas no testículo, enquanto o LH estimula as células intersticiais a produzir e secretar testosterona. A testosterona é necessária para o início da espermatogênese na puberdade, para sua manutenção na maturidade e para sua restauração em caso de supressão (Sharpe, 1994). O desenvolvimento pós-natal do sistema reprodutor masculino requer sinais hormonais do eixo hipotalâmico-hipofisário, uma subsequente resposta testicular e um feedback do testículo sobre o eixo para modular a liberação de gonadotrofina (Marty *et al.*, 2003).

Os testículos, epidídimos e as glândulas sexuais acessórias são órgãos andrógeno-dependentes e qualquer fator que atue desordenando a interação coordenada do eixo hipotálamo – hipófise – gônada pode levar a anormalidades reprodutivas (Sokol, 1997).

## **1.2 Puberdade no rato**

A puberdade é um período importante do desenvolvimento sexual, pois ocorre uma cascata de processos que levam à maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, tornando o indivíduo capaz de iniciar o ciclo reprodutivo da espécie. Durante a puberdade ocorrem mudanças no perfil hormonal, na síntese e secreção de esteróides em resposta ao aumento da pulsatilidade do GnRH e ao aumento da síntese e secreção de LH e FSH. Esse conjunto de alterações fornece ambiente adequado para que se inicie e se estabeleça o processo da

espermatogênese, levando à produção do gameta masculino (Ojeda & Urbanski, 1994). Assim, qualquer alteração nos eventos característicos desse período pode acarretar sérios prejuízos para a reprodução do indivíduo. Ainda segundo esses autores, os mecanismos que governam o início da puberdade no rato são melhor compreendidos nas fêmeas do que nos machos. Nas fêmeas a idade da abertura vaginal e ocorrência do primeiro estro são indicativos do início da puberdade que ocorre aproximadamente aos 35 dias de idade (US EPA, 1996, Crain *et al.*, 2008). Flutuações nos níveis de estrógeno e progesterona durante o ciclo estral, exercem profundo efeito na proliferação do epitélio e citodiferenciação dos órgãos do sistema reprodutor feminino (Boutin & Cunha, 1997) influenciando o crescimento, a função e a diferenciação destes órgãos.

A puberdade do rato macho tem início por volta dos 50 dias de idade (Robb *et al.*, 1978). No período compreendido entre 75 dias (máxima produção de espermatozóides) e 100 dias de idade (concentração máxima de espermatozóides estocados na cauda do epidídimo), considera-se que os animais atingem a plena maturidade sexual (Robb *et al.*, 1978, Zanato *et al.*, 1994). Segundo Clegg (1960) e Ojeda *et al.* (1980) o desenvolvimento sexual pós-natal no rato macho se divide em 4 fases: (1) neonatal, do dia pós-natal (DPN) 1-7; (2) infantil, do DPN 8-21; (3) juvenil, do DPN 22-35; (4) peripuberal, do DPN 36-55 ou 60.

### **1.3 Desnutrição infantil**

A desnutrição é definida como um estado patológico de diferentes graus de intensidade e variadas manifestações clínicas. Pode ser causada por má-alimentação ou por baixa ingestão de alimento. Carências de um ou mais elementos essenciais e de alto valor biológico tais como proteínas, lipídeos, açúcares ou minerais levam à desnutrição causada por má-alimentação

(Escoda, 2002). Esse tipo de desnutrição pode advir de questões culturais, ambientais, políticas, econômicas, sociais, éticas e morais, e é diferente da desnutrição alimentar (denominada de desnutrição protéico-calórica) onde há falta de quase todos os nutrientes essenciais devido à baixa ingestão de alimento. Esta última pode ser encontrada em todas as partes do mundo e em todas as idades do indivíduo, sendo mais comum em crianças pobres de países em desenvolvimento (Sousa & Miranda Neto, 2007).

Contudo, independentemente da forma clínica de desnutrição encontrada, a deficiência protéica está normalmente presente e ocorre porque um indivíduo com deficiência calórica utiliza as proteínas como fonte de energia para suas células. Esses elementos - as proteínas - são essenciais para a manutenção do indivíduo uma vez que atuam como elementos estruturais, componentes de hormônios, anticorpos e enzimas. Desta forma, a ingestão satisfatória de aminoácidos, cuja quantidade ideal é adquirida através da alimentação, é importante para uma síntese protéica adequada (Lajolo & Tirapegui, 2000).

Nas últimas décadas vem crescendo o interesse pelo estado nutricional dos indivíduos por parte dos líderes governamentais, uma vez que o índice de desnutrição de uma população reflete seu estado de desenvolvimento econômico e social. Atualmente, também existe uma ampla gama de estudos nutricionais capazes de indicar a “dieta ideal” para cada faixa etária ou até mesmo para cada indivíduo de acordo com suas condições de saúde. Entretanto, no Brasil e em todo mundo, o número de desnutridos é expressivo, apesar de noções básicas de nutrição serem oferecidas desde a pré-escola (Monteiro, 2003).

Neste ínterim, segundo Monteiro (2003) as crianças por serem mais vulneráveis são um bom indicativo da situação nutricional de uma região ou de um país. Entre os fatores que contribuem para a desnutrição em crianças, também conhecida como desnutrição infantil,

destacam-se as suas necessidades relativamente maiores de energia e de proteínas em relação aos demais membros da família (Monte, 2000).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ao longo de quase 30 anos (1974-2003), o Brasil registrou uma diminuição na taxa de desnutrição alimentar concomitante com um aumento na taxa da população com sobrepeso e obesidade em ambos os sexos. No entanto, a desnutrição ainda possui uma prevalência em torno de 4,6% na faixa etária da população usualmente mais vulnerável a deficiências nutricionais (menores de 5 anos) (IBGE, 2008).

Apesar do direito incondicionável de todo ser humano não padecer de fome ou desnutrição ter sido sucessivamente reafirmado em conferências dos países membros das Nações Unidas e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a desnutrição infantil continua sendo um dos problemas mais importantes de saúde pública do mundo atual devido a sua magnitude e consequências desastrosas para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das crianças.

No Brasil a situação nutricional dos menores de 5 anos melhorou nos últimos anos. Entre 1975 e 1989, a prevalência da desnutrição foi reduzida em cerca de 60%, representando mais de 1 milhão de crianças (Monteiro, 2003). No entanto, o problema não está totalmente controlado, uma vez que ainda existe um percentual, embora não muito alto, de crianças desnutridas graves que se concentram nas regiões mais pobres do país, ou seja, as regiões Norte e Nordeste, onde o índice pode chegar a 11%. Atualmente, a forma mais comum de desnutrição infantil é a crônica, a qual é expressa pelo déficit de crescimento (IBGE, 2008).

Segundo a OMS, a classificação do estado nutricional utiliza como indicadores o peso por idade, altura por idade e peso por altura, uma vez que a desnutrição afeta o desenvolvimento físico da criança podendo levar à redução do seu peso e altura (WHO, 1995; Onis & Blossner,

2003). De modo geral o crescimento é um processo dinâmico e contínuo que ocorre desde a concepção, sendo expresso pelo aumento do tamanho corporal. Este constitui um dos melhores indicadores de saúde da criança, refletindo as suas condições de vida no passado e no presente (Ministério da Saúde, 2002).

Sabe-se que todo ser humano nasce com um potencial genético de crescimento que poderá ou não ser alcançado, dependendo das condições de vida a que esteja exposto desde a concepção até a idade adulta. Portanto, o crescimento está influenciado por fatores intrínsecos (genéticos) e extrínsecos (ambientais) dentre os quais se destacam a alimentação, saúde, higiene, habitação e cuidados gerais com a criança (Wolansky, 1970; Karlberg *et al.*, 1994; WHO, 1995). O crescimento também é influenciado pela evolução do desenvolvimento intra-uterino, traduzido pelo peso ao nascer.

A OMS define como baixo peso ao nascimento o recém nascido com peso inferior a 2500g, independente da idade gestacional (WHO, 2008). A condição de nascer com peso inferior a 2500 gramas constitui um expressivo fator de risco para retardo de crescimento, doenças infecciosas, infecções respiratórias e atraso no desenvolvimento (Lira *et al.*, 1996; Eickmann *et al.*, 2002).

Milhares de crianças no mundo têm seu crescimento retardado pela nutrição inadequada. A OMS estima que mais de 20 milhões de crianças nasçam com baixo peso a cada ano, cerca de 150 milhões de crianças menores de 5 anos têm baixo peso para sua idade e 182 milhões (32,5%) tem baixa estatura (Monte, 2000).

Um estudo recente estima que cerca de 53% da mortalidade perinatal é atribuída ao baixo peso (Onis *et al.*, 2004). A desnutrição é a segunda causa de morte mais frequente em menores de 5 anos em países em desenvolvimento. Cerca de 20 a 30% das crianças gravemente desnutridas

vão a óbito durante o tratamento em serviços de saúde (Schofield & Asworth, 1996). Luz et al. (1998) estudando a magnitude do problema do recém nascido brasileiro de baixo peso ao nascer, afirmam que o estado de saúde ao nascimento é o fator determinante para a sobrevivência e qualidade de vida da criança.

#### **1.4 Programação fetal**

Entende-se por programação a modificação permanente na estrutura, fisiologia ou metabolismo de um órgão, devido a estímulos ou agravos durante um período crítico do desenvolvimento (Lucas, 1994; Law, 2001). O conceito de “programação fetal” relaciona-se a um inadequado crescimento intra-uterino e sugere que o feto pode ser programado durante o desenvolvimento pré-natal para desenvolver doenças na idade adulta (Langley-Evans *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2001). Este novo paradigma também sugere que a suscetibilidade a doenças é resultado da influência da nutrição e da exposição ambiental a agentes tóxicos e ao estresse durante o período fetal e neonatal (Heindel, 2007).

Nos últimos anos, um conjunto crescente de evidências tem sustentado a idéia de que distúrbios ocorridos em períodos críticos do desenvolvimento fetal podem determinar alterações permanentes ou de longo prazo na fisiologia ou morfologia de um determinado órgão (Ashton, 2000). Vários são os achados que relacionam o ambiente gestacional com efeitos tardios na composição corporal dos indivíduos, evidenciando a fase gestacional como um período crítico para a gênese de doenças. Um dos mais importantes tipos de programação consiste naquele induzido pela nutrição no início da vida, sendo o baixo peso ao nascer um marcador de nutrição fetal deficiente (Lucas *et al.*, 1999).

Os processos fisiológicos que ocorrem durante o período gestacional, tais como aumento do volume sanguíneo, aumento tecidual, crescimento da placenta e do feto, requerem um maior aporte de nutrientes como proteínas, vitaminas e sais minerais. Deste modo, uma nutrição adequada durante a gestação permite que o feto desenvolva um potencial de crescimento ideal, resultando no nascimento de indivíduos saudáveis e com tamanho adequado (Martin-Gronert & Ozanne, 2006).

Contudo, a incapacidade de suprir a quantidade adequada de nutrientes para satisfazer a demanda fetal pode levar a subnutrição precoce da progênie. Desta forma, o desenvolvimento e o crescimento nos períodos intra e pós-uterino são dependentes dos ambientes nutricional, hormonal e metabólico provido pela mãe (Desai & Hales, 1997). Sabe-se que o aporte suficiente de proteína é essencial para a manutenção e sucesso da gestação (Dietary Reference Intake, 1990) além de ser essencial para o crescimento fetal (Satish, 2000). A desnutrição protéica pode ocorrer principalmente durante a gestação, lactação e nos dois primeiros anos de vida (Desai *et al.*, 1980).

Tem sido relatado que crianças com baixo peso ao nascimento apresentam maior probabilidade de baixo desenvolvimento cognitivo e de danos neurológicos, além de menor resistência a doenças. Na idade adulta, essas crianças poderão apresentar maiores riscos de desenvolver doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes, dislipidemias bem como complicações renais. (Barker *et al.*, 1989; Law *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1992; Vanpee *et al.*, 1992).

Assim, vários estudos disponíveis na literatura científica associam a restrição alimentar ou protéica materna, durante diferentes intervalos da gestação e da lactação com seus efeitos sobre a prole. Restrições nutricionais maternas antes ou durante a gestação têm sido associadas a uma maior frequência de partos prematuros, retardo de crescimento intra-uterino e baixo peso ao

nascimento (Kouba *et al.*, 2005). De acordo com a literatura especializada, a restrição protéica materna, sozinha ou combinada com uma restrição energética durante a gestação, resulta em um decréscimo consistente do crescimento fetal em muitas espécies de mamíferos.

Zambrano *et al.* (2006) relataram que a restrição protéica (10%) durante a gestação e/ou lactação promove mudanças metabólicas e fisiológicas, de maneira sexo dependente, variando também com o momento da exposição. Melo & Cury (1988) mostraram baixos níveis séricos de ácidos graxos, baixo teor de gordura e de proteína na carcaça das ratas gestantes que receberam dieta hipoprotéica (6% de proteína), concluindo que esta dieta provavelmente afeta o suprimento de nutrientes circulantes e ocasiona o baixo peso apresentado pelos filhotes ao nascimento. Para Langley-Evans (2008) a restrição protéica em ratas durante a gestação resulta em perturbações no desenvolvimento fetal, além de disfunções metabólicas e fisiológicas. Malandro *et al.* (1996) propuseram que a nutrição materna tem efeitos regulatórios no fornecimento de nutriente para o feto.

Desai *et al.* (1996) afirmaram que a privação materna a proteína não afeta apenas o crescimento corpóreo dos filhotes, mas também causa uma mudança na sua composição corpórea, afetando os órgãos de maneira seletiva. Esses autores também afirmaram que a recuperação do peso dos órgãos na vida pós-natal não significa necessariamente uma recuperação morfo-funcional no mesmo.

Segundo Holemans *et al.* (2003), o feto e o neonato têm capacidade de se adaptarem ao meio perinatal. Essas adaptações do metabolismo fetal ao meio intra-uterino alterado têm consequências para a progênie, e podem persistir até a vida adulta e até a geração seguinte. Tal fenômeno já havia sido proposto por Barker (1997) para fetos humanos.

Neste contexto, alguns pesquisadores mostraram que a restrição protéica em ratas gestantes e/ou lactantes pode levar a alterações metabólicas e fisiológicas na prole, as quais podem ser permanentes mesmo que o animal tenha livre acesso a ração normoprotéica após o desmame (Ramos *et al.*, 2000; Zambrano *et al.*, 2005; Bieswal *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2006).

### **1.5 Desnutrição e sistema reprodutor**

A maioria dos estudos relacionados aos efeitos da desnutrição fetal sobre o desenvolvimento da prole são realizados para a investigação do sistema cardiovascular (Langley & Jackson, 1994; Hoet & Hanson, 1999; Torrens *et al.*, 2003; Sherman & Langley-Evans, 2000). Assim, são escassos os estudos que correlacionam os efeitos da desnutrição materna com o desenvolvimento do sistema reprodutor.

A importância dos fatores pré-natais e neonatais, particularmente o estado nutricional, sobre a programação da função reprodutiva, só foi reconhecida nas últimas décadas (Gunn *et al.*, 1972; Gunn, 1977; Allden, 1979; Zambrano *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2006). Atualmente alguns autores têm se preocupado em verificar os efeitos tardios da restrição de nutrientes durante a prenhez e lactação, sobre o desenvolvimento sexual e funções reprodutivas da prole na vida adulta (Rhind *et al.*, 2001; Rae *et al.*, 2002; Zambrano *et al.*, 2005).

Há muito tem sido relatado que o estado nutricional é um fator importante para o desenvolvimento das funções reprodutivas e início da puberdade (Ronnekleiv *et al.*, 1978; Frisch, 1980; Engelbregt *et al.*, 2000, Leonhardt *et al.*, 2003). Pesquisas têm demonstrado uma relação entre o retardo do crescimento intra-uterino provocado por restrição alimentar materna e o

desenvolvimento puberal de machos e fêmeas, indicando mudanças no início e progressão da puberdade (Engelbregt *et al.*, 2000; Zambrano *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2006).

Contudo, a relação entre o retardo do crescimento intra-uterino e os mecanismos que controlam o início da puberdade não está totalmente compreendida. Observou-se que uma restrição nutricional severa, mediada por mecanismos placentários, pode afetar o desenvolvimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal no feto, desfavorecendo e atrasando o início da puberdade (Da Silva *et al.*, 2001).

Zambrano *et al.* (2005) e Guzmán *et al.* (2006), estudando o efeito da restrição protéica materna em diferentes períodos (gestação e/ou lactação) sobre o sistema reprodutivo da prole masculina e feminina respectivamente, mostraram alterações no desenvolvimento tais como aumento da distância anogenital nos filhotes machos e fêmeas e atraso na instalação da puberdade em ambos os sexos.

Camundongos adultos submetidos à restrição alimentar de 30% por até 8 semanas apresentaram redução de 42% na concentração de testosterona sérica, redução de 27% na massa testicular e um aumento na taxa de apoptose que pode ser responsável pela regressão testicular ocorrida em resposta a restrição alimentar (Youn *et al.*, 2000).

A nutrição é conhecida por acarretar uma variedade de efeitos no sistema endócrino (Moura *et al.*, 1997; Rocha de Melo & Guedes 1997; Passos *et al.*, 2000, Teixeira *et al.*, 2002). Alterações nos níveis de corticosterona, testosterona, estradiol e LH, foram relatadas tanto nas mães quanto na progênie submetidas a restrição alimentar (Zambrano *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007). Outros autores relataram redução no peso testicular da progênie de ratas submetidas a restrição alimentar ou protéica durante a gestação e aumento na expressão de receptores de andrógeno no órgão (Mota *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2007). Genovese *et al.* (2009)

encontraram uma diminuição no número de células de Sertoli em animais adultos que sofreram desnutrição alimentar durante a vida fetal e pré-puberal.

Diante do exposto, o tema do presente estudo, além de atual, tem grande importância aplicada, pois a preocupação com os hábitos alimentares e a saúde reprodutiva, responsável pela manutenção das espécies, é crescente. Desta forma, estudos sobre desnutrição materna e suas consequências sobre a prole, fazem-se necessários, não somente em relação a problemas cardiovasculares, diabetes e hipertensão, como também nos possíveis efeitos sobre o desenvolvimento reprodutivo.

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o impacto da desnutrição protéica *in utero* sobre parâmetros morfofuncionais do trato reprodutivo masculino em diferentes fases do desenvolvimento sexual: pré-puberal, peripuberal e adulta, assim como sobre a instalação da puberdade em filhotes fêmeas, utilizando o rato como modelo experimental.

## **3. CAPÍTULO**

Este trabalho deu origem aos artigos “Efeitos da restrição protéica *in utero* sobre a performance reprodutiva materna e o desenvolvimento sexual inicial da prole de ratos” que deverá ser submetido para o periódico “The Journal of Nutritional Biochemistry” e “Restrição protéica *in utero* causa retardo de crescimento e altera parâmetros espermáticos em ratos” que deverá ser submetido para o periódico “The Journal of Physiology”, depois de versados para o inglês.

## **Artigo 1**

### **Efeitos da restrição protéica *in utero* sobre a performance reprodutiva materna e o desenvolvimento sexual inicial da prole de ratos**

Fabiola Choqueta de Toledo<sup>1</sup>, Flávia Pinho da Cunha Pedrosa<sup>2</sup>, Juliana Elaine Perobelli<sup>1</sup>, Marina Trevizan Guerra<sup>1</sup>, Wilma De Grava Kempinas<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, Campinas – SP, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Departamento de Morfologia, , Botucatu – SP, Brasil.

Título curto: Restrição protéica *in utero* e puberdade.

Palavras chaves: restrição protéica, rato, desenvolvimento sexual, distância anogenital, puberdade.

**Correspondência para o autor:**

Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP

Caixa postal 510

18618-000, Botucatu, SP, Brasil

Tel.: 14 3811 6264; Fax: 14 3811 6264

Endereço eletrônico: [kempinas@ibb.unesp.br](mailto:kempinas@ibb.unesp.br)

## RESUMO

O estado nutricional materno desempenha um importante papel no crescimento e desenvolvimento pós-natal dos filhotes. O objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos da restrição protéica *in utero* sobre a performance reprodutiva das progenitoras e desenvolvimento sexual inicial da prole. Ratas Wistar prenhes foram divididas em dois grupos experimentais: grupo tratado com ração padrão (RP, n=8, 17% proteína) e grupo tratado com ração hipoprotéica (RH, n=10, 6% proteína) durante toda a gestação. Os resultados mostraram que a restrição protéica provocou uma redução significativa no peso das placentas e no ganho de peso das progenitoras durante a gestação, além de reduzir o peso corpóreo dos filhotes no período pós-natal. Na prole masculina a restrição protéica *in utero* atrasou a idade da descida testicular e separação prepucial e, na prole feminina atrasou a idade da abertura vaginal e primeiro estro. O retardo na idade de instalação dos sinais físicos externos do início da puberdade sugere que o período do desenvolvimento intra-uterino é crítico para o início e progressão da puberdade em machos e fêmeas. Além disso, o aumento da distância anogenital dos filhotes fêmeas do grupo RH indicam que a restrição protéica *in utero* pode induzir um processo de masculinização na prole feminina. Desta forma, nestas condições experimentais, a restrição protéica *in utero* comprometeu o desenvolvimento sexual inicial de ambos os sexos.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e o crescimento nos períodos intra e pós-uterino são dependentes do ambiente nutricional, hormonal e metabólico provido pela mãe durante a gestação e lactação [1].

Os processos fisiológicos que ocorrem durante o período gestacional, tais como aumento do volume sanguíneo, aumento tecidual, crescimento da placenta e do feto, requerem um maior aporte de nutrientes (proteínas, vitaminas, sais minerais etc.). Sabe-se que o aporte de proteína é essencial para a manutenção e sucesso da prenhez [2].

Uma nutrição adequada durante a gestação permite que o feto desenvolva um potencial de crescimento, resultando no nascimento de filhotes saudáveis e com tamanho adequado [3]. De acordo com a literatura, a restrição protéica materna, sozinha ou combinada com restrição energética durante a gestação, resulta em decréscimo consistente do crescimento fetal em muitas espécies. A ênfase sobre o peso ao nascimento reflete sua importância na mortalidade, morbidade e performance física e mental do recém-nascido [2].

Há uma associação entre o retardo do crescimento intra-uterino e o aparecimento de doenças na vida adulta e isto conduz à hipótese de uma origem fetal para as doenças, sugerindo que fatores ambientais adversos, tais como desnutrição protéica *in utero*, atuam na programação e no desenvolvimento do tecido fetal, o que produzirá disfunções e doenças posteriormente [1,4]. Estudos epidemiológicos sugerem que recém-nascidos com baixo peso apresentam alta susceptibilidade a doenças como diabetes tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares na vida adulta [5]. São escassos os estudos que correlacionam o baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento do sistema reprodutor [6,7].

O estado nutricional é um fator importante para o desenvolvimento das funções reprodutivas e início da puberdade [8-11]. A puberdade é um período de rápidas alterações endócrinas e morfológicas que marca a transição entre o estado juvenil e o adulto [12]. Na fêmea a idade da abertura vaginal e ocorrência do primeiro estro são indicativos do início da puberdade

que ocorre aproximadamente aos 35 dias de idade [13,14]. Flutuações nos níveis de estrógeno e progesterona durante o ciclo estral, exercem profundo efeito na proliferação do epitélio e citodiferenciação dos órgãos do sistema reprodutor feminino [15] influenciando o crescimento, a função e a diferenciação destes órgãos. No rato macho, a puberdade tem início por volta dos 50 dias de idade [16]. No período compreendido entre 75 dias (máxima produção de espermatozóides) e 100 dias de idade (concentração máxima de espermatozóides estocados na cauda do epidídimo), considera-se que os animais atingem a plena maturidade sexual [16,17].

Atualmente, autores têm se preocupado em verificar os efeitos tardios da restrição de nutrientes durante a prenhez e lactação, no desenvolvimento sexual e funções reprodutivas da prole na vida adulta [6,18,19]. Por um longo tempo tem sido hipotetizado que o peso corpóreo tem papel central na regulação da puberdade [6,7,10]. Contudo, a literatura é controversa e a relação entre o retardo do crescimento intra-uterino e instalação da puberdade em ratos não é bem compreendida.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos da restrição protéica *in utero* sobre a performance reprodutiva das progenitoras e o desenvolvimento sexual inicial da prole feminina e masculina de ratos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Ratos machos adultos (n =15, 90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e fêmeas adultas (n = 28, 60 dias de idade, pesando aproximadamente 200g) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de

Botucatu/SP foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, em gaiolas de polipropileno (40x30x15 cm), com substrato de maravalha, em condições controladas de temperatura (média de 23°C), luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e acesso livre a água e comida.

Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho. Ao final do pareamento foi colhido o esfregaço vaginal das ratas e o dia zero de prenhez (DG0) foi determinado pela presença de cabeças de espermatozóides nos esfregaços vaginais de fêmeas em estro. As ratas prenhes foram divididas em dois grupos experimentais: um grupo que foi tratado com ração padrão (grupo RP, n=12, 17% proteína) e o outro que foi tratado com ração hipoprotéica (grupo RH, n=16, 6% proteína) durante toda a prenhez (DG0 ao DG21) [20]. Durante o período lactacional as ratas pertencentes aos dois grupos experimentais receberam ração convencional de biotério. Os filhotes após a lactação também receberam água e ração convencional à vontade. As rações hipoprotéica e padrão, cujas composições encontram-se descritas na Tabela 1, foram preparadas no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da Unesp, Campus de Botucatu-SP. As dietas são isocalóricas e normossódicas (0,20%).

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (protocolo nº 10/08-CEEA).

### **Performance reprodutiva das progenitoras**

Desde o DG0 até o final da lactação (dia pós-natal 21 - DPN21) as progenitoras foram pesadas em dias alternados para permitir a avaliação do ganho de peso corpóreo. O consumo de ração foi medido em dias alternados com o objetivo de monitorar o consumo médio diário.

Um grupo de 10 ratas (grupo RP, n=4 e grupo RH n=6) foram sacrificadas no DG20, procedendo-se em seguida a laparotomia para avaliação dos parâmetros reprodutivos das progenitoras: peso final das progenitoras, número de corpos lúteos, implantes, reabsorções, peso do útero com fetos, peso da placenta, número de filhotes, peso dos fetos e posterior determinação do potencial de fertilidade: sítios de implantação/ corpos lúteos x 100; taxa de perdas pré-implantação: nº corpos lúteos – nº de implantações/ nº de corpos lúteos x 100; taxa de perdas pós-implantações: nº de implantações – nº de fetos vivos/ nº de implantações x 100.

As demais ratas prenhes (grupo RP, n=8 e grupo RH, n=10) foram mantidas para permitir o nascimento e amamentação dos filhotes.

### **Coleta e análise dos testículos fetais dos machos**

Foram retirados os testículos de fetos machos (grupo RP, n=4 e grupo RH n=5), fixados em Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 8% de paraformaldeído), processados para inclusão em resina e obtenção de cortes histológicos com 5 µm de espessura corados com hematoxilina e eosina. A avaliação estereológica foi realizada segundo método de Weibel [21], na qual se utiliza um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 120 pontos e 60 linhas, obtendo-se a proporção relativa do compartimento intersticial e do cordão testicular. Com o auxílio de um

fotomicroscópio de luz Leica®, no aumento de 400X foram analisados 10 campos por animal, em ensaio cego.

### **Análises dos filhotes**

No DPN1 os filhotes foram pesados e com auxílio de um paquímetro foi feita a medida da distância anogenital (DAG - distância entre o ânus e o tubérculo genital) absoluta e relativa [22]. Posteriormente, as ninhadas foram reduzidas para 10 filhotes, visando manter um número semelhante de machos e fêmeas. No DPN13 foi registrada a presença de aréolas/ mamilos, baseada na presença ou ausência do mamilo ou de uma descoloração da pele na região torácica [22].

### **Sinais físicos externos do desenvolvimento sexual**

Determinou-se, nos filhotes do sexo masculino, o dia em que ocorreu a descida testicular através da palpação diária da bolsa escrotal, a partir do DPN15. A separação prepucial, indicativo do início da puberdade, foi investigada a partir DPN30, através da retração manual do prepúcio [23].

Determinou-se, nos filhotes do sexo feminino, o dia em que ocorreu a abertura vaginal completa, indicativo da instalação da puberdade, a partir do DPN30. Após a ocorrência da abertura vaginal foram colhidos lavados vaginais para investigar a idade do primeiro estro, caracterizado pela predominância de células epiteliais cornificadas. Para tanto, sempre no mesmo horário, uma ponteira contendo 10 $\mu$ L de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) acoplada a um pipetador automático foi superficialmente introduzida na vagina das ratas, e o líquido transferido

e logo depois aspirado [24]. Em seguida os lavados vaginais foram analisados com o auxílio de um microscópio de contraste de fase Leica®, no aumento 200x.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a comparação dos resultados entre os grupos experimentais foi utilizado, dependendo da natureza da distribuição dos dados, os testes t de Student ou o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

As progenitoras do grupo RH apresentaram evolução de peso corporal semelhante às ratas do grupo RP durante a gestação (dados não mostrados). Em relação à porcentagem de ganho de peso durante o período gestacional as progenitoras do grupo RH apresentaram uma redução estatisticamente significativa (Figura 1).

Durante toda a lactação as progenitoras do grupo RH apresentaram peso corporal menor do que as ratas do grupo RP, estatisticamente significativo no 1º, 7º e 13º dia lactacional (Tabela 2).

Durante a gestação as progenitoras do grupo RH, quando comparadas ao grupo RP, apresentaram um aumento estatisticamente significativo no consumo de ração do 3º ao 11º dia de prenhez (Figura 2A). Contrariamente, na lactação o consumo de ração das progenitoras do grupo RH foi menor durante todo período e estatisticamente significativo do 5º ao 11º dia lactacional (Figura 2B).

Em relação à performance reprodutiva, foi verificado que a restrição protéica durante a gestação provocou uma redução estatisticamente significativa no peso da placenta das progenitoras. Os demais parâmetros analisados não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

O peso corpóreo médio no DPN1 e durante a lactação foi significativamente menor nos filhotes das ninhadas pertencentes ao grupo RH, quando comparados com o grupo RP (Figura 3).

Não houve diferença estatisticamente significativa na distância anogenital (mm) absoluta e relativa entre os filhotes machos dos dois grupos experimentais (Tabela 4). No entanto, nas fêmeas do grupo RH houve um aumento estatisticamente significativo desse parâmetro quando comparado ao grupo RP (Tabela 4).

Em relação à porcentagem de filhotes machos e fêmeas que apresentavam aréolas/mamilos não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

A restrição protéica *in utero* atrasou a idade da descida testicular e da separação prepucial da prole masculina, quando comparada aos animais cujas mães receberam ração padrão (Figura 4). Da mesma forma, na prole feminina a restrição protéica *in utero* atrasou a idade da abertura vaginal e do primeiro estro (Figura 5).

A análise estereológica dos testículos fetais não revelou alterações no compartimento intersticial e no cordão testicular que pudessem ser atribuídas à restrição protéica *in utero* (dados não mostrados).

## DISCUSSÃO

De acordo com Widdowson & McCance [25] dietas marginalmente deficientes em algum nutriente podem levar a estímulo de consumo, a fim de aumentar a disponibilidade deste nutriente limitante. O aumento do consumo de ração durante as duas primeiras semanas de gestação encontrado em nosso estudo corrobora com este postulado. Este dado também está de acordo com Desai et al. [26] cujas mães que foram submetidas a dieta hipoprotéica (80g proteína/kg) apresentaram um aumento do consumo de ração nas duas primeiras semanas de gestação. No entanto, observou-se que o aumento do consumo de ração e conseqüente aumento do consumo de proteína não foram suficientes para compensar o efeito da dieta hipoprotéica sobre o organismo materno e fetal, uma vez que, no presente estudo, o ganho de peso das progenitoras durante a gestação e o peso dos filhotes no DPN1 apresentaram uma redução significativa no grupo RH.

Sabe-se que se o conteúdo de proteína na dieta é reduzido a níveis extremamente baixos, ocorre um aumento na mobilização de proteína corporal (proteína endógena) na busca de atender às exigências nutricionais para a manutenção do animal [27]. Estudos com animais indicam que dietas deficientes em proteínas causam redução do ganho de peso e aumento dos níveis de histamina cerebral que tem efeito sobre o consumo alimentar. O aumento nos níveis de histamina provoca redução no consumo alimentar e esta pode ser a causa da redução no consumo de ração das ratas do grupo ração hipoprotéica observada no final da gestação [27,28]. Já durante o período lactacional, a redução no consumo observada nestas mesmas ratas pode estar relacionada tanto a estes fatores quanto a uma queda do estímulo inicial ao consumo, uma vez que durante este período as progenitoras do grupo ração hipoprotéica passaram a receber a dieta padrão com nível protéico adequado.

No presente estudo, a redução observada no peso da placenta das progenitoras mantidas com dieta hipoprotéica corrobora com dados da literatura. Malandro et al. [29] utilizando dieta hipoprotéica (5%) encontraram redução no peso da placenta e nos níveis de aminoácidos materno-fetal, sugerindo que a restrição protéica materna promove uma redução na transferência de nutrientes para os fetos. Fernandez-Twinn et al. [30] também observaram uma redução significativa no peso da placenta de ratas submetidas à restrição protéica (8%) durante a gestação.

O papel da placenta é essencial para o crescimento saudável do feto e está tornando-se claro que as atividades da placenta são moduladas pelos sinais originados do feto [31]. A troca de nutrientes entre a placenta e o feto envolve três principais mecanismos: transferência direta de nutrientes do plasma materno para o plasma fetal; metabolismo placentar e consumo de nutrientes; metabolismo placentar de nutrientes da carcaça para formas alternativas de substrato [32].

Segundo Rutland et al. [33], redução no peso placentário e baixo peso ao nascer são indicadores de retardo de crescimento intra-uterino. Nossos resultados mostraram que a restrição protéica *in utero* provocou uma redução significativa no peso dos filhotes no DPN1. Por outro lado, o peso dos fetos no DG20, embora menor, não foi estatisticamente significativo. Contrariamente, Fernandez-Twinn et al. [30] observaram uma redução no peso dos fetos no DG18 e DG21 de mães submetidas à dieta hipoprotéica (8%). Desta forma, pode-se sugerir que em nosso trabalho a dieta hipoprotéica materna provocou uma restrição de crescimento intra-uterino mais pronunciada ao final da gestação.

A distância anogenital e o número de aréolas/mamilos, são parâmetros andrógeno-dependentes importantes, pois permitem a análise de alterações na diferenciação do sistema

reprodutor [13,34-36]. Zambrano et al. [6], estudando filhotes machos de progenitoras submetidas à restrição protéica durante a gestação encontrou aumento da distância anogenital. No presente estudo a restrição protéica *in utero* não provocou alterações neste marcador externo de diferenciação sexual ao nascimento, assim como não alterou a regressão de aréolas/mamilos nos ratos machos.

A restrição protéica durante a gestação causa aumento dos níveis séricos de corticosterona, estradiol e testosterona das progenitoras [6]. Estudos mostram que esteróides maternos e/ou seus metabólitos podem atravessar a placenta e assim desempenhar um papel no aumento da distância anogenital de filhotes fêmeas de mães que sofreram restrição protéica [35]. O aumento da distância anogenital encontrado em nosso estudo pode ser um indicativo de masculinização do fenótipo feminino [36] relacionado com um possível aumento de testosterona materna [7].

Estudos têm demonstrado uma relação entre o retardo do crescimento intra-uterino, causado por restrição alimentar materna e alterações no desenvolvimento puberal de machos e fêmeas. Alguns autores sugerem que é necessário atingir um peso corpóreo satisfatório para o início da puberdade [37,38]. No entanto, estudos recentes mostram que o peso dos filhotes não é o único fator determinante para a instalação e progressão da puberdade [6,7,10].

Engelbregt et al. [10], observaram que uma restrição nutricional mediada por mecanismos placentários pode desfavorecer e atrasar o início da puberdade em ambos os sexos. A desnutrição no período perinatal pode alterar a programação do sistema endócrino e conseqüentemente provocar alterações no início e no desenvolvimento puberal de ratos [10].

O retardo na idade de instalação dos sinais físicos externos do início da puberdade em ambos os sexos encontrado em nosso estudo corroboram com dados da literatura. Zambrano et al.

[6] também encontraram atraso na idade da descida testicular de machos que sofreram restrição protéica *in utero*. Guzmán et al. [7] relataram que a idade da abertura vaginal e do primeiro estro são retardadas em fêmeas expostas à restrição protéica durante o desenvolvimento fetal e lactacional.

Leonhardt et al. [11] sugerem que o retardo de crescimento perinatal induzido por restrição alimentar (calórica e protéica) materna causa drásticas conseqüências no desenvolvimento das gônadas masculinas antes do desmame e provavelmente depois. Em seu estudo, foi observada uma redução significativa da área e do lúmen intratubular dos túbulos seminíferos de filhotes machos recém-nascidos cujas mães receberam restrição alimentar durante a última semana de gestação até o final da lactação. A ausência de alterações no volume relativo de cordão testicular e interstício encontrada em nosso estudo revela que a restrição protéica *in utero* não acarretou alterações na estrutura do testículo fetal.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a restrição protéica *in utero* pode induzir um processo de masculinização da prole feminina. Além disso, o retardo na idade de instalação dos sinais físicos externos do início da puberdade sugere que o período do desenvolvimento intra-uterino é crítico para o início e progressão da puberdade em machos e fêmeas. Desta forma, nestas condições experimentais a restrição protéica *in utero* compromete o desenvolvimento sexual inicial de ambos os sexos.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, na forma de bolsa de mestrado (processo nº 07/57375-5). Os autores gostariam de agradecer ao

aos técnicos do Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da Unesp, Campus de Botucatu-SP pelo auxílio na produção das rações.

## **REFERÊNCIAS**

[1] Desai M, Hales CN. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1997;72:329-48.

[2] Dietary Reference Intake (DRI). Nutrition during pregnancy: Part I: Weight gain, Part II: Nutrient supplements, 1990. Disponível em: [www.nap.edu/catalog/1451.html](http://www.nap.edu/catalog/1451.html). Acesso em 20 de setembro de 2009.

[3] Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Clin Sci.* 2006;34:779-82.

[4] Godfrey KM, Barker DJP. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1344S-52S.

[5] Lesage J, Blondeau B, Grino M, Bréant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology.* 2007;142:1692-702.

- [6] 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;563:275-84.
- [7] Guzmán C, Cabrera M, Cárdenas 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.
- [8] Ronnekleiv OK, Ojeda SR, McCann SM. Undernutrition puberty and the development of estrogen positive feedback in the female rats. *Biol Reprod.* 1978;19:414-24.
- [9] Frisch RE. Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed Proc.* 1980;39:2395-400.
- [10] Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male rats and female rats. *Pediatr Res.* 2000;48:803-7.
- [11] 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 weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod.* 2003;68:390-400.

[12] Stoker TE, Parks LG, Gray LE, Cooper RL. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A Focus on the EDSTAC recommendations. *Crit Rev Toxicol.* 2000;30:197–252.

[13] US EPA (United State Environmental Protection Agency). Reproductive toxicity risk assessment guidelines. United State Environmental Protection Agency—US EPA. 1996;61:56273–322.

[14] Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Shuk-mei Ho, Hunt P, *et al.* Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril.* 2008;90:911-40.

[15] Boutin EL, Cunha GR. Estrogen-induced epithelial proliferation and cornification are uncoupled in sinus vaginal epithelium associated with uterine stroma. *Differentiation.* 1997;62: 171-8.

[16] Robb GW, Amann RP, Killian GJ. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fert.* 1978;54:103-7.

[17] Zanato VF, Martins MP, Anselmo-Franci JAA, Petenusci SO, Lamano Carvalho TL. Sexual development of male *Wistar* rats. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27:1273-80.

[18] Rhind SM, Rae MT, Brooks N. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction*. 2001;122:205-14.

[19] Rae MT, Kyle CE, Millar DW, Hammond AJ, Brooks AN, Rhind SM. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod*. 2002;72:63-71.

[20] Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:939-51.

[21] Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963;12:131-55.

[22] Gallavan RH, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol*. 1999;13:383-90.

[23] Parker RM. Testing for reproductive toxicity. In: Hood RD, editor. *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach*. New York, CRC Press; 2006. pp.472-74.

[24] Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62:609-14.

- [25] Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res.* 1975;9:154-6.
- [26] Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Brith J Nutri.* 1996;76:591-603.
- [27] Jessop NS. Protein metabolism during lactation. *Proc Nutr Soc.* 1997;56:169-75.
- [28] Mercer LP, Kelly DS, Humphries LL, Dunn JD. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H<sub>1</sub>) affects food intake in rats. *J Nutr.* 1994;124:1029–36.
- [29] Malandro MS, Beveridge MJ, Kilberg MS, Novak DA. Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1996;271:C295-C303.
- [30] Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson G, Hales CN. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Brith J Nutri.* 2003;90:815-22.
- [31] Garnica AD, Chan WY. The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *J Am Coll Nutr.* 1996;15:206-22.
- [32] Hay WWJr. Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm Res.* 1994;42:215-22.

- [33] Rutland CS, Latunde-Dada AO, Thorpe A, Plant R, Langley-Evans S, Leach L. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. *Placenta*. 2007;28:734-742.
- [34] Korenbrot CC, Huhtaniemi IT, Weiner RI. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol Reprod*. 1977;17:298-303.
- [35] Graham S, Gandelman R. The expression of anogenital distance data in the mouse. *Physiol Behav*. 1986;36:103-4.
- [36] Hotchkiss AK, Lambright CS, Ostby JS, Parks-Saldutti L, Vandenberg JG, Gray LE Jr. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*. 2007;96:335-45.
- [37] Frish RE. The right weight: body fat, menarche and fertility. *Nutrition*. 1996;12:452-3.
- [38] Barker ER. Body weight and the initiation of puberty. *Clin Obstet Gynecol*. 1985;28:573-9.

## Legenda das figuras

**Figura 1.** Porcentagem do ganho de peso das progenitoras pertencentes ao grupo ração padrão - RP (n=12) e grupo ração hipoprotéica - RH (n=16) durante a gestação. Valores expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste Mann-Whitney, \*p < 0,05.

**Figura 2.** Consumo diário de ração (g) das progenitoras do grupo ração padrão - RP e ração hipoprotéica - RH durante a gestação (A) e durante a lactação (B). Valores expressos em média ± EPM. Teste Mann-Whitney, \*p < 0,05.

**Figura 3.** Evolução do peso corpóreo (g) dos filhotes das ninhadas pertencentes ao grupo ração padrão - RP (n=8 ninhadas) e grupo ração hipoprotéica - RH (n=10 ninhadas) durante a lactação. Valores expressos em média ± EPM. Teste “t” de Student, \*p < 0,05. DPN - dia pós-natal.

**Figura 4.** Idade da descida testicular (A) (em dias) e separação prepucial (B) de filhotes machos pertencentes ao grupo ração padrão - RP (n=8 ninhadas) e grupo ração hipoprotéica - RH (n=10 ninhadas). Valores expressos como média ± EPM. Teste “t” de Student, \*p < 0,05.

**Figura 5.** Idade da abertura vaginal (A) (em dias) e primeiro estro (B) de filhotes fêmeas pertencentes ao grupo ração padrão - RP (n=8 ninhadas) e grupo ração hipoprotéica - RH (n=10 ninhadas). Valores expressos como média ± EPM. Teste “t” de Student, \*p < 0,05.

**Tabela 1.** Composição das rações (g/kg).

Componentes	Hipoprotéica (6% proteína)	Padrão (17% proteína)*
Amido de milho	480	397
Caseína (84%)	71,5	202
Dextrina (90-94%)	159	130,5
Sacarose	121	100
Óleo de soja	70	70
Fibra (Microcelulose cristalina)	50	50
Mistura de minerais **	35	35
Mistura de vitaminas **	10	10
L-cistina	1	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5

\* Dieta para as fases de crescimento, prenhez e lactação de roedores-AIN-93G [20].

\*\* Segundo AIN-93G.

**Tabela 2.** Peso corpóreo (g) das progenitoras pertencentes ao grupo ração padrão - RP e grupo ração hipoprotéica - RH durante a lactação.

Dia lactacional (DL)	Grupo RP (n=8)	Grupo RH (n=10)
DL1	297,58 ± 7,45	259,13 ± 7,90*
DL7	277,85 ± 8,74	227,91 ± 8,44*
DL13	272,53 ± 11,07	212,30 ± 8,37*
DL19	282,19 ± 10,42	259,91 ± 5,68

Valores expressos em média ± EPM. Teste “t” de Student, \*p < 0,05.

**Tabela 3.** Performance reprodutiva das progenitoras pertencentes ao grupo ração padrão - RP e grupo ração hipoprotéica – RH.

<b>Parâmetro</b>	<b>Grupo RP (n=4)</b>	<b>Grupo RH (n=6)</b>
Peso final das ratas (g)	352,90± 22,98	355,68±9,81
Peso útero+ fetos (g)	54,90±8,43	66,13±1,67
Peso dos fetos (g)	3,86±0,08	3,66±0,09
Peso da placenta (g)	0,55±0,03	0,45±0,03 *
Número de corpos lúteos	10,25±1,44	13,17±0,83
Número de implantes	10,00±1,63	13,00±0,89
Número de reabsorções	0,25±0,25	0,83±0,48
Número de fetos	9,75±1,65	12,17±0,48
<sup>1</sup> Potencial de fertilidade (%)	100 [96,43 – 100]	100 [100-100 ]
<sup>1</sup> Perdas pré-implantação (%)	0 [ 0 - 3,57 ]	0 [ 0 – 0 ]
<sup>1</sup> Perdas pós-implantação (%)	0 [ 0 - 2,50 ]	3,57 [ 0 - 8,04 ]

Valores expressos em média ± EPM Teste “t” de Student , \*p < 0,05.

<sup>1</sup> Valores expressos em mediana [1ºquartil – 3ºquartil ] Teste de Mann-Whitney .

**Tabela 4.** Distância anogenital ( DAG, mm) absoluta e relativa dos filhotes machos e fêmeas pertencentes ao grupo ração padrão - RP e grupo ração hipoprotéica – RH.

<b>DAG (mm)</b>	<b>Grupo RP (n=8 ninhadas)</b>	<b>Grupo RH (n=10 ninhadas)</b>
<i>Machos</i>		
DAG absoluta	2,36 ± 0,07	2,22 ± 0,04
DAG/ <sup>3</sup> √peso corpóreo	1,24 ± 0,03	1,22 ± 0,02
<i>Fêmeas</i>		
DAG	1,10 ± 0,03	1,20 ± 0,04*
DAG/ <sup>3</sup> √peso corpóreo	0,59 ± 0,01	0,68 ± 0,02*

Valores expressos em média ± EPM Teste “t” de Student , \*p < 0,05.

Figura 1

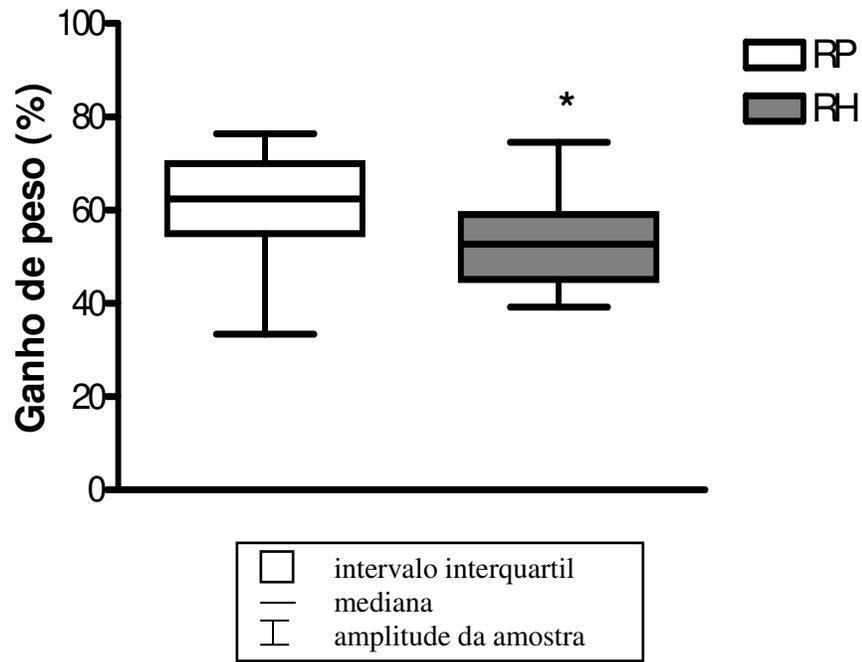


Figura 2

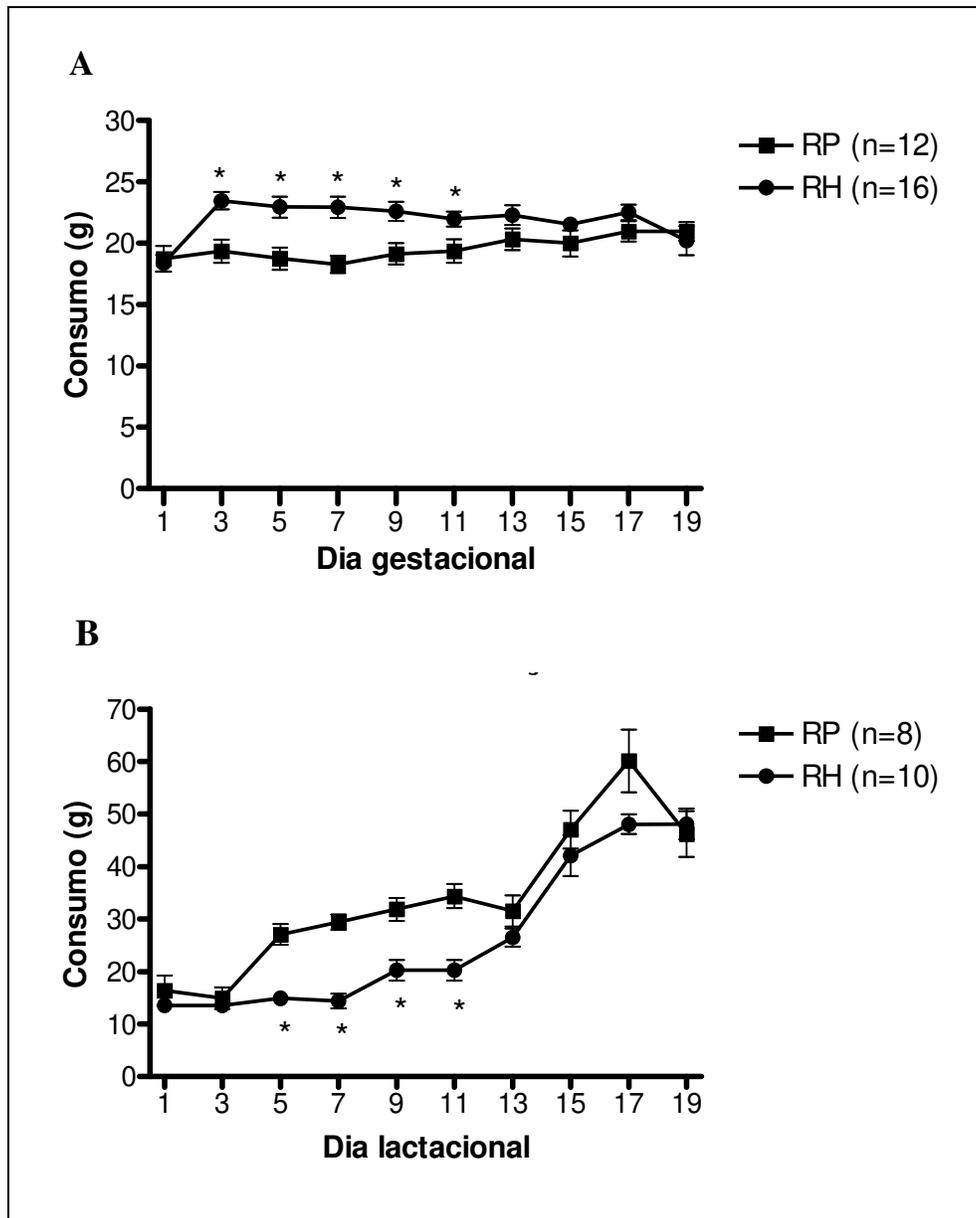
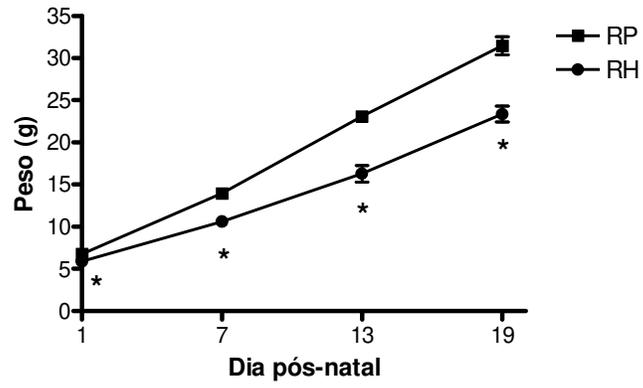
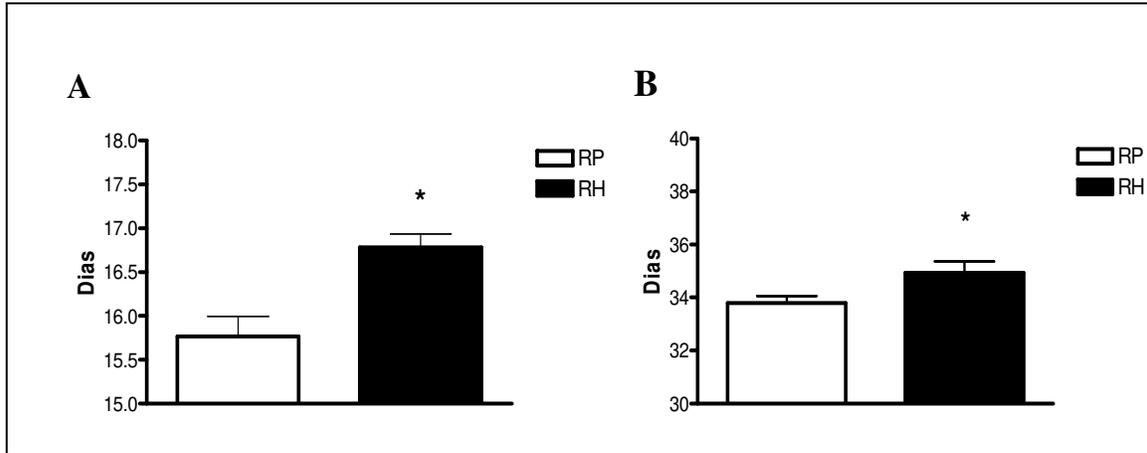


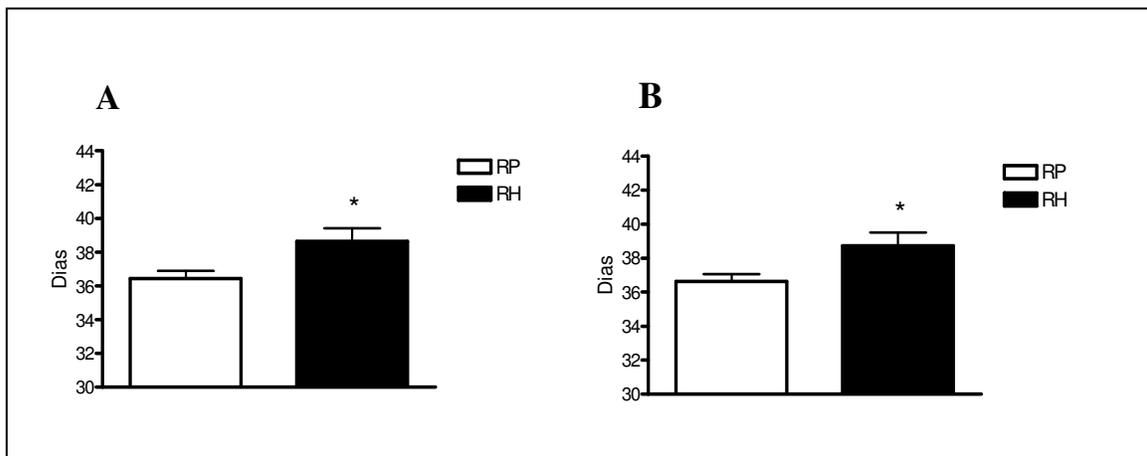
Figura 3



**Figura 4**



**Figura 5**



## Artigo 2

### **Restrição protéica *in utero* causa retardo de crescimento e altera parâmetros espermáticos em ratos**

Fabiola Choqueta de Toledo<sup>1</sup>, Juliana Elaine Perobelli<sup>1</sup>, Flávia Pinho da Cunha Pedrosa<sup>2</sup>, Janete A. Anselmo-Franci<sup>3</sup>, Wilma De Grava Kempinas<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, Campinas – SP, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Departamento de Morfologia, , Botucatu – SP, Brasil.

<sup>3</sup> Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Ribeirão Preto – SP, Brasil.

Título curto: Restrição protéica *in utero* e parâmetros espermáticos.

Palavras chaves: restrição protéica, rato, sistema reprodutor, produção espermática, motilidade espermática, morfologia espermática.

**Correspondência para o autor:**

Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP

Caixa postal 510

18618-000, Botucatu, SP, Brasil

Tel.: 14 3811 6264; Fax: 14 3811 6264

Endereço eletrônico: [kempinas@ibb.unesp.br](mailto:kempinas@ibb.unesp.br)

## RESUMO

Estudos recentes sustentam o conceito de “programação fetal” que sugere que o feto pode ser programado durante o desenvolvimento intra-uterino para desenvolver doenças na idade adulta. No presente estudo foram avaliados os possíveis efeitos da restrição protéica *in utero* sobre o desenvolvimento sexual da prole masculina. Ratas Wistar prenhes foram divididas em dois grupos experimentais: grupo tratado com ração padrão (RP, n=8, 17% proteína) e grupo tratado com ração hipoprotéica (RH, n=10, 6% proteína) durante toda a gestação. Os resultados mostraram que a restrição protéica *in utero* provocou nos filhotes machos redução de peso corpóreo no 1º dia pós-natal e durante as diferentes fases do desenvolvimento sexual (pré-puberal, peripuberal e adulta) ( $p < 0,05$ ). Na fase adulta o número de células de Sertoli, a motilidade e as contagens espermáticas também foram reduzidas no grupo RH. Além disso, o número de espermatozoides com anormalidades morfológicas e retenção de gota citoplasmática foi maior neste grupo. Em conclusão, sugere-se que a restrição protéica *in utero*, nestas condições experimentais, causa retardo de crescimento e altera a programação do sistema reprodutivo masculino de ratos, provocando danos espermáticos na idade adulta.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um conjunto crescente de evidências tem sustentado a idéia de que distúrbios ocorridos em períodos críticos do desenvolvimento fetal podem determinar alterações permanentes ou de longo prazo na fisiologia ou morfologia de um determinado órgão (Ashton 2000). Vários são os estudos que relacionam o ambiente gestacional com efeitos tardios na composição corporal dos indivíduos, evidenciando esta fase como um período crítico para a gênese de doenças. Estes estudos suportam o conceito de “programação fetal”, que sugere que o

feto pode ser programado durante o desenvolvimento intra-uterino para desenvolver doenças na idade adulta (Langley-Evans 1998; Edwards *et al.* 2001). De acordo com este novo paradigma a susceptibilidade a doenças (incluindo doenças e disfunções reprodutivas) sofre influência da nutrição, da exposição ambiental a agentes tóxicos e ao estresse durante o período fetal e neonatal (Heindel 2007).

A desnutrição pré-natal é o modelo mais estudado de programação fetal (Langley-Evans 1998; Edwards *et al.* 2001). No entanto, a maioria dos estudos são realizados para a investigação do sistema cardiovascular (Langley *et al.* 1994; Hoet & Hanson 1999; Torrens *et al.* 2003; Sherman & Langley-Evans 2000). No entanto, são escassos os estudos que correlacionam os efeitos da desnutrição materna com o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino. A importância dos fatores pré-natais e neonatais, particularmente o estado nutricional, sobre a programação da função reprodutiva, só foi reconhecida nas últimas décadas (Gunn *et al.* 1972; Gunn 1977; Allden 1979; Zambrano *et al.* 2005; Guzmán *et al.* 2006).

De acordo com a literatura, a restrição protéica materna, sozinha ou combinada com restrição energética durante a gestação, resulta em decréscimo consistente do crescimento fetal em muitas espécies. Segundo Desai *et al.* (1996) a privação materna a proteína não afeta apenas o crescimento corpóreo dos filhotes, mas também causa uma mudança na sua composição corpórea, afetando os órgãos de maneira seletiva. Esses autores também afirmam que a recuperação do peso dos órgãos na vida pós-natal não significa necessariamente uma recuperação morfo-funcional do mesmo.

O peso ao nascer é um indicador crucial do grau de comprometimento do desenvolvimento do indivíduo (Guzmán *et al.* 2006). Estudos mostram que a restrição protéica *in utero* provoca

baixo peso ao nascer e compromete a instalação da puberdade de ratos machos e fêmeas (Leonhardt *et al.* 2003; Zambrano *et al.* 2005; Guzmán *et al.* 2006).

A puberdade do rato macho tem início por volta dos 50 dias de idade (Robb *et al.* 1978). No período compreendido entre 75 dias (máxima produção de espermatozóides) e 100 dias de idade (concentração máxima de espermatozóides estocados na cauda do epidídimo), considera-se que os animais atingem a plena maturidade sexual (Robb *et al.*, 1978, Zanato *et al.* 1994). Segundo Clegg (1960) e Ojeda *et al.* (1980) o desenvolvimento sexual pós-natal no rato macho se divide em 4 fases: (1) neonatal, do dia pós-natal (DPN) 1-7; (2) infantil, do DPN 8-21; (3) juvenil, do DPN 22-35; (4) peripuberal, do DPN 36-55 ou 60.

Alguns autores relatam redução no peso testicular e aumento na expressão de receptores de andrógeno no testículo da progênie de ratas submetidas à restrição alimentar ou protéica durante a gestação (Mota *et al.* 2001; Teixeira *et al.* 2007). Genovese *et al.* (2009) reportam diminuição no número de células de Sertoli em animais adultos que sofreram desnutrição alimentar durante a vida fetal e pré-puberal.

Diante dos indicativos de relação entre desnutrição e programação do sistema reprodutor masculino e do crescente interesse pela nutrição e saúde reprodutiva, responsável pela manutenção das espécies, o presente estudo objetivou avaliar os possíveis efeitos tardios da restrição protéica *in utero*, no desenvolvimento sexual e funções reprodutivas da prole masculina na vida adulta.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Ratos machos adultos (n =15, 90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e fêmeas adultas (n = 18, 60 dias de idade, pesando aproximadamente 200g) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Botucatu/SP foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, em gaiolas de polipropileno (40x30x15 cm), com substrato de maravalha, em condições controladas de temperatura (média de 23°C), luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e acesso livre a água e comida.

Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, colocando-se duas fêmeas na caixa do macho. Ao final do pareamento foi colhido o esfregaço vaginal das ratas e o dia zero de prenhez (DG0) foi determinado pela presença de cabeças de espermatozóides nos esfregaços vaginais de fêmeas em estro. As ratas prenhes foram divididas em dois grupos experimentais: um grupo que foi tratado com ração padrão (grupo RP, n=8, 17% proteína) e o outro que foi tratado com ração hipoprotéica (grupo RH, n=10, 6% proteína) (Reeves et al., 1993) durante toda a prenhez (DG0 ao DG21). Durante o período lactacional as ratas pertencentes aos dois grupos experimentais receberam ração convencional de biotério. Os filhotes após a lactação também receberam água e ração convencional à vontade. As rações hipoprotéica e padrão, cujas composições encontram-se descritas na Tabela 1, foram preparadas no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da Unesp, Campus de Botucatu-SP. As dietas são isocalóricas e normossódicas (0,20%).

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e

foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (protocolo nº 10/08-CEEA).

### **Avaliação do desenvolvimento reprodutivo da prole masculina**

Ao nascimento os filhotes machos foram pesados e as ninhadas foram reduzidas para 10 filhotes, visando manter um número semelhante de machos e fêmeas. A fim de se avaliar os possíveis efeitos reprodutivos tardios da desnutrição protéica *in utero*, a prole masculina de ambos os grupos experimentais (RP e RH) foi avaliada em diferentes fases do desenvolvimento sexual: pré-puberal (fase I, n=10 por grupo) filhotes sacrificados aos 30 dias de idade; peripuberal (fase II, n=10 por grupo) filhotes sacrificados aos 60 dias de idade; adulta (fase III, n=20 por grupo) filhotes sacrificados aos 90 dias de idade. Na fase III uma maior quantidade de ratos foi utilizada, pois um maior número de parâmetros foi avaliado nesses animais.

### **Coleta e pesagem dos órgãos reprodutores**

Nas idades previstas 10 filhotes por grupo experimental foram anestesiados com éter etílico e mortos por decapitação. O testículo e o epidídimo esquerdos, a vesícula seminal (cheia e vazia, sem a glândula coaguladora), o ducto deferente esquerdo e a próstata ventral foram removidos e pesados em balança analítica de precisão.

Nas três fases estudadas, os testículo e epidídimos esquerdos dos animais experimentais foram coletados para processamento e análise histopatológica e/ou morfométrica.

Nos animais da fase III procedeu-se a coleta de sangue, a partir dos vasos cervicais rompidos pela decapitação, para dosagens hormonais e de testículo e epidídimo direitos para

determinação do número de células germinativas. Outros filhotes na fase III (n=10 por grupo experimental) foram mortos para coleta de testículo para dosagem de testosterona intratesticular e de espermatozóides do ducto deferente para análise da morfologia e motilidade espermáticas.

### **Processamento e análise histológica dos testículos e epidídimos**

O testículo e o epidídimo esquerdos foram retirados e imersos em solução fixadora de Alfac (85% álcool, 10% formol e 5% ácido acético). Após 24 horas de fixação, as peças foram submetidas a processamento histológico, que consistiu na inclusão do material em paraplast, obtenção de cortes com 5µm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram avaliadas em ensaio cego, com o auxílio de microscópio de luz Leica®, nos aumentos de 100, 200 e 400X.

Nos testículos a inspeção histopatológica foi realizada de modo quantitativo, analisando-se 100 cortes transversais de túbulos seminíferos por animal e classificando-os em normais ou anormais. Os túbulos foram considerados anormais frente à presença de células acidófilas, células multinucleadas, espermátides retidas, degeneração de tipos celulares, vacuolização do epitélio ou esfoliação de células na luz. O aspecto do interstício tubular também foi avaliado.

Nos epidídimos a análise histopatológica foi qualitativa, avaliando-se toda a extensão do corte histológico (integridade do epitélio do ducto epididimário, presença de espermatozóides na luz e aspecto do interstício do órgão).

### **Técnicas morfométricas**

Os estudos morfométricos foram realizados em ensaio cego, em cortes histológicos com 5µm de espessura e coloração com hematoxilina e eosina.

#### ***Número de células de Sertoli por túbulo seminífero***

Para avaliar os possíveis efeitos da restrição protéica *in utero* sobre a proliferação de células de Sertoli foram contados os núcleos de células de Sertoli em 20 cortes transversais de túbulos seminíferos por rato na fase III (n=8 por grupo), no estágio VII da espermatogênese classificado de acordo com Leblond & Clermont (1952). As avaliações foram realizadas sob microscópio de luz Leica® no aumento de 200X.

#### ***Avaliação estereológica do epidídimo***

Além da inspeção histológica, foi realizada uma avaliação mais detalhada do epidídimo dos animais experimentais nas fases II e III, através de análise estereológica do órgão, segundo método descrito por Weibel (1963). Utiliza-se um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 120 pontos e 60 linhas, obtendo-se a proporção relativa dos compartimentos luminal, epitelial e intersticial. Com o auxílio de microscópio de luz Leica®, no aumento de 200X foram analisados 10 campos por animal da cauda proximal do epidídimo.

### ***Grau de maturação do epitélio germinativo***

Com o objetivo de se avaliar o grau de maturação do epitélio seminífero, 100 secções transversais de túbulos seminíferos por animal (n=8 por grupo) nas fases I a III, foram avaliadas ao acaso, utilizando-se o método adaptado de atribuição de valores de acordo com o tipo de célula germinativa mais madura presente no epitélio tubular (Lamano Carvalho *et al.* 1996): grau 1: espermatócitos I ou II; grau 2: espermátides jovens de núcleo arredondado (estágios 1 ao 8 da espermiogênese); grau 3: espermátides em fase de maturação, com núcleos ovóides e alongados (estágios 9 ao 14 da espermiogênese); grau 4: espermátides em fase de maturação, com núcleos alongados (estágios 15 ao 18 da espermiogênese); grau 5: espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em pequena quantidade; grau 6: espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em média quantidade; grau 7: espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em grande quantidade.

Ao final, o número de túbulos classificado em cada grau de maturidade foi multiplicado pelo respectivo grau, sendo os valores resultantes somados e posteriormente divididos por 100, resultando no “grau médio”.

### **Contagem espermática, cálculo da produção diária de espermatozóides e do tempo de trânsito no epidídimo**

As espermátides resistentes ao processo de homogeneização do testículo (estágio 19 da espermiogênese) e os espermatozóides presentes na cabeça/corpo e cauda do epidídimo dos animais na fase III (n=10 por grupo) foram contados, conforme descrito por Robb *et al.* (1978), com as adaptações adotadas por Fernandes *et al.* (2007): os testículos direitos, descapsulados e

previamente pesados, foram homogeneizados em 5mL de NaCl 0,9% contendo TritonX100 0,5% e submetidos a sonicação por 30 segundos. Após diluição de 10 vezes, uma amostra foi transferida para uma câmara de Neubauer (4 campos por animal), procedendo-se a contagem de espermátides maduras. Para o cálculo da produção diária de espermatozóides (PDE), a concentração de espermátides por testículo foi dividida por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero. Da mesma forma, as porções cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram cortadas em pequenos fragmentos com o auxílio de tesoura e homogeneizados para contagem de espermatozóides, como descrito para o testículo. O tempo de trânsito através da cabeça/corpo e cauda do epidídimo foi obtido pela divisão do número de espermatozóides presentes em cada uma dessas regiões pela PDE.

### **Análise da motilidade e morfologia espermática**

Espermatozóides foram obtidos do ducto deferente direito dos animais na fase III (n=10 por grupo) para avaliação da motilidade dos gametas. Para tanto, o ducto foi seccionado e o material coletado foi imediatamente diluído em 2 ml de meio HTF modificado com gentamicina (Human Tubal Fluid, IrvineScientific®) pré-aquecido a 34°C. Uma alíquota de 10 µL foi colocada em câmara de Makler (Irvine, Israel) e analisada sob microscopia de contraste de fase Leica®, aumento de 200X. Foram avaliados 100 espermatozóides por animal, classificados quanto a sua motilidade em: Tipo A: móvel, com trajeto progressivo; tipo B: móvel, com trajeto não progressivo; tipo C: imóvel.

Para a avaliação da morfologia dos espermatozóides, o ducto deferente esquerdo dos animais na fase III (n=10 por grupo) foi coletado e lavado internamente com 1,0 mL de solução

de formol-salina. O conteúdo foi colhido em um ependorf e em seguida foram feitos esfregaços em lâminas histológicas. Com o auxílio de microscópio de contraste de fase Leica®, aumento de 400X, foram analisados 200 espermatozóides por animal. As anormalidades morfológicas encontradas nos espermatozóides foram classificadas em anormalidades da cabeça (sem curvatura característica ou sem curvatura - cabeça reta e cabeça isolada) e anormalidades da cauda (enrolada ou quebrada) (Filler, 1993). Estes também foram classificados quanto à presença ou ausência da gota citoplasmática.

### **Dosagens Hormonais**

As análises foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Odontologia da USP Ribeirão Preto. O sangue coletado dos animais na fase III foi centrifugado a 2500rpm, por 20 minutos, a 4°C para separação do soro, o qual foi estocado a -20°C até a realização das dosagens hormonais. As concentrações plasmáticas de LH e FSH foram determinadas por radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo utilizando Kits específicos fornecido pelo “National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases” (NIADDK; Baltimore, USA). Os anticorpos primários foram o anti-rat LH-S10 e FSH-S11, e as preparações padrões o LH-RP3 e o FSH-RP2. Os hormônios foram iodinados com <sup>125</sup>Iodo da NEN (Perkin Elmer, USA) e o segundo anticorpo foi produzido em ovelhas pelo Laboratório do Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci da FMRP-USP, utilizando como inócuo gamaglobulina de coelho. Ambos hormônios foram iodinados com <sup>125</sup>Iodo da NEN (Perkin Elmer, USA). As dosagens de testosterona foram realizadas utilizando-se o kit Testosterone (Diagnostic Systems Laboratories, USA).

Para a dosagem de testosterona intratesticular o testículo esquerdo de cada animal foi removido, congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio. No dia do teste os testículos foram descapsulados e o parênquima foi cortado em pedaços de aproximadamente 50mg. Cada pedaço foi pesado e colocado em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 1mL de meio 199 (M199). O meio 199 foi tamponado com 0,71g/L de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e 2,1 g/L Hepes, contendo 0,1%BSA (albumina sérica bovina) e 25mg/L de inibidor de tripsina de soja, com pH 7,4. Após centrifugação (5min, 10000 rpm), o meio foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o ensaio de dosagem hormonal, o qual foi realizado pela técnica de radioimunoensaio (RIE) de duplo anticorpo, utilizando-se o kit TESTOSTERONE MAIA® (Biochem Immuno System).

Todas as amostras foram dosadas em um mesmo ensaio para evitar erros inter-ensaios. Os erros intra-ensaio foram 4% para a testosterona, 2,8% para o FSH e 3,4% para o LH.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a comparação dos resultados entre os grupos experimentais foi utilizado, dependendo da natureza da distribuição dos dados, os testes t de Student ou o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

No DPN1 e nas diferentes fases do desenvolvimento estudadas (30, 60 e 90 dias de idade) os animais pertencentes ao grupo RH apresentaram uma redução estatisticamente significativa no peso corpóreo (Tabela 2). Os pesos absolutos do testículo (mg) aos 30 dias de idade (Grupo RP:

200,85 ± 8,29, n=10; Grupo RH: 163,67 ± 13,97\*, n=10) e do ducto deferente (mg) aos 90 dias de idade (Grupo RP: 95,85 ± 3,29, n=10; Grupo RH: 84,97 ± 2,75, n=10\*) foi estatisticamente menor nos animais do grupo RH quando comparado ao grupo RP (média ± EPM, \*p<0,05). Nas três fases do desenvolvimento o peso da vesícula seminal e da próstata ventral foi semelhante entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

A análise histológica dos testículos e epidídimos em microscopia de luz e a análise estereológica do epidídimo não revelou alterações que pudessem ser atribuídas à restrição protéica *in utero* (Tabela 3).

A contagem de núcleos de células de Sertoli nos ratos aos 90 dias de idade foi estatisticamente menor no grupo RH quando comparada ao grupo RP (Grupo RP: 11,45 ± 0,13, n=8; Grupo RH: 10,53 ± 0,13\*, n=8; média ± EPM, \*p<0,05).

A restrição protéica *in utero* provocou uma redução estatisticamente significativa no número de espermátides maduras no testículo, na produção diária de espermatozóides (PDE) e nas reservas espermáticas na cauda epididimária (Tabela 4).

A avaliação da motilidade dos espermatozóides revelou um aumento estatisticamente significativo no número de espermatozóides tipo B (móveis com trajeto não progressivo) nos animais do grupo RH quando comparados ao grupo RP (Figura 1).

A porcentagem de espermatozóides com morfologia anormal (predominantemente anormalidades de cabeça) foi estatisticamente maior nos animais pertencentes ao grupo RH, quando comparado aos animais do grupo RP (Tabela 4). Os espermatozóides avaliados no presente estudo apresentaram a gota citoplasmática na região mediana da cauda, independentemente do grupo experimental. No entanto, no grupo RH a porcentagem de

espermatozoides com gota citoplasmática foi estatisticamente maior quando comparadas ao grupo RP (Tabela 4).

Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais quanto ao grau de maturação do epitélio nas diferentes idades analisadas (dados não mostrados).

A restrição protéica *in utero* provocou uma diminuição não estatisticamente significativa de cerca de 27% da concentração sérica de testosterona em comparação ao grupo RP. Por outro lado, a concentração intratesticular de testosterona, assim como as concentrações séricas de FSH e LH foram similares entre os grupos (Figura 2).

## **DISCUSSÃO**

Há uma associação entre o retardo do crescimento intra-uterino e o aparecimento de doenças na vida adulta e isto conduz à hipótese de uma origem fetal para as doenças, sugerindo que fatores ambientais adversos, tais como desnutrição protéica materna *in utero*, agem no programa e no desenvolvimento do tecido fetal, produzindo disfunção e doenças posteriormente (Desai & Hales 1997; Godfrey & Barker 2000; Armitage *et al.* 2005).

Melo & Cury (1988) mostraram baixos níveis séricos de ácidos graxos, baixo teor de gordura e de proteína na carcaça das ratas gestantes que receberam dieta hipoprotéica (6% de proteína), concluindo que esta dieta provavelmente afeta o suprimento de nutrientes circulantes e ocasiona o baixo peso apresentado pelos filhotes ao nascimento. Nossos resultados mostraram que a restrição protéica *in utero* provocou redução do peso corpóreo dos animais que persistiu durante as diferentes fases do desenvolvimento sexual.

Os hormônios desempenham um papel vital para o início e a manutenção da função reprodutiva masculina (Meeker *et al.*, 2007). Sabe-se que a nutrição pode acarretar uma variedade de efeitos no sistema endócrino (Moura *et al.* 1997; Rocha de Melo & Guedes 1997; Passos *et al.* 2000, Teixeira *et al.* 2002). Alterações nos níveis de testosterona, FSH e LH são relatados na progênie de animais de diferentes espécies submetidas à desnutrição (Rae *et al.* 2002; Guzmán *et al.* 2005; Zambrano *et al.* 2005; Teixeira *et al.* 2007).

A determinação dos pesos absolutos e relativos de órgãos como testículos, epidídimos, hipófise, vesícula seminal e próstata são parâmetros úteis na avaliação de riscos sobre o aparelho reprodutor masculino. O peso normal do testículo apresenta uma baixa variabilidade entre os animais, o que sugere que o seu peso absoluto é um indicador preciso de injúria gonadal, embora este parâmetro possa não indicar a natureza do efeito (Clegg *et al.* 2001). A redução nos pesos absolutos do testículo na fase pré-puberal e nos pesos absolutos do ducto deferente na fase adulta dos animais do grupo ração hipoprotéica, em parte, pode ser explicado pelo menor peso corporal apresentado por esses animais, já que estes mesmos parâmetros, quando analisados em termos relativos (g órgão/100g peso), não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais.

As células de Sertoli em mamíferos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e função testicular. Em ratos sua proliferação ocorre ativamente durante o período fetal e cessa entre 2-3 semanas após o nascimento (França *et al.* 2005). Uma das principais funções da célula de Sertoli é criar um ambiente apropriado para a proliferação e maturação das células germinativas. Sabe-se que a quantidade de células de Sertoli é fator determinante para a produção máxima de espermátides na idade adulta (Sharpe 1994). Assim,

alterações no número, estrutura e/ou função deste tipo celular podem resultar em danos ao epitélio germinativo e comprometimento da espermatogênese (Boekelheid *et al.* 2005).

A desnutrição no período fetal até a puberdade pode levar a alterações na programação do número de células de Sertoli. Um forte indício de que a desnutrição no início da vida alterou esta programação é a baixa PDE no adulto (Genovese *et al.* 2009). Em nosso estudo a redução da PDE dos animais do grupo RH é consistente com a redução encontrada no número de células de Sertoli e de 27% dos níveis séricos de testosterona. Estes resultados corroboram com Zambrano *et al.* (2005) que submetendo ratos à restrição protéica *in utero* também observaram baixa contagem espermática e baixa taxa de fertilidade. Estes autores concluem que os efeitos pré-natais na contagem e na fertilidade enfatizam a importância das interações entre diferentes componentes-chave no desenvolvimento do testículo.

Os espermatozoides produzidos nos testículos são transportados para o epidídimo onde passam por um processo de maturação, adquirindo motilidade e capacidade de fertilização do ovócito (Orgebin-Crist 1969; Gatti *et al.* 2004). A motilidade espermática é um dos parâmetros mais importantes utilizados na avaliação da habilidade fértil dos espermatozoides obtidos de amostras de sêmen *in vitro* (Mahadevan & Trounson 1984) e *in vivo* (Bostofte *et al.* 1990; Barrat *et al.* 1993). Alterações nos parâmetros de motilidade podem levar a uma ineficiência dos espermatozoides quanto à penetração do muco cervical, impedindo seu acesso ao ovócito, reduzindo sua capacidade fertilizante (Aitken *et al.* 1985; Feneux *et al.* 1985; Mortimer *et al.* 1986; Clegg *et al.* 2001).

A retenção da gota nos espermatozoides ejaculados pode estar associada a causas de infertilidade em várias espécies de animais (Cooper 2005). Zini (1998) associou a retenção da

gota citoplasmática com a baixa motilidade espermática. Gatti *et al.* (2004) verificou que a migração da gota citoplasmática ocorre ao mesmo tempo em que a motilidade dos espermatozóides aumenta, mas a relação direta entre estes dois eventos ainda não foi demonstrada.

O aumento de espermatozóides móveis com trajeto não progressivo e com retenção de gota citoplasmática encontrado no presente estudo sugerem que pelo menos parte das funções epididimárias tenha sido afetada pela restrição protéica, apesar da estrutura e do tempo de trânsito epididimário encontrarem-se normais.

Outro parâmetro importante na avaliação do potencial fértil de machos é a morfologia espermática, cujas alterações podem sugerir eventos citotóxicos. Sabe-se que o aumento de espermatozóides com anormalidades de cabeça podem refletir mutagenicidade das células germinativas (U.S.EPA 1996). Embora o grau de maturação do epitélio e os resultados das análises histológicas dos testículos dos animais do grupo RH nas diferentes fases do desenvolvimento não terem revelado danos aparentes ao epitélio, o aumento de espermatozóides com anormalidades de cabeça sugerem que a restrição protéica *in utero* provocou efeitos deletérios no processo espermatogênico.

Em conclusão, podemos sugerir que a restrição protéica *in utero*, nestas condições experimentais, causou retardo de crescimento e alterou a programação do sistema reprodutivo masculino de ratos, provocando danos espermáticos na idade adulta.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, na forma de bolsa de mestrado (processo nº 07/57375-5). Os autores gostariam de agradecer aos técnicos do Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP, Campus de Botucatu-SP pelo auxílio na produção das rações.

## **REFERÊNCIAS**

Aitken RJ, Sutton M, Waner P & Richardson DW (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamsters oocytes. *J Reprod Fertil*, **73**, 441-449.

Allden WG (1979). Undernutrition of Merino sheep and its sequelae 5. The influence of severe growth retardation during early post-natal life on reproduction and growth in later life. *Aust J Agric Sci*, **30**, 939-948.

Armitage JA, Taylor PD & Poston L (2005). Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to a energy rich diet during development. *J Physiol*, **565**, 3-8.

Ashton N (2000). Perinatal development and adult blood pressure. *Braz J Med Biol Res*, **33**, 731-740.

Barratt CLR, Tomlinson MJ & Cooke ID (1993). Prognostic significance of computerised motility analysis for in vivo fertility. *Fertil Steril*, **60**, 520-525.

Boekelheid K, Johnson KJ & Richburg JH (2005). Sertoli cell toxicants. In: *Sertoli cell Biology*, ed Skinner M.K., Griswold M.D., pp. 345-82. Elsevier Academic Press, San Diego.

Bostofte E, Bagger P, Michael A & Stakemann G (1990). Fertility prognosis for infertile men from two different population evaluated by the Cox regression model. *Fertil Steril*, **54**, 1100-1106.

Clegg E (1960). The age at which male rats become fertile. *J Reproduct Fertil*, **1**, 119-20.

Clegg ED, Perreault SD & Klinefelter GR (2001) Assessment of male reproductive toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, 4th edn, ed. Hayes AW, pp. 1263-1299. Taylor & Francis, Philadelphia.

Cooper TG (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human reproduction*, **20**, 9-11.

Desai M, Crowther NJ, Lucas A & Hales CN (1996). Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Brith J Nutri*, **76**, 591-603.

Desai M & Hales CN (1997). Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **72**, 329-348.

Edwards LJ, Coulter Cl., Symonds ME & Mcmillen IC (2001). Pre-natal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **28**, 938-941.

Feneux D, Serres C & Jouannet P (1985). Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility? *Fertil Steril*, **44**, 508-511.

Fernandes GSA, Arena AC, Fernandez CDB, Mercadante A, Barbisan LF & Kempinas WG (2007). Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod Toxicol* **23**, 106-112.

Filler R (1993). Methods for evaluation of rats epididymal sperm morphology, In: *Male reproductive toxicology*, ed. Chapin RE & Heindel JH, pp. 334-343. San Diego, California.

França LR, Avelar GF & Almeida FFL (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, **63**, 300-318.

Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecruyd H, Métayer S, Thimon V & Dacheux JL (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*, **82-83**, 321-339.

Genovese P, Núñez ME, Pombo C & Bielli A (2009). Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reprod Dom Anim*, **44**, 1-4.

Godfrey KM & Barker DJP (2000). Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*, **71**, 1344S-1352S.

Gunn RG, Doney JM & Russel AJF (1972). Embryo mortality in Scottish Blackface ewes as influenced by body condition at mating and by post-mating nutrition. *Aust J Agric Sci*, **79**, 19-25.

Gunn RG (1977). The effects of two nutritional environments from 6 weeks prepartum to 12 months of age on lifetime performance and reproductive potential of Scottish Blackface ewes in two adult environment. *Anim Prod*, **25**, 155-164.

Guzmán C, Cabrera M, Cárdenas M, Larrea F, Nathanielsz PW & Zambrano E (2006). Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol*, **572**, 97-108.

Heindel JJ (2007). Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod Toxicol*, **23**, 257-259.

Hoet JJ & Hanson MA (1999). Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol*, **514**, 617-627.

Lamano-Carvalho TL, Guimarães MA, Kempinas WG, Petenusci SO & Rosa e Silva AAM (1996). Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal do mature rats. *Andrologia*, **28**, 117-22.

Langley SC & Jackson AA (1994). Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci*, **86**, 217-22.

Langley-Evans SC, Gardner DS & Welham SJ (1998). Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition*, **14**, 39-47.

Leblond CP & Clermont Y (1952). Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the “periodic acid-fuchsin sulfurous acid” technique. *Am J Anat*, **90**, 167-215.

Leonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC & Dupouy JP (2003). Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod*, **68**, 390-400.

Mahadevan MM & Trounson AO (1984). The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **42**, 400-405.

Meeker JD, Godfrey-Bailey L & Hauser R (2007). Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl*, **28**, 397-406.

Melo MAR & Cury L (1988). Maternal adaptations for fetal growth in young malnourished rats. *Braz J Med Biol Res*, **21**, 1053-1056.

Mortimer, D., Panday, I. J. & Sawers, R. S (1986). Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *J Reprod Fertil*, **78**: 93-102.

Mota EC, Santos AM, Toste FP, Sampaio FJB & Ramos CFR (2001). Effects of malnutrition in the testis. *Braz J Urol*, **27**, 500-506.

Moura AS, Caldeira-Filho JS, Mathias PC & Franco de Sá CCN (1997). Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commu Mol Path*, **96**, 180-192.

Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP & White SS (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr Rev*, **1**, 228–257.

Orgebin-Crist MC (1969). Studies on the function of the epididymis. *Biol Reprod*, **1**, 155-175.

Passos MCF, Ramos CF & Moura EG (2000). Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res*, **20**, 1603-1612.

Rae MT, Kyle C E, Millar DW, Hammond AJ, Brooks AN & Rhind SM (2002). The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Anim Reprod*, **72**, 63-71, 2002.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 939-51, 1993.

Robb GW, Amann RP & Killian GJ. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fert*, **54**, 103-107.

Rocha de Melo AP & Guedes RCA (1997). Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz J Med Biol Res* **30**, 663-669.

Sharpe RM (1994). Regulation of spermatogenesis. In: *The physiology of reproduction*, 2nd, ed. Knobil E & Nelly JD, pp. 1363-1434. Raven press, New York.

Sherman RC & Langley-Evans SC (2000). Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci*, **98**, 269-275.

Teixeira CT, Passos MCF, Ribeiro CRS, Dutra SP & Moura EG (2002). Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Bioch*, **13**, 493-498.

Teixeira CT, Silandre D, Santos AMS, Delalandre C, Sampaio FJB, Carreau S & Ramos CF (2007). Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol*, **192**, 301-311.

Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L & Hanson MA (2003). Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol*, **547**, 77-84.

U.S.EPA. (1996). United State Environmental Protection Agency. Reproductive Toxicity Risk Assessment Guidelines, **61**, 56273-322,.

Weibel ER (1963). Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* **12**, 131-155.

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.

Zanato VF, Martins MP, Anselmo-Franci JAA, Petenusci SO & Lamano Carvalho TL (1994). Sexual development of male *Wistar* rats. *Braz J Med Biol Res*, **27**, 1273-1280.

Zini A, O'Bryan MK, Israel L & Schlegel PN (1998). Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: correlation with sperm motility. *Urology*, **51**, 464-468.

## **Legenda das figuras**

**Figura 1.** Motilidade espermática dos animais com 90 dias de idade dos grupos ração padrão – RP e ração hipoprotéica – RH (n=10). Valores expressos em mediana. Teste Mann-Whitney, \*p < 0,05. Tipo A (motilidade progressiva), tipo B (motilidade sem progressão) e tipo C (imóveis).

**Figura 2.** Concentração sérica de testosterona (A), LH (C), FSH (D) e intratesticular de testosterona (B) dos animais aos 90 dias de idade dos grupos ração padrão – RP e ração hipoprotéica – RH. Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste Mann-Whitney.

**Tabela 1.** Composição das rações (g/kg).

Componentes	Hipoprotéica (6% proteína)	Padrão (17% proteína)*
Amido de milho	480	397
Caseína (84%)	71,5	202
Dextrina (90-94%)	159	130,5
Sacarose	121	100
Óleo de soja	70	70
Fibra (Microcelulose cristalina)	50	50
Mistura de minerais **	35	35
Mistura de vitaminas **	10	10
L-cistina	1	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5

\* Dieta para as fases de crescimento, prenhez e lactação de roedores-AIN-93G [20].

\*\* Segundo AIN-93G.

**Tabela 2.** Peso corpóreo (g) dos filhotes machos no DPN1 (n=10 ninhadas por grupo experimental) e aos 30, 60 e 90 dias de idade pertencentes aos grupos ração padrão - RP (n=8 filhotes por idade) e ração hipoprotéica - RH (n=10 filhotes por idade). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste “t” de Student, \*p< 0,05.

<b>Peso corpóreo (g)</b>	<b>Grupo RP</b>	<b>Grupo RH</b>
DPN 1	6,87 $\pm$ 0,18	6,07 $\pm$ 0,12*
DPN 30	70,88 $\pm$ 2,01	57,53 $\pm$ 2,65*
DPN 60	287,40 $\pm$ 5,67	257,42 $\pm$ 8,81*
DPN 90	407,15 $\pm$ 9,75	351,53 $\pm$ 11,93*

DPN – dia pós-natal

**Tabela 3.** Análises morfométricas do testículo e epidídimo dos animais dos grupos ração padrão - RP e ração hipoprotéica – RH aos 30,60 e 90 dias de idade.

Parâmetros	Grupo RP			Grupo RH		
	30 dias (n=10)	60 dias (n=9)	90 dias (n=10)	30 dias (n=10)	60 dias (n=9)	90 dias (n=9)
<i>Testículo</i>						
Túbulos normais (%)	70 [66-70]	97 [97-99]	96 [96-97]	68 [63,5-70,75]	98 [97-99]	97 [96-98]
<i>Epidídimo</i>						
		60 dias (n=8)	90 dias (n=8)		60 dias (n=8)	90 dias (n=8)
Epitélio (%)		24,7 [21,1-27,8]	12,5 [9,8-16,0]		25,6 [22,6-28,9]	11,9 [8,3-15,0]
Luz (%)		47,6 [41,8 -52,8]	71,4 [66,0-75,9]		46,4 [38,7-50,3]	72,0 [67,9-78,0]
Interstício (%)		29,2 [23,4-33,2]	16,0 [12,2-21,1]		26,8 [23,8-35,1]	14,9 [11,8-17,9]

Valores expressos em mediana [Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub> ] Teste de Mann-Whitney.

**Tabela 4.** Parâmetros espermáticos de ratos machos aos 90 dias de idade (número e morfologia espermática) dos animais dos grupos ração padrão - RP e ração hipoprotéica – RH.

Parâmetro	Grupo RP (n=10)	Grupo RH (n=10)
<i>Contagens espermáticas no testículo</i>		
Número de espermatozóides ( $\times 10^6$ )	168,77 $\pm$ 8,98	140,30 $\pm$ 5,61*
Número de espermatozóides/g órgão ( $\times 10^6$ /g)	133,22 $\pm$ 8,04	116,28 $\pm$ 4,31
PDE ( $\times 10^6$ /testículo/dia)	27,66 $\pm$ 1,47	23,05 $\pm$ 0,92*
PDEr ( $\times 10^6$ /dia/g)	21,83 $\pm$ 1,32	19,11 $\pm$ 0,73
<i>Contagens espermáticas no epidídimo</i>		
<i>Cabeça/corpo</i>		
Número de espermatozóides ( $\times 10^6$ )	123,98 $\pm$ 7,34	113,95 $\pm$ 6,50
Número de espermatozóides/g órgão ( $\times 10^6$ /g)	386,08 $\pm$ 17,66	386,00 $\pm$ 14,35
Tempo de trânsito (dias)	4,56 $\pm$ 0,31	4,96 $\pm$ 0,32
<i>Cauda</i>		
Número de espermatozóides ( $\times 10^6$ )	182,12 $\pm$ 4,47	140,09 $\pm$ 8,62*
Número de espermatozóides/g órgão ( $\times 10^6$ /g)	1091,50 $\pm$ 44,84	895,93 $\pm$ 38,38*
Tempo de trânsito (dias)	6,70 $\pm$ 0,32	6,12 $\pm$ 0,35
<sup>1</sup> Espermatozóides normais (%)	96,25 [95,62 – 96,87]	94 [92,25 – 94,87]*
<sup>1</sup> Espermatozóides com presença de gota citoplasmática (%)	45,75 [37,13 – 54,87]	70,25 [64,50 – 79,37]*

PDE - Produção diária de espermatozóides. PDEr - Produção diária relativa de espermatozóides. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Teste de Mann-Whitney, \*p < 0,05. <sup>1</sup> Valores expressos em mediana [Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>] Teste de Mann-Whitney.

Figura 1

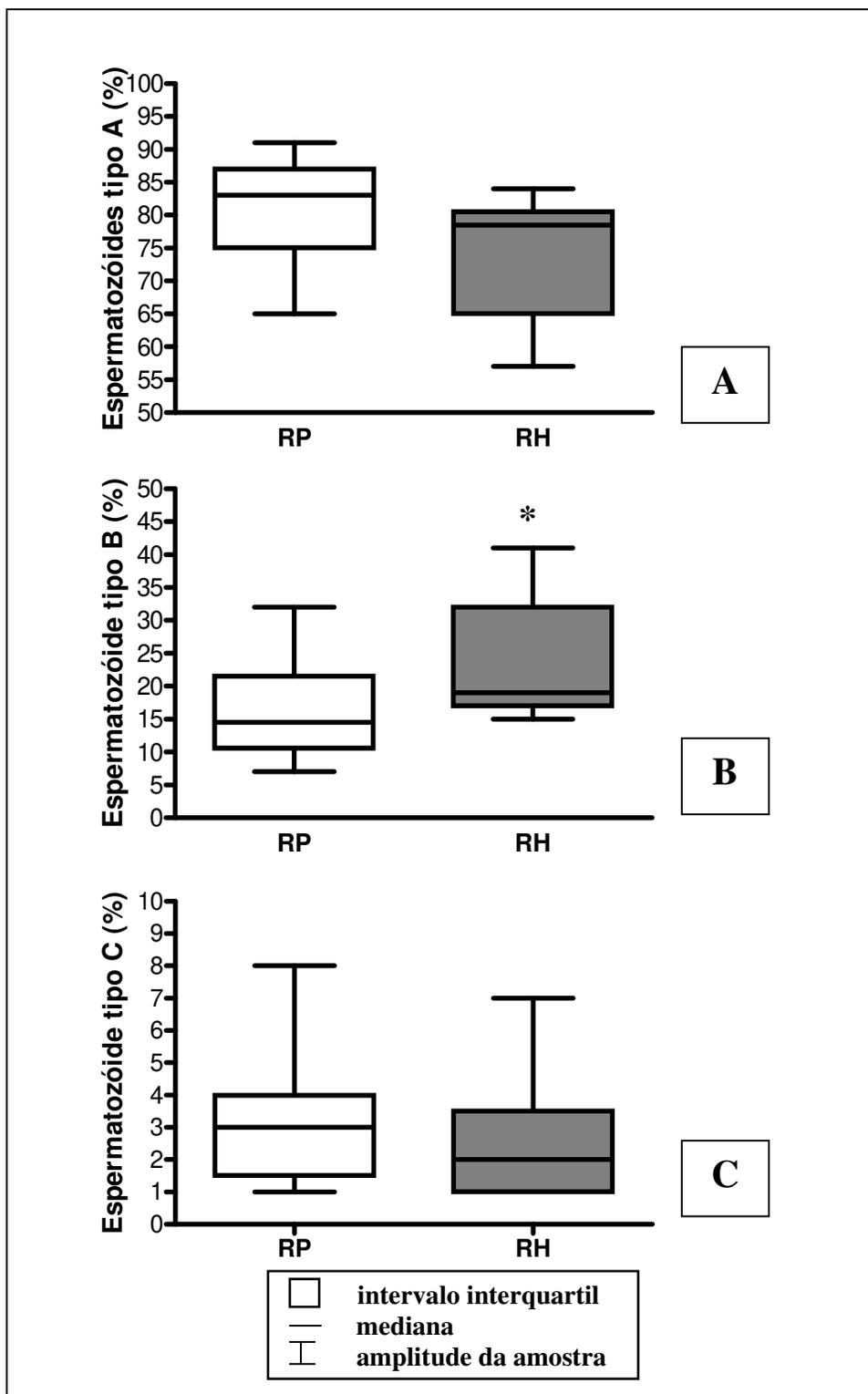
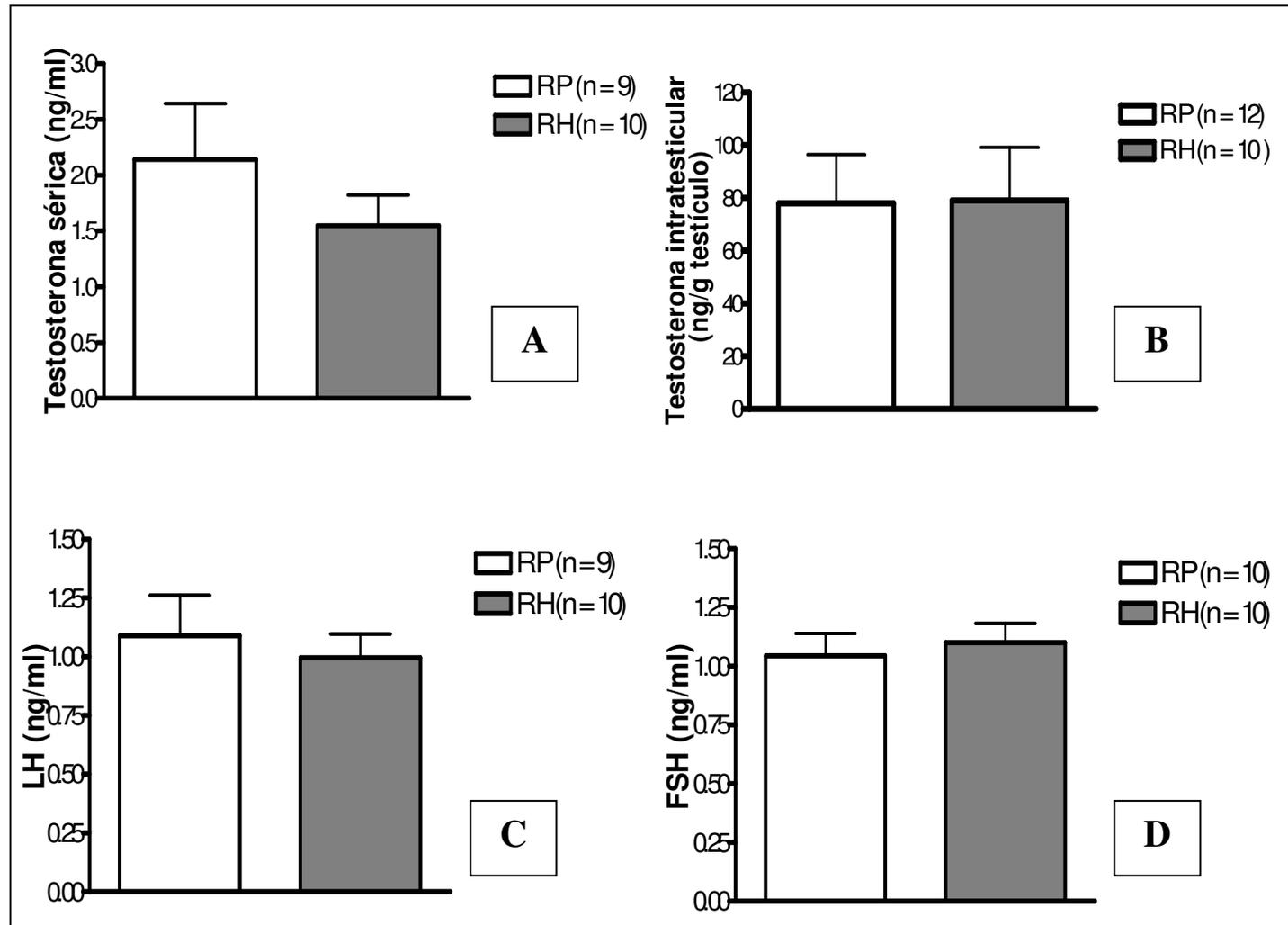


Figura 2



#### **4. CONCLUSÕES FINAIS**

Em conclusão, podemos sugerir que a restrição protéica *in utero*, nestas condições experimentais, altera a programação do sistema reprodutivo masculino e compromete o desenvolvimento sexual, atrasando o início da puberdade e provocando danos espermáticos na idade adulta. Além disso, o retardo na idade de instalação dos sinais físicos externos do início da puberdade sugere que o período do desenvolvimento intra-uterino é crítico para o início e progressão da puberdade em machos e fêmeas.

## 5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- Allden, W.G. 1979. Undernutrition of Merino sheep and its sequelae 5. The influence of severe growth retardation during early post-natal life on reproduction and growth in later life. *Aust J Agric Sci*, 30: 939-948.
- Ashton, N. 2000. Perinatal development and adult blood pressure. *Braz J Med Biol Res*, 33: 731-740.
- Barker, D.J.P.; Osmond, C.; Golding, J.; Kuh, D.; Wadsworth, M.E.J. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*, 298: 564-567.
- Barker, D.J.P. 1997. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Brit Med Bull*, 53: 96-108.
- Bieswal, F.; Ahn, M.T.; Reusens, B.; Holvoet, P.; Raes, M.; Rees, W.D.; Remacle, C. 2006. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity*, 14: 1330-1343.
- Boutin, E.L.; Cunha, G.R. 1997. Estrogen-induced epithelial proliferation and cornification are uncoupled in sinus vaginal epithelium associated with uterine stroma. *Differentiation*, 62: 171-178.
- Clermont, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52: 198-236.
- Crain, D.A.; Janssen, S.J.; Edwards, T.M.; Heindel, J.; Shuk-mei Ho; Hunt, P.; *et al.* 2008. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril*, 90: 911-940.

- Da Silva, P.; Aitken, R.P.; Rhind, S.M.; Racey, P.A.; Wallace, J.M. Influence of placentally-mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reproduction*, 123: 375-383.
- Desai, I.D.; Garcia Tavares, M.L.; Oliveira, B.S.D.; Douglas, A.; Duarte, F.A.; Oliveira, J.E. 1980. Food habits and nutritional status of agricultural migrant workers in Southern Brazil. *Am J Clin Nutr*, 33: 702-714.
- Desai, M.; Crowther, N.J.; Lucas, A.; Hales, C.N. 1996. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Brith J Nutri*, 76: 591-603.
- Desai, M.; Hales, C.N. 1997. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 72: 329-348.
- Dietary Reference Intake (DRI). 1990. Nutrition during pregnancy: Part I: Weight gain, Part II: Nutrient supplements. Disponível em: [www.nap.edu/catalog/1451.html](http://www.nap.edu/catalog/1451.html)>. Acesso em 20 de setembro de 2009.
- Edwards, L.J.; Coulter, C.L.; Symonds, M.E.; Mcmillen, I.C. 2001. Pre-natal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28: 938-941.
- Eickman S.H.; Lira P.I.C.; Lima M.C. 2002. Desenvolvimento mental e motor aos 24 meses de crianças nascidas a termo com baixo peso. *Arq Neuropsiquiatri*, 60: 748-754.
- Engelbregt, M.J.; Houdijk, M.E.; Popp-Snijders, C.; Delemarre-van de Waal, H.A. 2000. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male rats and female rats. *Pediatr Res*, 48: 803-807.
- Escoda, M.S.Q. 2002. Para a crítica da transição nutricional. *Ciênc Saúde Coletiva*, 7: 219-226.

- Frisch, R.E. 1980. Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed Proc*, 39: 2395-2400.
- Genovese, P.; Núñez, M.E.; Pombo, C.; Bielli, A. 2009. Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. *Reprod Dom Anim*, 44: 1-4.
- Gunn, R.G.; Doney, J.M.; Russel, A.J.F. 1972. Embryo mortality in Scottish Blackface ewes as influenced by body condition at mating and by post-mating nutrition. *Aust J Agric Sci*, 79: 19-25.
- Gunn, R.G. 1977. The effects of two nutritional environments from 6 weeks prepartum to 12 months of age on lifetime performance and reproductive potential of Scottish Blackface ewes in two adult environment. *Anim Prod*, 25: 155-164.
- Guzmán, C.; Cabrera, M.; Cárdenas, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W.; Zambrano, E. 2006. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol*, 572: 97-108.
- Hayward, S.W.; Baskin, L.S.; Haughney, P.C.; Foster, B.A.; Cunha, A.R.; Dahiya, R.; Prins, G. S.; Cunha, G.R. 1996. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anatomica*, 155: 94-103.
- Hendel, J.J. 2007. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod Toxicol*, 23: 257-259.
- Hermo, L.; Robaire, B. 2002. Epididymal cell types and their functions. In: *The Epididymis – from molecules to clinical practice*. (eds. B. Robaire & B. T. Hinton), Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 81-102.

- Hoet, J.J.; Hanson, M.A. 1999. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol*, 514: 617-627.
- Holemans, K.; Aerts, L.; Van Assche, F.A. 2003. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Invest*, 10: 392-399.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. 2008 – Pesquisa Nacional de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003: Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil. Disponível em <<http://www.ibge.br>>. Acesso em 10 setembro de 2009.
- Jones, R.C. 1999. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Inter J Androl*, 22: 57-67.
- Karlberg, J.; Jalil, F.; Lam, B.; Yeung, C.Y. 1994. Linear growth retardation in relation to the three phases of growth. In: Causes and mechanisms of linear growth retardation. Waterlow, J.C., Schurch, B. *Eur J Clin Nutr*, 48(1): S24-S44.
- Kouba, S.; Hallstrom, T.; Lindholm, C.; Hirschberg, A.L. 2005. Pregnancy and neonatal outcomes in women with eating disorders. *Obstet & Gynecol*, 105: 255-260.
- Lajolo, F. M.; Tirapegui, J. 2000. Proteínas e Aminoácidos. In: Ciências nutricionais. (eds. Dutra-de-Oliveira; J.E., Marchini, J.E. Sarvier), São Paulo, 41-69.
- Langley, S.C.; Jackson, A.A. 1994. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci*, 86: 217-22.
- Langley-Evans, S.C.; Gardner, D.S.; Welham, S.J. 1998. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition*, 14: 39-47.

- Langley-Evans, S.C. 2008. Nutritional programming of disease: unraveling the mechanism. *J Anat*, 215: 36-51.
- Law, C.M.; Barker D.J.P.; Bull, A.R.; Osmond, C. 1991. Maternal and fetal influences on blood pressure. *Arch Dis Child*, 61: 1291-1295.
- Law, C. 2001. Adult obesity and growth in childhood. *BMJ*, 323: 1320-1321.
- Leonhardt, M.; Lesage, J.; Croix, D.; Dutriez-Casteloot, I.; Beauvillain, J.C.; Dupouy J.P. 2003. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod*, 68: 390-400.
- Lira, P.I.C.; Ashworth, A.; Morris, S.S. 1996. Low birth weight and morbidity from diarrhea and respiratory infection in Northeast Brazil. *J Pediatric*, 128: 497-504.
- Lucas, A.; Fewtrell, M.S.; Cole, T.J. 1999. Fetal origins of adult disease – the hypothesis revisited. *BMJ*, 319: 245-249.
- Lucas, A. 1994. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child*, 71: 288-290.
- Luz, T.P.; Neves, L.A.T.; Reis, A.F.F.; Silva, G.R.; Silva, L.G.P. 1998. Magnitude do problema do baixo peso ao nascer. *J Bras Ginecol*, 108: 133-144.
- Mann, T. 1974. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Repr Fert*, 37: 179-188.
- Malandro, M.S.; Beveridge, M.J.; Kilberg, M.S.; Novak, D.A. 1996. Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport. *Am J Physiol Cell Physiol*, 271: C295-C303.
- Martin-Gronert, M.S.; Ozanne, S.E. 2006. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Clin Sci*, 34: 779-782.

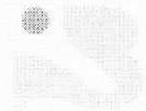
- Marty, M.S.; Chapin, R.E.; Parks, L.G.; Thorsrud, B.A. 2003. Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 68: 125-136.
- Mcintyre, B.S.; Barlow, N.J.; Foster, P.M. 2002. Male rats exposed to linuron *in utero* exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retraction, and epididymal malformations that result in subsequent testicular atrophy. *Toxicol Sci*, 65: 62-70.
- Meeker, J.D.; Godfrey-Bailey, L.; Hauser, R. 2007. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl*, 28: 397-406.
- Melo, M.A.R.; Cury, L. 1988. Maternal adaptations for fetal growth in young malnourished rats. *Braz J Med Biol Res*, 21: 1053-1056.
- Ministério da Saúde. 2002. Secretária de Políticas de Saúde. Saúde da criança. Acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil. Brasília: O Ministério: Série cadernos de atenção básica 11, Série A: Normas e manuais Técnicos, 173.
- Monte, C.M.G. 2000. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. *J Pediatr*, 76(3): S285-S297.
- Monteiro, C.A. 2003. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estudos avançados*, 14 (48): 7-20.
- Mota, E.C.; Santos, A.M.; Toste, F.P.; Sampaio, F.J.B.; Ramos, C.F.R. 2001. Effects of malnutrition in the testis. *Braz J Urol*, 27: 500-506.
- Moura, A.S.; Caldeira-Filho, J.S.; Mathias, P.C.; Franco de Sá, C.C.N. 1997. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commu Mol Path*, 96: 180-192.

- Ojeda, S.R.; Urbanski, H.F. Puberty in the rat. 1994. In: The physiology of reproduction. (eds. Knobil, E., Neill, J.D.). Raven Press, New York, 363-410.
- Onis, M.; Blossner, M.; Borghi, E.; Frongillo, E.; Morris, R. 2004. Estimates of global prevalence of childhood underweight in 1990 and 2015. JAMA, 291: 2600-2606.
- Onis, M.; Blossner, M. 2003. The World Health Organization Global database on child growth and malnutrition: methodology and applications. Int J Epidemiol, 32: 518-526.
- Orgebin-Crist, M.C & Jahad, N. 1978. The maturation of rabbit epididymal spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. Endocrinology, 103: 46-53.
- Passos, M.C.F.; Ramos, C.F.; Moura, E.G. 2000. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. Nutr Res, 20: 1603-1612.
- Peterson, R.E.; Cooke, P.S.; Kelce, W.R.; Gray, L.E.Jr. 1997. Environmental endocrine disruptors. In: Comprehensive Toxicology: Reproductive and Endocrine Toxicology (eds. Boekelheide K., Chapin, R.E., Hoyer, P.B., Harris, C.). Pergamon, New York, 10: 181.
- Rae, M.T.; Kyle, C.E.; Millar, D.W.; Hammond, A.J.; Brooks, A.N.; Rhind, S.M. 2002. The effects of undernutrition, *in utero*, on reproductive function in adult male and female sheep. Anim Reprod, 72: 63-71.
- Ramos, C.F.; Teixeira, C.V.; Passos, M.C.; Pazos-Moura, C.C.; Lisboa, P.C.; Curty, F.H.; Moura, E.G. 2000. Low-protein diet changes thyroid function in lactating rats. Proc Soc Exp Biol Med, 224: 256-263.
- Reid, B.L.; Cleand, K.W. 1957. The structure function of the epididymis. I-The histology of the rat epididymis. Aust J Zool, 5: 223-251.

- Rhind, S.M.; Rae, M.T.; Brooks, N. 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction*, 122: 205-214.
- Rocha de Melo, A.P.; Guedes, R.C.A. 1997. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. *Braz J Med Biol Res*, 30: 663-669.
- Rodriguez, J. A.; Favaretto, A. L. V. 1999. Sistema reprodutor. In: *Fisiologia* (ed. M. M. Aires), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 877-917.
- Ronnekleiv, O.K.; Ojeda, S.R.; Cann, S.M. 1978. Undernutrition puberty and the development of estrogen positive feedback in the female rats. *Biol Reprod*, 19: 414-424.
- Roy-Burman, P.; Wu, H.; Powell, W.C.; Hagenkord, J.; Cohen, M.B. 2004. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer*, 11: 225-324.
- Russell, L.D.; Ettlin, R.A.; Sinhaikin, A.T.; Clegg, E.D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater.
- Satish, C.K. 2000. Protein metabolism in pregnancy. *Am J Clin Nutr*, 71: S1249-S1255.
- Schofield, C.; Asworth A. 1996. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? *Bull World Health Org*, 74: 223-229.
- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: *The physiology of reproduction* (eds. Knobil E & Nelly JD), Raven press, New York, 2nd, 1363-1434.
- Sherman, R.C. & Langley-Evans, S.C. 2000. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci*, 98: 269-275.

- Sokol, R.Z. 1997. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis as a target for toxicants. In: Comprehensive toxicology (eds. Sipes G., McQueen C. A., Gandolfi A. J.). Cambridge university Press, Cambridge, 87-98.
- Sommer, R.J.; Ippolito, D.L.; Peterson, R.E. 1996. *In utero* and lactacional exposure of the male Holtzman rat to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. *Toxicol Appl Pharmacol*, 140:146-53.
- Sousa, F.C.; Miranda Neto, M.H. 2007. Desnutrição: inter-relações entre os aspectos celulares e sociais. *Arq Mudi*, 11: 41-48.
- Teixeira, C.T.; Passos, M.C.F.; Ribeiro, C.R.S.; Dutra, S.P.; Moura, E.G. 2002. Leptin serum concentration, food intake and body weigh in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Bioch*, 13: 493-498.
- Teixeira, C.T.; Silandre, D.; Santos, A.M.S.; Delalandre, C.; Sampaio, F.J.B.; Carreau, S.; Ramos, C.F. 2007. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol*, 192: 301-311.
- Torrens, C.; Brawley, L.; Barker, A.C.; Itoh, S. Poston, L.; Hanson, M.A. 2003. Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol*, 547: 77-84.
- US EPA (United State Environmental Protection Agency). 1996. Reproductive toxicity risk assessment guidelines. United State Environmental Protection Agency—US EPA, 61: 56273–322
- Vanpee, M.; Blennow, M.; Line, T.; Herin, P.; Aperia, A. 1992. Renal function in very low birth weight infants: Normal maturity reached durin early childhood. *J Pediatr*, 121: 784-788.

- Williams, S.; George, I.M.; Silva, P.A. 1992. Intrauterine growth retardation and blood pressure at age seven and eighteen. *J Clin Epidemiol*, 45: 1257-1263.
- Wolansky N. 1970. Genetic and ecological factors in human growth. *Hum Biol*, 42: 349.
- World Health Organization. 1995. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization. Disponível em: [http://www.who.int/childgrowth/publications/physical\\_status/en/](http://www.who.int/childgrowth/publications/physical_status/en/). Acesso em 20 de setembro de 2009.
- World Health Organization. 2008. Determinants and prevention of low birth weight: A synopsis of the evidence. Disponível em: [http://www.who.int/pmnch/topics/newborn/200812\\_ihe/en/](http://www.who.int/pmnch/topics/newborn/200812_ihe/en/). Acesso em 20 de setembro de 2009.
- Young, K. A.; Zirkin, B. R.; Nelson, R. J. 2000. Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in White-Footed mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. *Biol Reprod*, 62: 347-354.
- Zambrano, E.; Rodriguez-González, G.L.; Guzmán, C.; García-Becerra, R.; Boeck, L.; Díaz, L.; Menjivar, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W. 2005. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol*, 563: 275-284.
- Zambrano, E.; Bautista, C.J.; Deás, M.; Martínez-Samayoa, P.M.; González-Zamorano, M.; Ledesma, H.; Morales, J.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W. 2006. 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*, 571: 221-230.



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 10/08-CEEA, sobre “**Restrição protéica in utero: desenvolvimento sexual e histofisiologia do sistema reprodutivo de ratos machos**”, sob a responsabilidade de **WILMA DE GRAVA KEMPINAS**, 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 **07/03/2008**.

Botucatu, 7 de março de 2008.



Prof. Dr. MARCELO RAZERA BARUFFI  
Presidente - CEEA



NADIA JOVÊNCIO COTRIM  
Secretária - CEEA

## DECLARAÇÃO

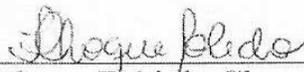
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada: **Restrição protéica *in utero*: desenvolvimento sexual e histofisiologia do sistema reprodutivo de ratos machos**

( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

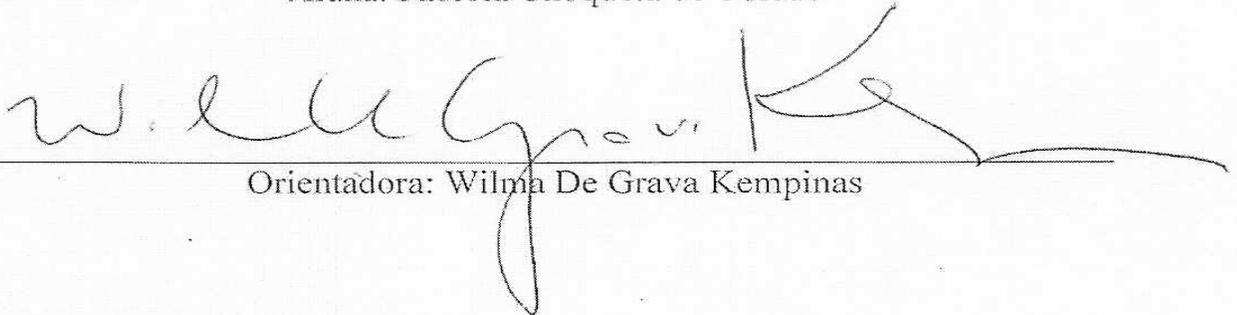
( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

( X ) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 10/08 CEEA).

( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).



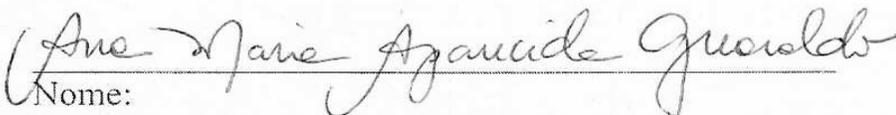
Aluna: Fabiela Choqueta de Toledo



Orientadora: Wilma De Grava Kempinas

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEAI/IB - UNICAMP