

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JESSICA SANTANA DE OLIVEIRA

**Efeito da dieta hipoproteica durante a vida intrauterina e pós-natal
no testículo de ratos Wistar**

Recife, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JESSICA SANTANA DE OLIVEIRA

**Efeito da dieta hipoproteica durante a vida intrauterina e pós-natal
no testículo de ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de /Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Junior
Co-orientadora: Elizabeth Neves de Melo

Recife, 2014

Ficha Catalográfica

O48e

Oliveira, Jessica Santana de

Efeito da dieta hipoproteica durante a vida intrauterina e pós-natal no testículo de ratos Wistar abióticos / Jéssica Santana de Oliveira. -- Recife, 2014.

78 f.: il.

Orientador (a): Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.

Inclui anexo(s) e referências.

1. Restrição protéica 2. Testículos 3. Espermatogênese
I. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, orientador II. Título

CDD 591.4

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**Efeito da dieta hipoproteica durante a vida intrauterina e pós-natal no testículo
de ratos Wistar**

JESSICA SANTANA DE OLIVEIRA

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA:



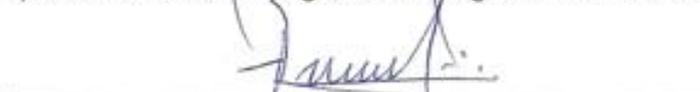
Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Orientador)
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal – UFRPE



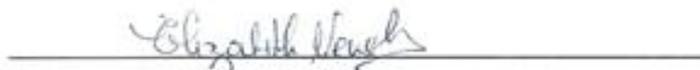
Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária - UFCG



Prof. Dr. Marcelo Westein Teixeira
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal - UFRPE



Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE



Profª. Drª. Elizabeth Neves de Melo
Departamento de Anatomia – UFPE

AGRADECIMENTOS

Deus, por me dar forças para seguir em frente e por sempre mostrar que sou capaz.

Minha família, principalmente meus pais, pela confiança, preocupação, dedicação, estímulo e por todo o apoio em todos os momentos.

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior, por toda a confiança ao me receber em seu laboratório, por todos os momentos de ensinamentos, preocupação, apoio e, principalmente, por sempre estar presente quando precisei.

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Neves de Melo, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada e por toda a calma transmitida.

Alluanan Adelson, por dividir todos os momentos de apreensão, nervosismo, todas as intermináveis horas de experimento e cansaço. Obrigada por toda a amizade e apoio nesses 8 anos que caminhamos juntos. Estamos aí para mais.

Anna Kelly, Fabiana (Bibina) e Ana Katharyne, por toda a ajuda durante o experimento, apoio e confiança. Por todos os momentos de bullying, descontração e pela amizade formada durante esse ano. Vocês fizeram todo o trabalho ser mais leve.

Aos demais membros dos laboratórios da UFPE e UFRPE, obrigada por tudo que vocês me ensinaram. Sem vocês, nada disso poderia ter sido feito.

Prof.^a Dr.^a Sandra Lopes de Souza e sua equipe pela ajuda com o preparo das rações.

Prof.^a Dr.^a Rosana Nogueira de Moraes, pelas dosagens hormonais.

Aos amigos de mestrado, por dividir todos os momentos de seminários, aulas, trabalhos, por toda ajuda e apoio.

Aos amigos que desde a graduação compartilham os momentos difíceis, sempre ajudando e apoiando.

Deniele Lós, por dividir os desesperos com mestrado e especialização, todo o apoio e estímulo.

Aos demais amigos, obrigada por sempre confiarem em mim, mesmo quando eu duvidava, por todo o apoio, estímulo e por sempre entenderem as diversas vezes que eu negava os convites para sair.

Resumo

Este estudo objetivou investigar o efeito da dieta hipoprotéica nos períodos de vida intrauterina e pós-natal sobre o testículo de ratos Wistar. Ratas foram acasaladas e, após a confirmação da prenhez, divididas em quatro grupos e alimentadas durante a prenhez e a lactação: Grupo Controle (GC), alimentadas com dieta normoproteica; Grupo Desnutrido (GD), alimentadas com dieta hipoproteica; Grupo Desnutrido Pós-natal (GDPós), alimentadas com dieta normoproteica na gestação e com a dieta hipoproteica na lactação; Grupo Desnutrido Pré-natal (GDPré), alimentadas com a dieta hipoproteica na prenhez e com a dieta normoproteica na lactação. Metade dos animais foi eutanasiada aos 21 dias de idade, enquanto a outra metade foi alimentada com a dieta padrão do biotério até os 90 dias de vida. Nos animais aos 21 dias, houve redução dos pesos corporal e testicular nos três grupos tratados em relação ao GC, enquanto o GDPós apresentou o maior índice gonadossomático. O diâmetro tubular reduziu nos GDPós e GDPré, enquanto o GD possuiu os menores comprimento tubular e população de células de Sertoli. Os GDPós e GD apresentaram os menores volumes tubulares, enquanto que o volume intersticial não diferiu entre os grupos. Os GDPós e GD tenderam a apresentar um maior número de cordões seminíferos, enquanto o GD apresentou um maior número de células germinativas em morte celular no interior dos cordões. Aos 90 dias de idade, o GD possuía a menor média de peso corporal e o maior IGS. O peso testicular reduziu tanto no GD quanto no GDPós. O diâmetro tubular diminuiu no GD, a altura do epitélio seminífero diminuiu no GDPós e o diâmetro do lúmen aumentou no GD. O comprimento dos túbulos seminíferos, o volume tubular, a população de células de Sertoli, o número de espermátides arredondadas e a produção espermática diária foram menores no GD. O volume das células de Leydig reduziu nos GDPré e no GD, sua população foi menor nos GDPós e GD e a concentração de testosterona diminuiu no GDPré. Através dos resultados, pode-se concluir que a restrição proteica alterou vários parâmetros testiculares na fase imatura e na fase adulta, mesmo após o reestabelecimento alimentar, sendo mais prejudicial naqueles animais em que a dieta hipoproteica foi aplicada nos períodos de vida intrauterina e pós-natal.

Palavras-chave: restrição proteica, testículo, espermatogênese, desenvolvimento testicular

Abstract

This study aimed to investigate the effect of low protein diet during intrauterine period and postnatal life on the rat testes. Female rats were mated, and after pregnancy confirmation, divided into four groups and fed during pregnancy and lactation: Control Group (CG), fed a normal protein diet; Undernourished Group (UG), fed a low protein diet; Postnatal Undernourished Group (PostUG), fed with normal diet during pregnancy and with the low protein diet during lactation; Prenatal Undernourished Group (PreUG), fed low protein diet during pregnancy and normal protein diet during lactation. For half of the animals, euthanasia occurred at 21 days old, while half were fed with standard diet until 90 days old. In 21 days old animals, body and testicular weight reduced in all treated groups compared to CG, while gonadosomatic index was higher in PostUG. Tubular diameter reduced in PostUG and PreUG, while UG had smaller tubular length and Sertoli cells population. PostUG and UG showed lower tubular volumes, while the interstitial volume did not differ between groups. PostUG and UG trended to show a greater number of seminiferous cords, while the UUG showed a greater number of germ cells in death inside the cords. At 90 days old, UG had lower mean body weight and higher GSI. Testicular weight decreased in both UG and PostUG. Tubular diameter decreased in UG, height of the seminiferous epithelium decreased in PostUG and diameter of tubular lumen increased in UG. Total length of seminiferous tubule, tubular volume, Sertoli cells population, round spermatid number, and daily sperm production decreased in UG. Leydig cells volume reduced in PreUG and UG, population per testis decreased in PostUG and UG, whereas serum testosterone decreased in PreUG. It can be concluded that protein restriction has modified several testicular parameters in immature and adult rats, even after the reestablishment feed, more detrimental in those animals that low protein diet was applied in intrauterine and postnatal life.

Keywords: protein restriction, testis, spermatogenesis, testicular development

Lista de figuras

- Figura 1.** Peso do nascimento de ratos Wistar submetidos a restrição proteica durante a prenhez. *Diferença estatística significativa ($p = 0,028$).....38
- Figura 2.** Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....39
- Figura 3.** Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....40
- Figura 4.** Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no Índice Gonadossomático de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....41
- Figura 5.** Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar dos 30 aos 80 dias de idade.....43
- Figura 6.** Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....44
- Figura 7.** Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....45
- Figura 8.** Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no Índice Gonadossomático de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....46
- Figura 9.** Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos Wistar adultos (90 dias). Cabeças de seta indicam o compartimento tubular e asteriscos indicam o compartimento intertubular, ambos sem sinais de degeneração nos quatro grupos experimentais. A – Grupo Controle, B – Grupo Desnutrido Pós-natal, C – Grupo

Desnutrido-Pré-natal, D – Grupo Desnutrido. As figuras mostram aumento de 100x.....	47
Figura 10. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....	49
Figura 11. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....	50
Figura 12. Frequência relativa da luminação dos túbulos seminíferos do testículo de ratos Wistar machos aos 21 dias de idade após restrição proteica durante a prenhez e a lactação. L indica os túbulos luminados e NL os não luminados.....	52
Figura 13. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células germinativas em morte celular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....	53
Figura 14. Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos Wistar imaturos (21 dias) pertencentes aos GC (A e B), GDPós (C e D), GDPré (E e F) e GD (G e H). As setas vermelhas indicam células germinativas em processo de morte celular no interior dos cordões seminíferos. A, C, E e G mostram um aumento de 400x, enquanto as B, D, F e H representam aumento de 1000x.....	54
Figura 15. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....	55
Figura 16. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....	56
Figura 17. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....	57

Figura 18. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células de Leydig por grama de testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	58
Figura 19. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume nuclear das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	59
Figura 20. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume citoplasmático das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	60
Figura 21. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	61
Figura 22. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na concentração de testosterona sérica (ng/mL) de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	62
Figura 23. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).....	63
Figura 24. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática por grama de testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	64

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação (MAGALHÃES, 2010).....	33
Tabela 2. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso de nascimento de ratos Wistar.....	38
Tabela 3. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso de nascimento de ratos Wistar.....	39
Tabela 4. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 21 dias de idade.....	40
Tabela 5. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no índice gonadossomático de ratos Wistar aos 21 dias de idade.....	41
Tabela 6. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 40 dias de idade.....	41
Tabela 7. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 40 dias de idade.....	42
Tabela 8. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 50, 60 e 70 dias de idade.....	42
Tabela 9. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 80 dias de idade.....	43
Tabela 10. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	44
Tabela 11. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	45
Tabela 12. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no índice gonadossomático de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	46

Tabela 13. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no diâmetro tubular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade.....	48
Tabela 14. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no diâmetro tubular (μm), na altura do epitélio (μm) e no diâmetro do lúmen (μm) do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	48
Tabela 15. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade.....	49
Tabela 16. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular (m) do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	51
Tabela 17. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume dos compartimentos testiculares de ratos Wistar aos 21 dias de idade.....	52
Tabela 18. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume (ml) dos compartimentos testiculares de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	52
Tabela 19. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli ($\times 10^6$) do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade.....	56
Tabela 20. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli ($\times 10^6$) do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	57
Tabela 21. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	58
Tabela 22. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Leydig por grama de testículo do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	59
Tabela 23. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume nuclear das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	60

Tabela 24. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume citoplasmático das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	61
Tabela 25. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	62
Tabela 26. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na concentração de testosterona sérica de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	63
Tabela 27. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células germinativas por secção transversal dos túbulos seminíferos em estágio VII de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	64
Tabela 28. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	65
Tabela 29. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática por grama de testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.....	66

Sumário

Introdução.....	13
Revisão de literatura.....	16
Pesos corporal e testicular.....	16
Estabelecimento da puberdade.....	17
Túbulos seminíferos.....	18
Número de células de Sertoli.....	19
Produção espermática.....	20
Fertilidade.....	21
Produção de gonadotrofinas e testosterona.....	23
Referências.....	27
Objetivos.....	31
Objetivo geral.....	31
Objetivos específicos.....	31
Material e métodos.....	32
Animais, grupos de estudo e eutanásia.....	32
Processamento histológico do testículo.....	34
Histomorfometria testicular dos animais aos 21 dias.....	34
Análise do parênquima testicular dos animais aos 21 dias.....	35
Histomorfometria testicular dos animais adultos.....	35
Células germinativas e produção espermática diária.....	37
Dosagem de testosterona.....	37

Análise estatística.....	37
Resultados.....	38
Peso corporal, peso testicular e IGS.....	38
Histomorfometria testicular.....	46
Volume dos compartimentos testiculares.....	50
Frequência relativa (%) dos túbulos seminíferos em luminação e de células germinativas em morte celular.....	51
População de células de Sertoli, células de Leydig e concentração de testosterona.....	55
Células germinativas e produção espermática.....	62
Discussão.....	66
Conclusão.....	72
Anexos.....	73
Anexo 1.Autorização do CEUA (Comitê de ética de Uso Animal) da UFPE.....	73
Referências.....	74

1. Introdução

Uma das funções fundamentais da vida consiste na garantia do sucesso de uma gestação. Durante esse período, entre os objetivos principais têm-se a saúde de ambos a mãe e o feto e a proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas durante a vida adulta (LUCYK; FURUMOTO, 2008).

Todas as células do adulto se desenvolvem a partir de células percursoras e, assim, pequenos defeitos introduzidos nos estágios iniciais de desenvolvimento são prováveis de serem propagados através das linhagens subsequentes e afetar tecidos inteiros (REES, 2002). Dessa forma, o período de desenvolvimento intrauterino é tido como o mais vulnerável do ciclo de vida (LUCYK; FURUMOTO, 2008).

Nos últimos anos, aumentou o número de evidências que suportam a ideia de que distúrbios que aconteçam durante períodos críticos do desenvolvimento fetal possam provocar alterações permanentes ou de longo prazo na fisiologia e na morfologia de um órgão. Tais evidências estão relacionadas com o conceito de “programação fetal” ou “origem fetal” (TOLEDO et al., 2011).

A hipótese da “programação fetal” ou “origem fetal” sugere que um estímulo ou insulto durante períodos críticos do crescimento ou desenvolvimento resulte em adaptações que permanentemente alterem a estrutura, a fisiologia e o metabolismo, acarretando no surgimento de doenças durante a vida adulta. Tais estímulos podem ser a dieta, a exposição ambiental a agentes tóxicos, o estado endócrino e o stress (GODFREY; BARKER, 2001; ROSEBOOM et al., 2001; LUCYK; FURUMOTO, 2008; TOLEDO et al., 2011; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012;).

Tal programação ocorre devido à plasticidade dos organismos, incluindo os seres humanos, durante os períodos iniciais de vida. Assim, embora o crescimento do feto seja controlado pelos seus genes, ele é limitado pelo ambiente (nutrientes e oxigênio recebido através da mãe) em que está se desenvolvendo (GODFREY; BARKER, 2001; WU et al., 2004). Dessa forma, o ambiente intrauterino pode ser de maior importância na etiologia das doenças crônicas do que a genética do indivíduo (WU et al., 2004).

Fêmeas gestantes consistem em um grupo com diversas particularidades na composição da sua dieta (LUCYK; FURUMOTO, 2008). Os processos fisiológico que ocorrem durante o período de gestação necessitam de uma grande contribuição de nutrientes (TOLEDO et al., 2011). Além dos nutrientes, a demanda energética também aumenta devido ao maior gasto com a elevação da massa corporal. O cumprimento do consumo diário necessário de tais componentes da dieta irá garantir um desenvolvimento saudável de ambos a mãe e o feto (LUCYK; FURUMOTO, 2008).

A contribuição proteica é essencial para a manutenção e o sucesso da gravidez (TOLEDO et al., 2011). Uma restrição proteica durante tal período, sozinha ou aliada à restrição energética, conduz a uma diminuição do crescimento fetal em várias espécies, com a redução do peso ao nascer sendo uma marca de tal deficiência (TOLEDO et al., 2011). De acordo com Desai et al. (1997), a redução na nutrição materna não afeta somente o crescimento do corpo da prole, mas também afeta a sua composição. Mesmo que haja uma recuperação do estado nutricional após a restrição alimentar, associada com a recuperação do peso pós-natal dos órgãos, essa não está necessariamente relacionada com a sua morfofuncionalidade (DESAI et al., 1997; PAPOTI et al., 2003; TOLEDO et al., 2011).

Diante de uma restrição alimentar, o feto responde de maneira a desenvolver uma fisiologia que maximiza a captação e a conservação de nutrientes. Essas alterações conferem uma vantagem à sobrevivência se a nutrição continuar a ser restrita durante a vida. Contudo, havendo um abundante suplemento nutricional, a prole possuidora do fenótipo poupador pode acumular recursos sob a forma de gordura e predispor, assim, à obesidade e outros problemas metabólicos (ZAMBRANO et al., 2005).

Os efeitos do ambiente e da nutrição recente ou atual no desempenho reprodutivo de várias espécies têm sido reconhecidos há bastante tempo. Contudo, os estudos dos efeitos da nutrição no início da vida e do período pós-natal em programar a reprodução do adulto só começaram a ser realizados nas últimas décadas (RHIND et al., 2001; RHIND, 2004; TOLEDO et al., 2011).

Os períodos neonatal e pré-púbere são cruciais para a espermatogênese e a futura capacidade reprodutiva do macho. Durante tais etapas, as linhagens das

células testiculares se diferenciam, proliferam e amadurecem (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012). Assim, uma restrição alimentar durante tais períodos pode inibir tanto o início quanto a manutenção da capacidade reprodutiva, além da atividade esteroidogênica (TEIXEIRA et al., 2007).

A nutrição materna pode influenciar o sistema reprodutor do feto durante vários estágios do desenvolvimento, envolvendo diferentes sistemas fisiológicos (RHIND et al., 2001; RHIND, 2004). Se a restrição alimentar ocorrer em um período em que um órgão, tipo celular ou receptor tenha se desenvolvido, estes não podem ser afetados diretamente, mas através de alterações em seus percussores (RHIND et al., 2001). Dessa forma, os efeitos no sistema reprodutor podem ser exercidos antes que os órgãos neuroendócrinos (como o hipotálamo e a pituitária) e os órgãos reprodutores tenham se diferenciado, durante o processo de diferenciação e desenvolvimento e entre o nascimento e a puberdade, o que indica o provável envolvimento de uma gama de mecanismos (RHIND, 2004).

2. Revisão de literatura

Diante da grande susceptibilidade do sistema reprodutor em sofrer uma programação fetal resultante da restrição alimentar nas etapas iniciais de vida, esta revisão irá exibir os principais parâmetros testiculares afetados pela redução da ingestão proteica durante a prenhez e a lactação nos estudos presentes na literatura.

2.1. Pesos corporal e testicular

O peso corporal no nascimento pode ser considerado como indicador de uma deficiente nutrição fetal e de alterações no desenvolvimento do organismo. (ZAMBRANO et al., 2005; GUZMÁN et al., 2006; TOLEDO et al., 2011). As restrições proteicas durante as fases de prenhez e/ou de lactação são amplamente descritas na literatura por provocarem reduções no peso do corpo (MENENDEZ-PATTERSON et al., 1985; ENGELBREGT et al., 2000; PASSOS et al., 2000; MOURA et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2008; ALMEIDA, 2009; TOLEDO et al., 2011). Tal decréscimo pode ser explicado pela mudança no fornecimento de nutrientes maternos para a circulação (MELO; CURY, 1988; TOLEDO et al., 2011). Contudo, a avaliação baseada apenas em tal parâmetro pode subestimar a ausência de alteração, visto que adaptações que permitam a continuidade do crescimento fetal podem apresentar consequências adversas para a saúde quando adulto (ROSEBOOM et al., 2001).

Aliado às reduções no peso corpóreo, também ocorrem diminuições no peso testicular (MENENDEZ-PATTERSON et al., 1985; MOTA et al., 2001; RAMOS et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; TOLEDO et al., 2011; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). O peso normal testicular varia levemente dentro de uma determinada espécie. Assim sendo, o peso absoluto dos testículos é um parâmetro útil na avaliação dos riscos ao sistema reprodutor masculino, com sua redução indicando mal funcionamento gonadal, mesmo que não seja identificada a sua origem (TOLEDO et al., 2011).

Zambrano et al. (2005) e Rodríguez-González et al. (2012) não observaram diferença no peso de nascimento dos filhotes de mães submetidas à restrição proteica durante a prenhez. Contudo, a continuação do tratamento ao longo do

período de lactação causou a redução do peso corporal de tais animais. Além disso, a ausência de alteração do peso não indica semelhança com relação à composição e funcionalidade do organismo e pode mascarar alterações significantes em órgãos e sistemas essenciais.

Com relação ao peso testicular, Mota et al. (2001) acreditam que sua diminuição está relacionada com a redução de proteínas totais. O peso do testicular relativo, por ser o resultado da divisão do peso testicular pelo peso corporal, pode não apresentar redução devido à diminuição proporcional de ambos os pesos (TEIXEIRA et al., 2007; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). No estudo por Zambrano et al. (2005), apenas os animais que sofreram restrição proteica durante a lactação apresentaram diminuição significativa no peso testicular relativo.

2.2. Estabelecimento da puberdade

A puberdade em mamíferos é um período de rápidas interações endócrinas e alterações morfológicas (STOKER et al., 2000). Seu início está relacionado com o aumento da secreção de gonadotrofinas, que influenciam o crescimento e a maturação testicular, que por sua vez secreta testosterona (LONDONKAR et al., 2000). Juntas, a testosterona e as gonadotrofinas fornecem o estímulo para a iniciação da espermatogênese (OJEDA; URBANSKI, 1994; LONDONKAR et al., 2000).

A deiscência testicular e a separação do prepúcio da glândula peniana são marcas do desenvolvimento sexual no rato (STOKER et al., 2000; ZAMBRANO et al., 2005). A separação prepucial ocorre entre os 40 e 50 dias de idade, com média de 43 dias, o que varia de acordo com a espécie ou linhagem do rato (STOKER et al., 2000; TOLEDO et al., 2011). Entre a idade de 75 dias, onde ocorre a máxima produção espermática, e aos 100 dias, onde a máxima concentração de espermatozoides é estocada na cauda do epidídimo, o animal supostamente atinge a maturidade sexual (ROBB et al., 1978; TOLEDO et al., 2011).

O estado nutricional do indivíduo e seu peso corporal apresentam efeitos na reprodução e na puberdade (STOKER et al., 2000; HARDING et al. 2010). As alterações metabólicas associadas com a perda de peso ou a diminuição do crescimento são inibitórias para o sistema reprodutor de maneira que podem estar

relacionadas com a produção de substâncias capazes de alterar a liberação do GnRH, como a insulina, ácidos graxos essenciais ou aminoácidos necessários para a síntese de precursores de neurotransmissores (STOKER et al., 2000). A restrição proteica intrauterina causa reduções no peso ao nascer, o que compromete o estabelecimento da puberdade tanto em macho quanto em fêmeas (STOKER et al., 2000; TOLEDO et al., 2011).

No estudo realizado por Zambrano et al. (2005) foi percebido um atraso na deiscência testicular nos grupos formados por animais submetidos à restrição proteica durante a vida intrauterina e/ou pós-natal. Tais indivíduos também mostraram redução nos níveis de testosterona aos 21 dias de idade, o que pode estar relacionado com tal atraso do desenvolvimento sexual. Neste estudo, a separação prepucial apresentou uma tendência à redução, o que poderia ter sido comprovado através do aumento do número de animais.

2.3. Túbulos seminíferos

As restrições proteicas aplicadas durante os períodos iniciais da vida colocam em risco a formação dos túbulos seminíferos e o desenvolvimento do seu epitélio, correspondente à evolução do processo espermatogênico. Toledo et al. (2011), em seu experimento com mães hipoproteicas durante a gestação, observaram redução no número de espermátides maduras, na produção espermática diária e no número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo. Contudo, não foram observadas alterações na maturação do epitélio seminífero em nenhuma das idades investigadas (30 dias, 60 dias e 90 dias).

Ramos et al. (2006) observaram redução nos túbulos seminíferos com relação à área total, área luminal, área epitelial e altura do epitélio na prole de fêmeas submetidas à restrição proteica durante a lactação. Chiarini-Garcia et al. (2011) também obtiveram uma expressiva redução no diâmetro tubular de seus animais cujas mães foram alimentadas com dieta hipoproteica durante prenhez e lactação, acompanhada pela diminuição no número de células germinativas. Já naquelas fêmeas que sofreram restrição apenas durante uma das fases (gestação ou lactação), o diâmetro tubular da prole foi apenas parcialmente afetado, assim como o seu processo espermatogênico. O decréscimo no número de células germinativas

se iniciou com a diminuição número de espermatogônias, o que refletiu na redução no número de espermatócitos e espermátides.

Rodríguez-González et al. (2012) analisaram a histologia testicular de ratos sujeitos a restrição proteica durante a vida intrauterina e/ou lactação em diferentes idades (14, 21 e 36 dias) e constataram que aos 14 dias de vida, os animais provenientes dos grupos restritos durante a gestação possuíam o diâmetro tubular menor. Nessa mesma idade, foi vista uma menor quantidade células germinativas por túbulo nos animais tratados em apenas uma das duas fases e a permanência dos gonócitos em todos os grupos desnutridos. Aos 21 dias foi observada uma alteração na organização e maturação do epitélio seminífero dos animais restritos, como a ausência de contato entre as espermatogônias e a membrana basal. Aos 36 dias, foi observado um atraso nas fases acrossômicas iniciais da espermiogênese nos grupos desnutridos, juntamente com a maior presença de células germinativas imaturas.

Tais estudos demonstram que modificações maternas na ingestão proteica durante gestação e lactação levam a mudanças estruturais das gônadas masculinas, responsáveis por alterações futuras no funcionamento desse órgão (RAMOS et al., 2006). Essas variações aumentam se a exposição continuar até a fase adulta, atuando em diferentes parâmetros da espermatogênese, como a diminuição do número de células em progressão na espermatogênese e o atraso da diferenciação espermática (CHIARINI-GARCIA et al., 2011; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

2.4. Número de células de Sertoli

As células de Sertoli aparecem cedo na vida fetal e proliferam durante dois períodos: intrauterino ou neonatal e pré-púbere. Embora na maioria das espécies a proliferação ocorra em ambos os períodos, em algumas, um pode ser mais importante do que outro. Em outras espécies, como os ratos, o período neonatal se sobrepõe ao pré-púbere, prejudicando a diferenciação dessas duas fases de proliferação, que se estendem até 2 a 3 semanas após o nascimento. Por outro lado, em humanos esses períodos são separados por uma década ou mais, e em macacos por meses. A partir da puberdade, tais células tornam-se maduras e não se dividem mais, constituindo uma população estável dentro do túbulo seminífero.

(SHARPE et al., 2003; FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005; GENOVESE et al., 2010; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

Uma das principais funções das células de Sertoli é a de gerar um ambiente adequado para a proliferação e a maturação das células germinativas (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). Alterações em seu número, estrutura e/ou função podem lesar o epitélio seminífero e colocar em risco todo o processo espermatogênico (TOLEDO et al., 2011). Tais células também estão diretamente correlacionadas com o máximo tamanho testicular e produção espermática diária (GENOVESE et al., 2010; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). Dessa maneira, o fornecimento deficiente de nutrientes a partir do período fetal até a puberdade pode resultar na programação fetal das células de Sertoli, comprometendo o futuro desempenho do órgão reprodutor (GENOVESE et al., 2010; TOLEDO et al., 2011).

Toledo et al. (2011) e Rodríguez-González et al. (2012) observaram reduções no número de células de Sertoli como resultado da restrição proteica durante apenas um ou em ambos os períodos de gestação e lactação. No estudo feito por Chiarini-Garcia et al. (2011) foi percebida uma redução em mais da metade da capacidade das células de Sertoli em suportarem as células germinativas.

2.5. Produção espermática

Como mencionado anteriormente, as células de Sertoli estão correlacionadas com o tamanho testicular no adulto e a máxima taxa de produção espermática (GENOVESE et al., 2010; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). Alterações em seu número, estrutura e função podem afetar o desenvolvimento das células germinativas e comprometer a espermatogênese (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012). Isso se deve pelo fato de que as células de Sertoli possuem capacidade de suporte para as células germinativas relativamente fixa por espécie (HESS; FRANÇA, 2008).

A nutrição fetal, principalmente durante a diferenciação das gônadas, pode atuar como um determinante para a máxima capacidade testicular em produzir espermatozoides (GENOVESE et al., 2010). Como o número de células germinativas está diretamente relacionado com o número de células de Sertoli funcionais, o tamanho potencial alcançado pelo testículo e a taxa espermática já

estão estabelecidos durante o período proliferativo de tais células (HESS; FRANÇA, 2008). Uma programação no número de células de Sertoli adultas causada pela restrição alimentar durante o início da vida é acompanhada pela redução da produção espermática diária (GENOVESE et al., 2010).

Zambrano et al. (2005) perceberam que a produção espermática era reduzida quando os animais eram sujeitos à restrição proteica durante o período intrauterino, mesmo havendo uma reposição alimentar após o nascimento. A diminuição da ingestão proteica durante apenas o período de lactação não influenciou tal parâmetro. Utilizando tratamento semelhante, Rodríguez-González et al. (2012) observaram uma redução no número de células germinativas nos animais imaturos, o que aliado ao reduzido número de células de Sertoli, irá resultar na diminuição na produção de espermatozoides na fase adulta. Redução da produção espermática acompanhando um baixo número de células de Sertoli também foi observada por Toledo et al. (2011), o que neste estudo ocorreu associado à diminuição no níveis de testosterona sérica.

2.6. Fertilidade

A fertilidade masculina pode ser avaliada com base na quantidade de espermatozoides produzida, na sua motilidade e morfologia (GUZICK et al., 2001), sendo o número de espermatozoides e a motilidade os seus principais anunciadores (VENKATESH et al., 2009). A infertilidade é definida como a incapacidade de fertilizar o gameta feminino e também pode estar ligada a problemas imunes e endócrinos, como a falha dos testículos em responder a estímulos hormonais que desencadeiam a produção espermática (BALLA et al., 2003).

Na fertilização, um único espermatozoide fecunda o gameta feminino, contudo, quanto maior é o número de espermatozoides ativos presente no ejaculado, maior será a probabilidade de que um deles alcance o local de fertilização e a realize (FARRIS, 1951). A produção espermática pode ser afetada por vários fatores, incluindo a desnutrição materna. Os períodos iniciais de vida (intrauterino, neonatal e pré-púbere) são cruciais para a espermatogênese e a futura capacidade reprodutiva, e assim, mudanças no fornecimento de nutrientes durante esses períodos podem atuar na diferenciação, proliferação e maturação celular, alterando a fertilidade do indivíduo (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012).

Zambrano et al. (2005) avaliaram a fertilidade de ratos machos, cujas mães receberam dieta hipoproteica durante a prenhez e/ou lactação, através do acasalamento em duas diferentes idades (70- 90 e 270 dias de vida). Os resultados foram obtidos através do percentual de fêmeas por grupo que se tornou prenhe e mostraram redução da fertilidade na idade de 270 dias naqueles animais submetidos à restrição proteica apenas durante a vida intrauterina. A ausência de redução da fertilidade nos animais em que a restrição se estendeu da vida intrauterina até o desmame demonstra a habilidade de tais indivíduos de procriarem mesmo diante de tal escassez de nutrientes. Já a infertilidade observada neste estudo mostra uma má adaptação das respostas originadas durante a vida fetal à nutrição plena fornecida pós-natal.

No experimento realizado por Rodríguez-González et al. (2012), os atrasos na maturação das células de Sertoli, na diferenciação das células germinativas e alterações na organização tubular ocorreram devido à restrição proteica materna durante as etapas cruciais para o estabelecimento da espermatogênese e para a fertilidade. O grupo de animais restrito durante apenas o período intrauterino apresentou as maiores alterações morfológicas e funcionais, o que pode levar à redução da produção espermática e da fertilidade na vida adulta.

A espermatogênese é um evento complexo que envolve várias etapas até a formação do espermatozoide maduro. Alterações em qualquer etapa pode resultar no surgimento de espermatozoides morfolologicamente alterados, o que estará associado à falha na fertilização, diminuição da clivagem embrionária e aumento da probabilidade de aborto (VENKATESH et al., 2009). A morfologia espermática alterada sugere a atuação de eventos citotóxicos ou genotóxicos (VENKATESH et al., 2009; TOLEDO et al., 2011; WU et al., 2002). Toledo et al. (2011) observou um aumento no percentual de espermatozoides com morfologia anormal (principalmente relacionadas à cabeça) em ratos cujas mães sofreram restrição proteica durante a prenhez. Tais resultados refletiram a mutagenicidade das células germinativas e os efeitos deletérios da restrição proteica intrauterina para o processo espermatogênico.

2.7. Produção de gonadotrofinas e testosterona

A função gonadal é regulada pelas gonadotrofinas produzidas pela hipófise (LH e FSH), as quais são mediadas por peptídeos hipotalâmicos, pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), esteroides e peptídeos gonadais. O GnRH é secretado no hipotálamo anterior e levado à pituitária anterior, onde estimula a síntese e a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH). Estes são hormônios glicoproteicos formados por uma subunidade em comum (subunidade α) e uma hormônio-específica (subunidade β). O LH atua nas células de Leydig de maneira a aumentar os níveis de cAMP, estimulando a síntese e a secreção da testosterona, enquanto que o FSH atua na gametogênese (HIKIM et al., 2005). A concentração testicular da testosterona é um fator determinante para a espermatogênese e a produção de espermatozoides (TEIXEIRA et al., 2007).

Além da atuação nos processos reprodutores e na secreção de hormônios esteroides, as gonadotrofinas regulam o crescimento e a maturação da gônada durante a puberdade, apesar de não parecerem necessários para o desenvolvimento gonadal intrauterino inicial e a diferenciação sexual. A testosterona sintetizada pelas células de Leydig no interior do testículo fetal é o fator primário endócrino e/ou parácrino envolvido na regulação do desenvolvimento testicular, iniciação da espermatogênese e formação dos caracteres sexuais secundários (TEIXEIRA et al., 2007).

A ingestão de nutrientes é de grande importância para a produção e a secreção de vários hormônios, dentre eles os participantes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. A concentração das gonadotrofinas na circulação é alterada de acordo com o nível alimentar, sendo a sua secreção diminuída diante de uma restrição. Diminuições nas gonadotrofinas circulantes acarretam também na redução da concentração da testosterona (CLARKE; HENRY, 1999; MARTIN et al., 2004; ZAMBRANO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2007; TOLEDO et al., 2011;). Estudos já demonstraram que a desnutrição leva a alterações morfológicas típicas daquelas encontradas em células cuja atividade secretória foi suprimida (HERBERT, 1980; TEIXEIRA et al., 2007).

As restrições alimentares materna afetam o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal da prole não apenas quando o insulto é restrito ao período gestacional, mas também quando ele ocorre apenas durante o período de lactação (HARDING et al. 2010). Na literatura é possível observar reduções nas concentrações de LH (ZAMBRANO et al., 2005; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012) e de testosterona (ZAMBRANO et al., 2005; TOLEDO et al., 2011; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012) resultantes de restrições proteicas durante a gestação e a lactação. Tais alterações evidenciam diminuições na atividade do eixo hipofisário-gonadal. Nestes estudos, juntamente com tais modificações hormonais, foram observados atrasos na deiscência testicular (ZAMBRANO et al., 2005), no desenvolvimento sexual (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012), reduções na produção espermática diária (TOLEDO et al., 2011; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012) e na capacidade reprodutiva (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012).

Contrariamente, em um estudo realizado por Teixeira et al. (2007), utilizando mães com restrição proteica durante o período de lactação, foi observado um aumento na concentração sérica e testicular de testosterona na prole, sugerindo normais produção e secreção deste hormônio. Tal resultado foi divergente provavelmente devido às diferenças na experimentação utilizada, podendo ter sido proveniente de um mecanismo adaptativo das células de Leydig ou consequência da secreção anormal de testosterona.

Os hormônios esteroides são sintetizados através da atividade de enzimas desidrogenases e citocromos P450, as quais catalisam reações de hidroxilação e dihidroxilação-oxidação. Os citocromos P450 dos eucariotos são enzimas ligadas à membrana, expressos na membrana interna mitocondrial ou nas membranas do retículo endoplasmático dos tecidos produtores de esteroides. Uma etapa em comum e limitante para a síntese de todos os hormônios esteroides é a clivagem da cadeia lateral do colesterol (C27) para formar pregnenolona (C21), catalisada pela enzima de clivagem de cadeia lateral (citocromo P450_{scc}) (HIKIM et al., 2005).

Reduções nos níveis do mRNA para a enzima P450_{scc} foram encontradas em animais submetidos à restrição proteica materna durante os períodos de lactação em um estudo realizado por Zambrano et al. (2005). Tais dados

demonstram alterações ao nível bioquímico da função testicular resultante de tal tratamento.

O receptor de andrógeno (AR) pertence à superfamília de receptores de esteroides e, como tal, está principalmente localizado no núcleo celular, e atua como fator de transcrição dependente de ligante (TEIXEIRA et al., 2007). Estudos mostraram que os andrógenos podem autorregular a expressão do mRNA do seu próprio receptor (CARDONE et al., 1998; MOTA et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2007), sendo essa expressão aumentada ou diminuída dependendo do tipo de tecido ou célula (MOTA et al., 2001; ZHOU et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2007). A concentração celular do AR correlaciona-se relativamente bem com a extensão da resposta ao andrógeno, sugerindo que a auto-regulação do AR pode influenciar a sensibilidade hormonal (DAÍ et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2007).

No trato reprodutor masculino, os testículos e o epidídimo são os principais alvos da ação androgênica, sendo o andrógeno essencial para a manutenção da espermatogênese e a função secretória das células epiteliais do epidídimo (ZHOU et al., 2002). Os receptores de andrógenos são encontrados, no interior do testículo adulto, nas células de Leydig, nas células peritubularesmióides e nas células de Sertoli (ZHU et al., 2000; ZHOU et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2007). De acordo com o experimento realizado por Teixeira et al. (2007), a restrição proteica durante o período de lactação não alterou a localização dos receptores de andrógeno no interior do testículo.

Mota et al. (2001), em experimento com restrição proteica durante o período de lactação, observou um aumento na quantidade de receptor de andrógeno no testículo. Teixeira et al. (2007) observaram aumentos na concentração do mRNA e na expressão proteica do AR em animais submetidos à restrição proteica durante a lactação. Neste último estudo, a maior expressão do AR ocorreu de maneira concomitante com o aumento nos níveis de testosterona. Dessa forma, os autores concluíram que independente da alteração na síntese e na secreção de tal hormônio, o AR é modificado de maneira semelhante à testosterona sérica, mesmo diante da maior afinidade da di-hidrotestosterona por este receptor.

Os estudos acima citados demonstram que a nutrição inadequada em níveis proteicos durante o início da vida pode resultar na diminuição da concentração de

hormônios que atuam de maneira a maturar as gônadas masculinas e garantir a esteroidogênese e a expressão dos receptores esteroides. Tais alterações podem levar ao desenvolvimento anormal do testículo e ao atraso do início da espermatogênese (TEIXEIRA et al., 2007).

Referências

- ALMEIDA, F. R. C. L. Influência da nutrição da fêmea sobre a qualidade do leite ao nascer. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 31-33, 2009.
- ALVES, A. P.; DÂMASO, A. R.; DAL PAI, V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. 264-271, 2008.
- BALLA, N.; SHENOY, S. K.; BELLYAPPA, G.; ANURADHA; KUMAR, V.V. The Role of Herbal Drugs in Infertile Couples. **Obstetrics & Gynecology Today**, v. VIII, n.5, p. 281-287, 2003.
- CARDONE, A.; ANGELINI, F.; VARRIALE, B. Autoregulation of estrogen and androgen receptor mRNAs and down regulation of androgen receptor mRNA by estrogen in primary cultures of lizard testis cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 110, p. 227–236, 1998.
- CHIARINI GARCIA, H., MELO, M. C., ALMEIDA, F. R. C. L. Effects of pre and postnatal protein under nutrition over spermatogenesis in adult rats. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 5, n. 1, p. 5-6, 2011.
- CLARKE, I. J.; HENRY, B. A. Leptin and reproduction. **Reviews of reproduction**, v. 4, n. 1, p. 48-55, 1999.
- DAI, J. L.; MAIORINO, C.A.; GKONOS, P. J.; BURNSTEIN, K. L. Androgenic up-regulation of androgen receptor cDNA expression in androgenindependent prostate cancer cells. **Steroids**, v. 61, p. 531–539, 1996.
- DESAI, M.; HALES, C. N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, p. 329-348, 1997.
- ENGELBREGT, M. J. T.; HOUDIJK, M. E. C. A. M.; POPP-SNIJDERS, C.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. **Pediatric Research**, v. 48, p. 803-807, 2000.
- FARRIS, E. J. Male Fertility. **British Medical Journal**, v. 22, p. 1475-1479, 1951.
- FRANÇA, L. R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H. F.; OLLARES-BUZATO, C. B. (Ed.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005, p. 302-323.
- GENOVESE, P.; NÚÑEZ, M. E.; POMBO, C.; BIELLI, A. Undernutrition during foetal and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the adult rat. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 233–236, 2010.
- GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. P. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutrition**, v. 4, n. 2B, p. 611-624, 2001.
- GUZICK, D. S.; OVERSTREET, J. W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C. K.; NAKAJIMA, S. T.; COUTIFARIS, C.; CARSON, S. A.; CISNEROS, P.;

STEINKAMPF, M. P.; HILL, J. A.; XU, D.; VOGEL, A. D. L. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 19, 2001.

GUZMÁN, C.; CABRERA, R.; CÁRDENAS, M.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W.; ZAMBRANO, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **Journal of Physiology**, v. 572, n. 1, p. 97–108, 2006.

HARDING, J. E.; DERRAIK, J. G. B.; BLOOMFIELD, F. H. Maternal undernutrition and endocrine development. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 5, n. 2, p. 297–312, 2010.

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

HESS, R. A.; FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. (Org.). **Molecular mechanisms in spermatogenesis**. Austin: Landes Bioscience/Springer Science, 2008, p. 1-15.

HIKIM, A. S.; SWERDLOFF, R. S.; WANG, C. The Testis. In: MELMED, S.; CONN, P. M. (Eds.). **Endocrinology. Basic and Clinical Principles**. Totowa (NJ): Humana Press Inc, 2005, p. 405-418;

LONDONKAR, R. L.; SONAR, A.; PATIL, S.; PATIL, S. B. Nicotine delays puberty in male rat. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 4, p. 291 - 297, 2000.

LUCYK, J. M.; FURUMOTO, R. V. Necessidades nutricionais e consumo alimentar na gestação: uma revisão. **Ciências da Saúde**, v. 29, n. 4, p. 353-363, 2008.

MARTIN, G. B.; MILTON, J. T. B.; DAVIDSON, R. H.; BANCHERO HUNZICKER, G. E.; LINDSAY, D. R.; BLACHE, D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 231–246, 2004.

MELO, M. A. R.; CURY, L. Maternal adaptations for fetal growth in young malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 1053-1056, 1998.

MENENDEZ-PATTERSON, A.; MENENDEZ, E.; FERNANDEZ, S.; FERNANDEZ, M.; MARÍN, B. Influence of Undernutrition during Gestation and Suckling on Development and Sexual Maturity in the Rat. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 1025-1032, 1985.

MOTA, E. C., SANTOS, A. M., TOSTE, F. P., SAMPAIO, F. J. B., RAMOS, C. F. Effects of Malnutrition in the Testis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 27, p. 500-506, 2001.

MOURA, A. S., FRANCO DE SÁ, C. C.; CRUZ, H. G., COSTA, C. L. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptina. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 617-622, 2002.

OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in rat. In: Knobil, E.; Neil, J. E. (Eds). **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p. 363 - 409.

PAPOTI, M.; ALMEIDA, P. B.; PRADA, F. J. A.; ELENO, T. G.; HERMINI, H. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição proteica. **Motriz**, v. 9, n. 2, p. 103-110, 2003.

PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F. MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v. 20, n. 11, p. 1603-1612, 2000.

RAMOS, C. da F.; da SILVA, A. M.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. **Urologia Internationalis**, v. 76, n. 1, p. 63-66, 2006.

REES, W. D. Manipulating the sulfur amino acid content of the early diet and its implications for longterm health. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 1, p. 71-77, 2002.

RHIND, S. M.; RAE, M. T.; BROOKS, A. N. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. **Reproduction**, v. 122, p. 205–214, 2001.

RHIND, S. M. Effects of maternal nutrition on fetal and neonatal reproductive development and function. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p.169–181, 2004.

ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, n. 1, p. 103-107, 1978.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M.; MILLÁN, S.; MORAN, N.; TREJO, R.; NATHANIELSZ, P. W.; LARREA, F.; ZAMBRANO, E. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 3, iss.5, p. 1-6, 2012.

ROSEBOOM, T. J.; VAN DER MEULEN, J. H. P.; RAVELLI, A. C. J.; OSMOND, C.; BARKER, D. J. P.; BLEKER, O. P. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 185, p. 93-98, 2001.

SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, n. 6, p. 769-784, 2003.

STOKER, T. E.; LAWS, S. C.; GUIDICI, D. L.; COOPER, R. L. The Effects of Atrazine Metabolites on Puberty and Thyroid Function in the Male Wistar Rat. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 50-59, 2000.

TEIXEIRA, C. V.; SILANDRE, D. SANTOS, A. M. S.; DELALANDE, C.; F. J. B.; CARREAU, S.; RAMOS, C. F. Effects of maternal undernutrition during lactation on

aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. **Journal of Endocrinology**, v.192, p. 301–311, 2007.

TOLEDO, F. C.; PEROBELLI, J. E.; PEDROSA, F. P. C.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KEMPINAS, W. D. G. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 94-102, 2011.

VENKATESH, S.; SINGH, G.; GUPTA, N. P.; KUMAR, R.; DEECARAMAN, M.; DADA, R. Correlation of sperm morphology and oxidative stress in infertile men. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 7, n. 1, p. 29-34, 2009.

WU, A.; WAN, F.; SUN, X.; LIU, Y. *Effects of dietary restriction on growth, neurobehavior, and reproduction in developing Kunmin mice.* **Toxicological Sciences**, v. 70, p. 238-244, 2002.

WU, G.; BAZER, F. W.; CUDD, T. A.; MEININGER, C. J.; SPENCER, T. E. Maternal Nutrition and Fetal Development. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 9, p. 2169-2172, 2004.

ZAMBRANO, E.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; GUZMÁN, C.; GARCÍA-BECERRA, R.; BOECK, L.; DÍAZ, L.; MENJIVAR, M.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **The Journal of Physiology**, v. 563, pt. 1, p. 275-284, 2005.

ZHOU, Q.; NIE, R.; PRINS, G. S.; SAUNDERS, P. T. K.; KATZENELLENBOGEN, B.S.; HESS, R.A. Localization of Androgen and Estrogen Receptors in Adult Male Mouse Reproductive Tract. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, 2002.

ZHU, L. J.; HARDY, M. P.; INIGO, I. V.; HUHTANIEMI, I.; BARDIN, C. W.; MOO-YOUNG, A. J. Effects of Androgen on Androgen Receptor Expression in Rat Testicular and Epididymal Cells: A Quantitative Immunohistochemical Study. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 368-376, 2000.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da dieta hipoprotéica durante os períodos de vida intrauterina e pós-natal sobre o testículo de ratos Wistar imaturos e adultos, através da análise quantitativa e qualitativa do processo espermatogênico.

3.2. Objetivos específicos

- Medir os pesos corporais, testiculares e calcular os índices gonadossomáticos (IGS).
- Medir a altura do epitélio, diâmetro e área tubular, diâmetro do lúmen e comprimento total dos túbulos seminíferos.
- Calcular o volume dos compartimentos testiculares.
- Calcular a frequência relativa (%) dos túbulos seminíferos em luminação e de células germinativas em morte celular.
- Calcular a população de células de Sertoli.
- Calcular o volume celular, o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo.
- Mensurar o número de células germinativas por secção transversal, a produção espermática diária e produção espermática diária por grama de testículo.
- Dosar a concentração de testosterona sérica.

4. Material e métodos

4.1. Animais, grupos de estudo e eutanásia

As proles experimentais foram provenientes de fêmeas virgens ($n = 8$) de ratos da linhagem Wistar aos 120 dias de idade e com média de peso em torno de 280 g. Tais fêmeas foram mantidas em gaiolas de polipropileno com disponibilidade de água e ração padrão do biotério (Labina®, Purina), na proporção de duas fêmeas por gaiola, até o dia do acasalamento. Para tal, um macho foi introduzido em cada gaiola e deixado com as fêmeas durante a porção escura do ciclo. A prenhez foi confirmada pela detecção do espermatozoide no esfregaço vaginal e esse dia foi considerado como o dia 0 da gestação.

Uma vez confirmada a prenhez, as fêmeas foram divididas entre quatro grupos experimentais e continuaram a receber água e ração padrão do biotério até o 10º dia de gestação, quando se iniciou o tratamento com as dietas normoproteica e hipoproteica da seguinte maneira:

- **Grupo Controle (GC)** ($n = 4$), ratas alimentadas com dieta normoproteica (caseína 17%), seguindo recomendações do American Institute of Nutrition-AIN, durante a prenhez e a lactação.
- **Grupo Desnutrido (GD)** ($n = 4$), ratas alimentadas com dieta hipoproteica (caseína 8%) durante a prenhez e a lactação.
- **Grupo Desnutrido Pós-natal (GDPós)** ($n = 4$), ratas alimentadas com dieta normoproteica durante o período gestacional e alimentadas com a dieta hipoproteica a partir do nascimento dos filhotes até o desmame.
- **Grupo Desnutrido Pré-natal (GDPré)** ($n = 4$), ratas alimentadas com a dieta hipoproteica durante a gestação e alimentadas com a dieta normoproteica a partir do nascimento dos filhotes até o desmame.

A constituição de ambas as dietas utilizadas está expressa na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação (MAGALHÃES, 2010).

Constituintes	Dieta hipoproteica (8%)	Dieta normoproteica (17%)
g %	100	100
Proteínas	8,1	17,3
Carboidratos	75,1	65,9
Lipídios	7	7
Fibras	5	5
Vitaminas	1	1
Minerais	3,5	3,5
Metionina	0,3	0,3
% Kcal	362,48	363,44

Após o nascimento, os neonatos foram deixados com a mãe até completarem 21 dias de idade, quando ocorreu o desmame. Nesse dia, metade dos animais (oito machos) de cada grupo foi eutanasiada. Para tal, os animais foram pesados, heparinizados via intraperitoneal (150 U/ 100 g) e, após 15 minutos, anestesiadas via intramuscular com associações de quetamina (50 mg.kg⁻¹) e xilazina (5 mg.kg⁻¹) na mesma seringa (FANTONI; CORTOPASSI, 1994). A seguir, diante da falta de resposta à dor e ao reflexo corneano, os animais foram afixados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica. Os testículos foram coletados, pesados e fixados por imersão em glutaraldeído 4% (pH 7,2).

O restante dos animais (oito machos por grupo) foi removido para gaiolas de polipropileno, contendo no máximo três animais por gaiolas, e alimentados com a ração padrão do biotério. A cada 10 dias, os animais eram pesados para acompanhamento do peso corporal até atingirem os 90 dias de idade, quando ocorreu a eutanásia.

Durante todo experimento, os animais foram mantidos no biotério do Anexo do Departamento de Anatomia, CCB – UFPE, onde atuou um ciclo invertido de 12 h/12 h (luz das 18h às 6h), à temperatura controlada de 22 ± 2 °C.

Para a eutanásia, as proles experimentais foram pesadas e anestesiadas da mesma maneira explicada acima. A seguir, os animais foram afixados em decúbito

dorsal em mesa cirúrgica para o procedimento de perfusão. Foi feita uma incisão ventral para expor a cavidade torácica e, conseqüentemente, o coração. O sangue foi retirado através de punção cardíaca no ventrículo esquerdo e armazenado em tubos contendo heparina, centrifugado a 2500 rpm durante 15 minutos para separação do soro, sendo, então, armazenado sob temperatura de -20°C para posterior análise.

Os animais foram perfundidos com glutaraldeído 4% (pH 7,2) por aproximadamente 40 minutos. Neste período foi observado o enrijecimento dos testículos, o que indicou macroscopicamente a fixação testicular. Os testículos foram coletados, pesados e pós-fixados por imersão no mesmo fixador.

O índice gonadossomático ($IGS = [\text{peso testicular} / \text{peso corporal}] \times 100$) foi calculado a partir dos pesos corporal e testicular obtidos no dia da eutanásia. Este índice corresponde à uma relação percentual entre o peso testicular e o peso corporal (CALDEIRA et al., 2010).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (23076.050993/2012-24) (Anexo 1).

4.2. Processamento histológico do testículo

Os testículos fixados foram fragmentados, desidratados em série crescentes de álcool etílico e incluídos em resina, segundo técnica rotineira. Posteriormente, foram seccionados em micrótomo de maneira semi-seriada para obtenção de cortes histológicos com 4µm de espessura, os quais foram corados pela técnica de hematoxilina-floxina. Após coloração, os cortes foram montados e analisados em microscópio de campo claro, com aumentos de 100x a 1000x.

4.3. Histomorfometria testicular dos animais aos 21 dias

O diâmetro dos túbulos em formação foi calculado através da medição do perfil transversal de 15 túbulos diferentes, escolhidos aleatoriamente, sendo completamente circulares ou os mais circulares possíveis. As 15 secções foram obtidas utilizando-se um sistema de captura de imagem acoplado a um microscópio óptico Olympus BX-51

(Tóquio, Japão). Cada valor encontrados era o resultado da média duas medidas diametralmente opostas. A área tubular (AT) foi calculada utilizando-se a fórmula $AT = \pi R^2$, onde $R = \text{diâmetro} / 2$.

O número de células de Sertoli por secção transversal foi obtido através da análise de 10 túbulos por animal, onde eram contados os nucléolos visíveis de tais células.

4.4. Análise do parênquima testicular dos animais aos 21 dias

O parênquima testicular foi analisado considerando o início do aparecimento do lúmen nos túbulos seminíferos. Foram contados os túbulos sem nenhum sinal de formação luminal, ou seja, os cordões seminíferos, e aqueles em que o processo de luminação estava em desenvolvimento até formarem um total de 100 túbulos por animal.

Em 10 túbulos por animal, foram contadas o número de células germinativas que apresentavam características morfológicas de morte celular, como o aumento da acidofilia do citoplasma e localização no interior de vacúolos citoplasmáticos nas células de Sertoli.

4.5. Histomorfometria testicular dos animais adultos

O diâmetro tubular e a área tubular foram calculados de maneira semelhante à utilizada para os animais aos 21 dias de idade. Para os adultos, além disso, foram medidos a altura do epitélio seminífero e o diâmetro do lúmen. Estes foram obtidos também através de duas medidas diametralmente opostas dos mesmos túbulos utilizados para o cálculo do diâmetro tubular.

O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (CTTS), expresso em metros, foi calculado pela divisão do volume absoluto dos túbulos seminíferos (VATS) por R^2 ($R = \text{diâmetro} / 2$) e o valor de π : $CTTS = VATS / \pi R^2$.

Os volumes dos diferentes componentes do parênquima testicular foram calculados utilizando-se um retículo com 21 linhas e 21 colunas cruzando-se em 441

intersecções (pontos) associado a ocular em aumento de 400x. Para cada animal foram analisados 15 campos, escolhidos ao acaso, resultando em um total de 6615 pontos por animal.

A partir de 10 tubúlos redondos no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero, foram contados o número de espermatogônias, nucléolos de células de Sertoli, espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, espermatócitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas. Todos os resultados foram corrigidos para o diâmetro nuclear e a espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962), conforme segue:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

O diâmetro nucleolar médio (DM) representa a média dos diâmetros de 10 nucléolos de células de Sertoli para cada animal dos grupos experimentais. Imagens dos 10 nucléolos serão capturadas de modo semelhantes às capturas feitas para os túbulos seminíferos. A população será o resultado da multiplicação do número corrigido pelo comprimento total dos túbulos seminíferos (μm) e dividido pela espessura do corte.

O volume nuclear das células de Leydig foi obtido através da medição do diâmetro nuclear de 50 células por animal e da utilização da fórmula do volume da esfera, $4/3\pi R^3$. A proporção volumétrica núcleo/citoplasma de tais células foi obtida através da contagem de 1000 pontos sobre o citoplasma e núcleo, utilizando-se um retículo com 441 intersecções sob o aumento de 1000x. A partir dessa proporção foi calculado o volume citoplasmático e o volume celular:

Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig por testículo, obteve-se o número total destas células por testículo.

A divisão desse valor pelo peso líquido do testículo forneceu o número de células de Leydig por grama de testículo.

4.6. Células germinativas e produção espermática diária

A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi obtida de acordo com Rocha et al. (1999) e Silva Júnior et al. (2006): $PED = N^{\circ} \text{ Total de células de Sertoli por testículo} \times \text{a proporção de espermátides redondas no estágio VII} \times \text{estágio VII com freqüência relativa} / \text{duração do estágio (dias)}$.

4.7. Dosagem de testosterona

Foi utilizado o método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm, conforme descrito por BROWN et al. (2004).

4.8. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se a ANOVA e o teste de Kruskal Wallis, através do programa *SIGMASTAT for Windows* versão 2.0. Os mesmos foram representados através da média e do desvio padrão, sendo $p < 0,05$ considerado significativo.

5. Resultados

5.1. Peso corporal, peso testicular e IGS

Neste experimento, observou-se que os animais desnutridos a partir da alimentação com a dieta hipoproteica durante a vida intrauterina apresentaram uma redução de 6% no peso corporal ao nascer ($p = 0,028$) quando comparados aos animais alimentados com a dieta normoproteica (dieta controle) (Figura 1 e Tabela 2).

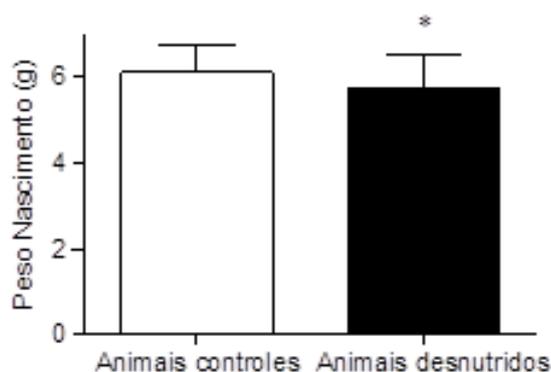


Figura 1. Peso do nascimento de ratos Wistar submetidos a restrição proteica durante a prenhez. *Diferença estatística significante ($p = 0,028$).

Tabela 2. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso de nascimento de ratos Wistar.

Peso de nascimento (g)		
Animais controles	Animais desnutridos	p
6,115 ± 0,639	5,746 ± 0,788 *	0,028

Os valores representam média ± desvio padrão. *Diferença estatística significante

Aos 21 dias de vida pós-natal, o GC apresentou os maiores pesos corporais, diferindo estatisticamente dos três grupos submetidos à restrição proteica (Figura 2). Quando comparado ao GC, a maior redução foi observada no GDPós (36%) ($p < 0,001$), seguido pelo GD (34,8%) ($p < 0,001$) e, por último, o GDPré (12,8%) ($p = 0,004$). Os grupos GDPós e GD não diferiram entre si ($p = 0,985$), mas apresentaram valores menores do que o GDPré ($p < 0,001$) (Tabela 3).

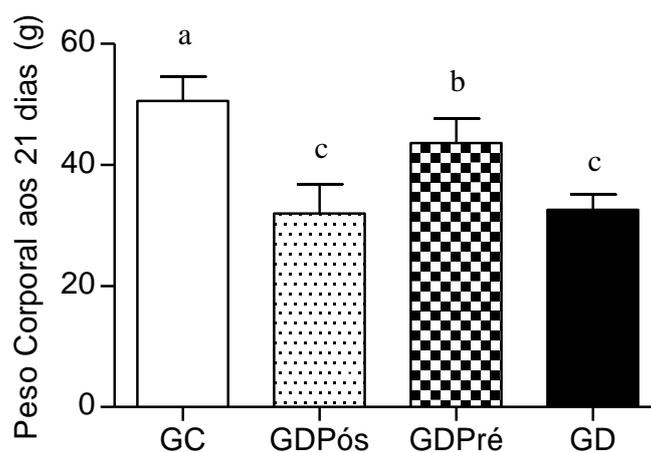


Figura 2. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 3. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso de nascimento de ratos Wistar.

Peso corporal (g) aos 21 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
50,574 ± 4,001 a	32,006 ± 4,787 c	43,625 ± 3,998 b	32,615 ± 2,501 c

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

O peso testicular no 21º dia de vida foi maior no GC, diferindo em 31,5 % do GD ($p < 0,001$), 26,42% do GDPós ($p < 0,001$) e 15,75% do GDPré ($p = 0,02$). O grupo GDPós não diferiu quando comparado aos GDPré ($p = 0,200$), e ao GD ($p = 0,701$) (Figura 3 e Tabela 4).

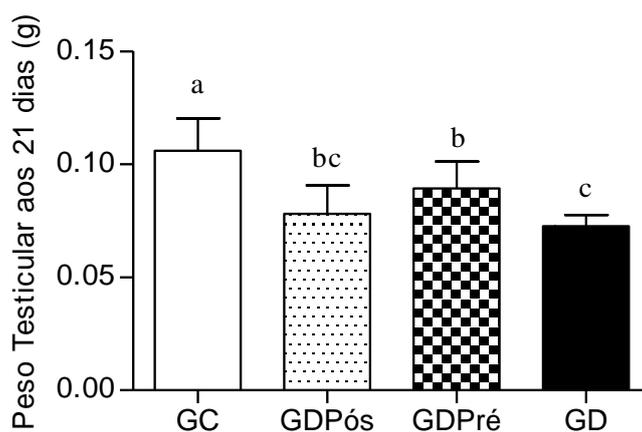


Figura 3. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 4. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 21 dias de idade.

Peso testicular (g) aos 21 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
0,106 ± 0,0143 a	0,0780 ± 0,0126 bc	0,0893 ± 0,0119 b	0,0726 ± 0,00499 c

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

O índice gonadossomático do grupo GDPós foi o maior entre os grupos, diferindo em 19,61% do GDPré ($p < 0,001$), 16,74 % do GC ($p = 0,001$), e 9,42% do GD ($p = 0,037$). Os GC, GDPré e GD não apresentaram diferença entre si (Figura 4 e Tabela 5).

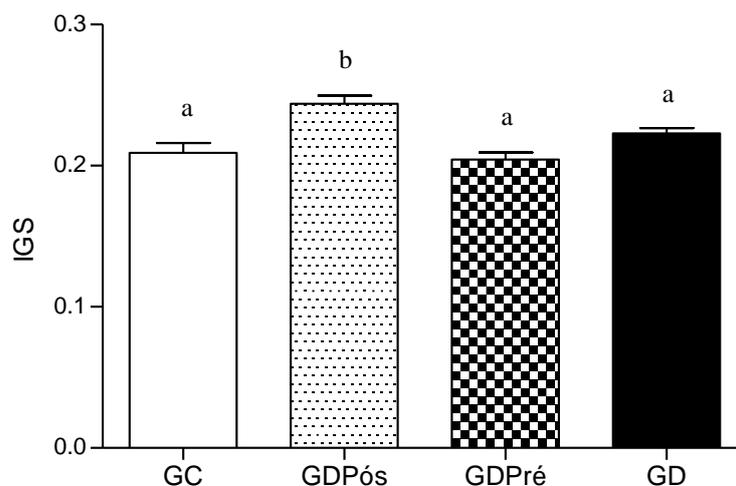


Figura 4. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no Índice Gonadossomático de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 5. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no índice gonadossomático de ratos Wistar aos 21 dias de idade.

Índice gonadossomático aos 21 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
0,209 ± 0,0197 a	0,244 ± 0,0156 b	0,204 ± 0,0145 a	0,223 ± 0,0134 a

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Aos 30 dias de idade, o peso corporal dos quatro grupos diferiu entre si, com o GDPré possuindo uma média 21,22% maior que o GC ($p < 0,001$), 35,99% maior que o GD ($p < 0,001$) e 50,72% maior que o GDPós ($p < 0,001$) (Tabela 6).

Tabela 6. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 40 dias de idade.

Peso corporal (g) aos 30 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
88,890 ± 4,594 a	71,151 ± 6,129 b	107,240 ± 5,807 c	78,860 ± 5,858 d

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

No 40º dia de idade, o GDPré continuou a apresentar o maior peso corporal, contudo, não mais diferindo do GC ($p = 0,217$). O GD passou a apresentar as menores médias de peso, diferindo estatisticamente dos GDPré e GC ($p < 0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 40 dias de idade.

Peso corporal (g) aos 40 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
164,0 ± 10,474 a	149,0 ± 8,944 ab	177,50 ± 20,021 a	130,50 ± 12,177 b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Durante os 50º, 60º e 70º dias o GD continuou a apresentar as menores médias de peso, não diferindo estatisticamente apenas do GDPós. Os GDPós, GDPré e GC não apresentaram diferença entre si (Tabela 8).

Tabela 8. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 50, 60 e 70 dias de idade.

Peso corporal (g)				
	GC	GDPós	GDPré	GD
50º dia	240,0 ± 12,236 a	215,250 ± 12,601 ab	236,0 ± 41,113 a	189,0 ± 17,501 b
60º dia	297,250 ± 22,701 a	274,50 ± 16,414 ab	296,250 ± 43,719 a	230,250 ± 24,388 b
70º dia	326,750 ± 26,789 a	305,125 ± 17,316 ab	333,750 ± 43,114 a	256,500 ± 29,467 b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

No 80º dia, o GD ainda apresentou a menor média de peso, passando a diferir de todos os demais grupos (Tabela 9). Os GDPós, GDPré e GC não apresentaram diferenças entre as suas médias (Figura 5).

Tabela 9. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 80 dias de idade.

Peso corporal (g) aos 80 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
358,500 ± 30,7383 a	325,250 ± 24,656 a	360,125 ± 44,125 a	277,0 ± 34,310 b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

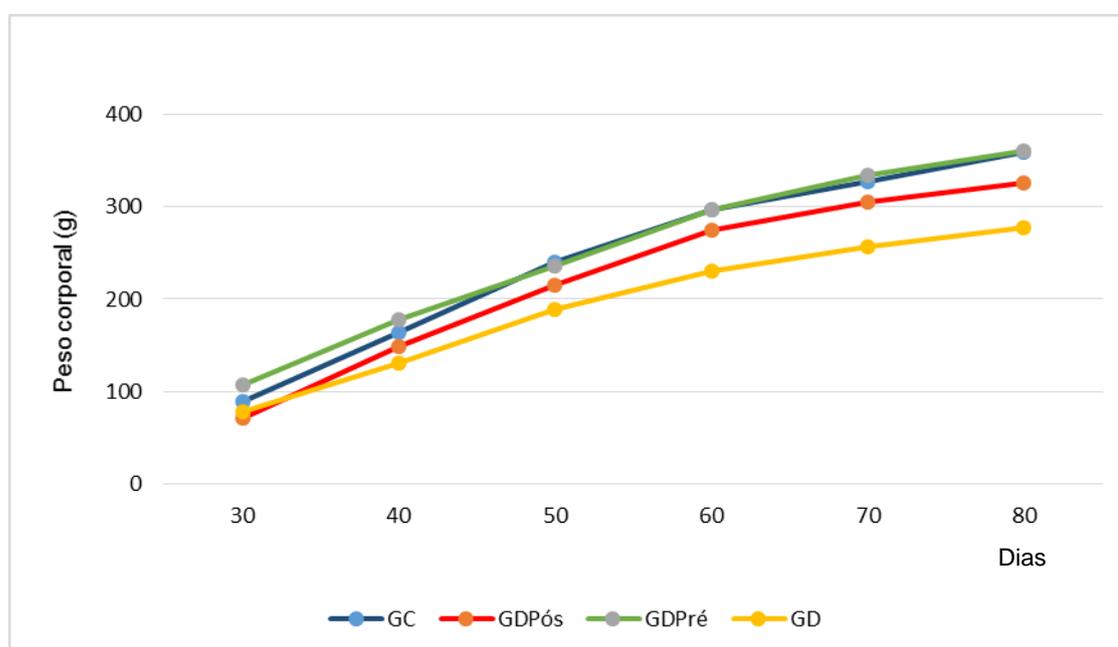


Figura 5. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar dos 30 aos 80 dias de idade.

Aos 90 dias de idade, o GDPré apresentou as maiores médias de peso, seguido pelo GC, o GDPós e o GD. Foi observada diferença estatística apenas quando comparou-se o GD com os demais grupos (Figura 6 e Tabela 10).

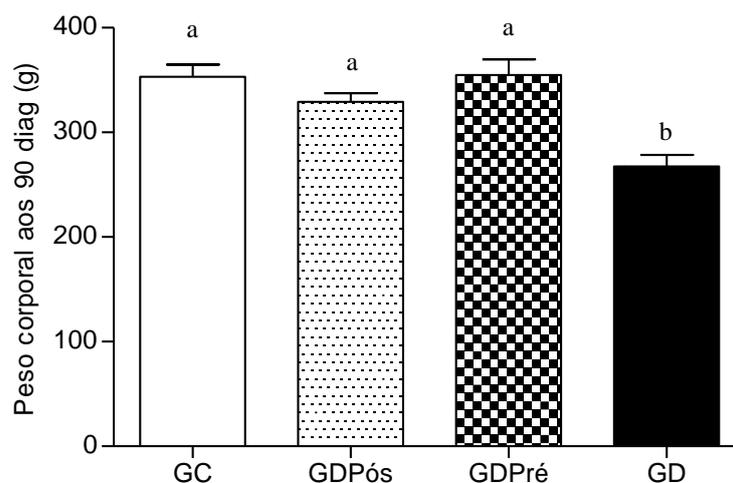


Figura 6. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 10. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso corporal de ratos Wistar aos 90 dias de idade

Peso corporal (g) aos 90 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
353,250 ± 32,897 a	329,000 ± 24,472 a	354,750 ± 42,412 a	267,429 ± 29,636 b

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

A maior média para o peso testicular aos 90 dias de idades foi obtida pelo GC, a qual não diferiu em relação à média do GDPré. Ambos os grupos apresentaram valores maiores quando comparados aos GDPós e GD (Figura 7 e Tabela 11).

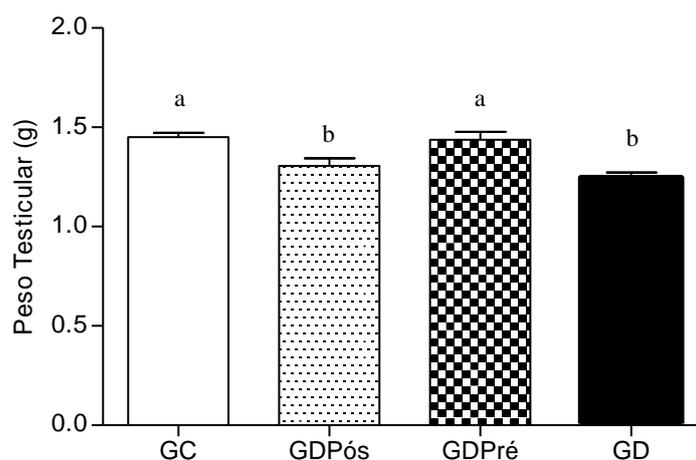


Figura 7. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 11. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no peso testicular de ratos Wistar aos 90 dias de idade

Peso testicular (g) aos 90 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
1,451 ± 0,0626 a	1,307 ± 0,106 b	1,437 ± 0,114 a	1,245 ± 0,0713 b

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

O IGS do GD foi o maior entre os grupos experimentais, diferindo em 15,5 % do GDPós ($p = 0,010$) e em 13,4 % do GDPré ($p = 0,029$). Contudo, não apresentou diferença quando comparado ao GCC, assim como os demais grupos (Figura 8 e Tabela 12).

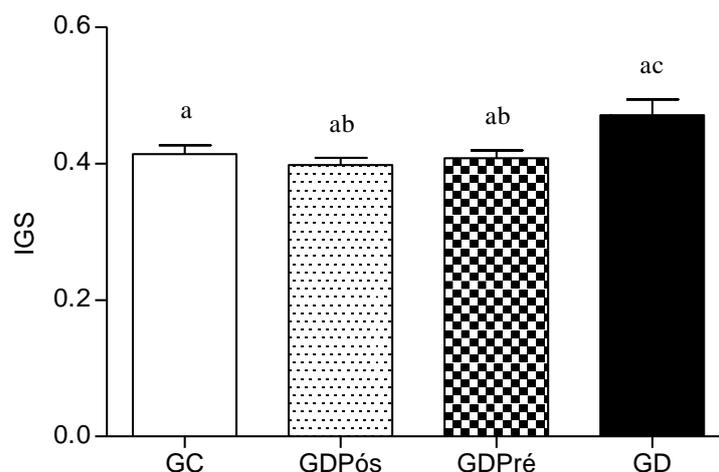


Figura 8. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no Índice Gonadossomático de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 12. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no índice gonadossomático de ratos Wistar aos 90 dias de idade

Índice gonadossomático aos 90 dias de idade			
GC	GDPós	GDPré	GD
0,414 ± 0,0375 a	0,398 ± 0,0286 ab	0,408 ± 0,0327 ab	0,471 ± 0,0606 ac

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.2. Histomorfometria testicular

Através de visualizações de cortes histológicos (Figura 9) foi observado que a baixa ingestão proteica não causou degeneração tanto no compartimento tubular quanto no intersticial em nenhum dos grupos experimentais.

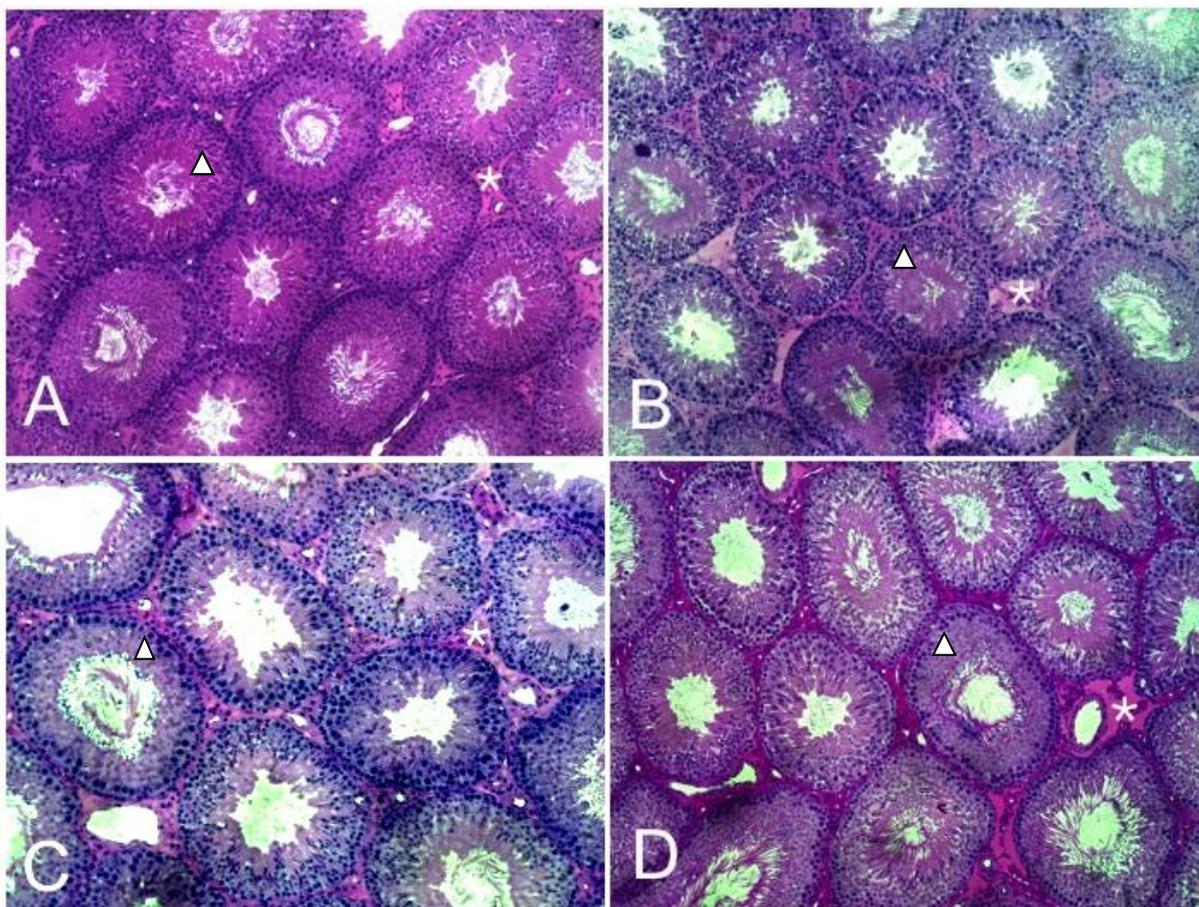


Figura 9. Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos Wistar adultos (90 dias). Cabeças de seta indicam o compartimento tubular e asteriscos indicam o compartimento intertubular, ambos sem sinais de degeneração nos quatro grupos experimentais. A – Grupo Controle, B – Grupo Desnutrido Pós-natal, C – Grupo Desnutrido-Pré-natal, D – Grupo Desnutrido. As figuras mostram aumento de 100x.

Os grupos Controle e Desnutrido apresentaram as maiores médias para o diâmetro tubular dos animais aos 21 dias de idade, as quais não diferiram entre si ($p = 0,891$). Tais médias foram maiores do que as obtidas para os GDPós e GDPré, os quais também não diferiram estatisticamente entre si ($p = 0,999$) (Tabela 13).

Tabela 13. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no diâmetro tubular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade.

Diâmetro dos túbulos seminíferos (μm)			
GC	GDPós	GDPré	GD
139,219 \pm 6,719 a	124,465 \pm 9,435 b	124,988 \pm 6,168 b	136,283 \pm 7,822 a

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Aos 90 dias de idade, o diâmetro tubular dos GC e GD continuaram a ser estatisticamente iguais ($p = 0,079$), mas o GD passou a apresentar os maiores valores. A média do diâmetro tubular de tal grupo diferiu com relação aos GDPós ($p = 0,029$) e GDPré ($p = 0,032$). Contudo, estes dois grupos não foram diferentes quando comparados ao GC ($p = 0,056$ e $p = 0,941$, respectivamente).

Com relação à altura do epitélio seminífero, o GC apresentou as maiores médias, diferindo dos demais grupos experimentais ($p < 0,001$). Após o GC, o GD mostrou os maiores valores, diferindo apenas com relação ao GDPós ($p = 0,027$). Os GDPré e GDPós não apresentaram diferença estatística entre si ($p = 0,207$), apesar de o último possuir menores valores. Para os valores de diâmetro do lúmen, o GD apresentou as maiores médias com relação aos demais. O GDPós e o GDPré apresentaram valores intermediários e não diferiram entre si ($p = 0,239$), enquanto o GC apresentou o menor valor e estatisticamente diferente dos demais (Tabela 14).

Tabela 14. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no diâmetro tubular (μm), na altura do epitélio (μm) e no diâmetro do lúmen (μm) do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Análise morfométrica dos túbulos seminíferos						
	Diâmetro tubular		Altura do epitélio		Diâmetro do lúmen	
GC	304,363 \pm 13,822	ab	84,058 \pm 5,569	a	139,315 \pm 12,048	a
GDPós	281,329 \pm 17,247	a	62,83 \pm 5,321	b	157,049 \pm 15,576	b
GDPré	299,498 \pm 23,293	a	68,231 \pm 7,193	bc	169,044 \pm 13,007	b
GD	325,979 \pm 12,194	b	70,877 \pm 1,981	c	187,435 \pm 7,837	c

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Aos 21 dias de idade, o Grupo Controle apresentou as maiores médias com relação ao comprimento tubular, contudo, não diferiu com relação aos GDPós e GDPré, apesar de o GDPré ter apresentado uma tendência à redução. O GD apresentou os menores valores, sendo significativamente menor do que o GC ($p = 0,010$), mas não diferindo dos GDPós ($p = 0,952$) e GDPré ($p = 0,998$) (Figura 10 e Tabela 15).

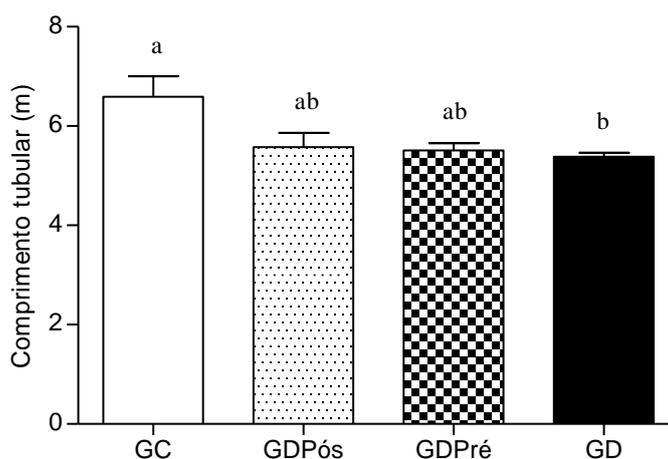


Figura 10. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 15. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade.

Comprimento tubular (m)			
GC	GDPós	GDPré	GD
6,588 ± 1,099 a	5,576 ± 0,702 ab	5,508 ± 0,414 ab	5,385 ± 0,225 b

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

O comprimento total dos túbulos seminíferos nos animais adultos pode ser observado na Figura 11. De acordo com os resultados, foi constatado que os valores

do GDPré foram os mais elevados, seguido pelo GDPós e pelo GC, não havendo diferença significativa entre os três grupos. O GD apresentou os menores valores, não diferindo apenas do GC ($p = 0,150$) (Figura 11 e Tabela 16).

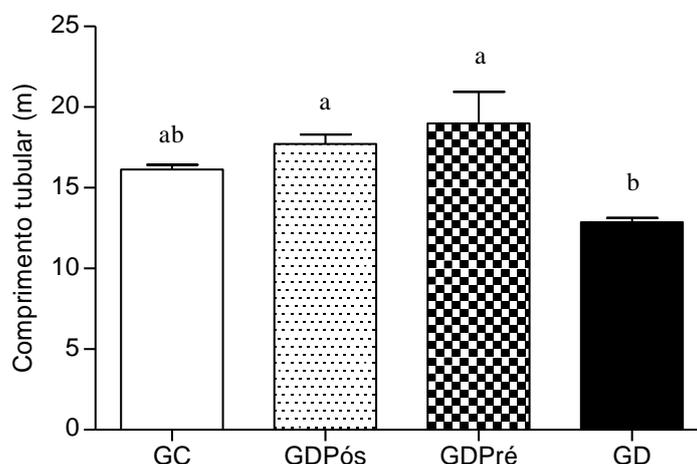


Figura 11. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 16. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no comprimento tubular (m) do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Comprimento tubular (m)			
GC	GDPós	GDPré	GD
16,143 ± 0,710 ab	17,710 ± 1,466 a	18,983 ± 4,799 a	12,855 ± 0,679 b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.3. Volume dos compartimentos testiculares

O volume do compartimento tubular nos animais aos 21 dias de idade foi maior no grupo Controle, diferindo dos demais grupos experimentais. Após o GC, as maiores médias pertenceram ao GDPré, o qual também diferiu dos GDPós e GD. Estes dois últimos grupos não apresentaram diferença estatística entre si ($p =$

0,986). O volume ocupado pelo interstício não diferiu entre os grupos ($p = 0,591$) (Tabela 17).

Tabela 17. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume dos compartimentos testiculares de ratos Wistar aos 21 dias de idade.

Volume dos compartimentos testiculares			
	Túbulo seminífero		Interstício
GC	0,098 ± 0,013	a	0,010 ± 0,002
GDPós	0,066 ± 0,008	b	0,0086 ± 0,003
GDPré	0,080 ± 0,010	c	0,0088 ± 0,002
GD	0,065 ± 0,004	b	0,009 ± 0,001

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Aos 90 dias, o volume tubular foi menor para o GD em comparação aos demais grupos. O GC, o GDPós e o GDPré não diferiram entre si. Não houve diferença entre os grupos experimentais com relação ao volume ocupado pelo compartimento intertubular ($p = 0,605$), apesar de haver uma tendência para redução nos GDPós e GD (Tabela 18).

Tabela 18. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume (ml) dos compartimentos testiculares de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Volume dos compartimentos testiculares			
	Túbulo seminífero		Interstício
GC	1,212 ± 0,0752	a	0,236 ± 0,0684
GDPós	1,137 ± 0,110	a	0,199 ± 0,379
GDPré	1,201 ± 0,135	a	0,222 ± 0,0741
GD	1,049 ± 0,0520	b	0,193 ± 0,0336

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.4. Frequência relativa (%) dos túbulos seminíferos em luminação e de células germinativas em morte celular

O processo de luminação dos túbulos seminíferos não apresentou diferença significativa entre os grupos quanto a sua frequência relativa, mas houve uma

tendência dos GC e GDPré em apresentar um maior percentual de túbulos em luminação, enquanto que os GDPós e GD tenderam a possuir um maior número de cordões seminíferos (Figura 12).

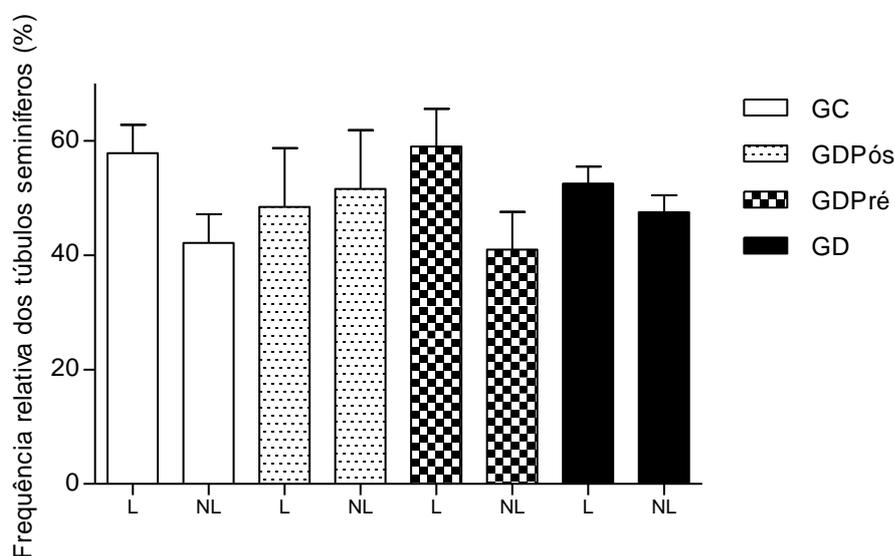


Figura 12. Frequência relativa da luminação dos túbulos seminíferos do testículo de ratos Wistar machos aos 21 dias de idade após restrição proteica durante a prenhez e a lactação. L indica os túbulos luminados e NL os não luminados.

Os cordões seminíferos dos animais pertencentes ao grupos GD possuíam um maior número de células germinativas em morte celular quando comparado aos GC e GDPós ($p = 0,037$ e $p = 0,017$, respectivamente). Ao contrário do GD, o GDPós e o GDPré não diferiram com relação ao GC ($p = 0,984$ e $p = 0,062$, respectivamente) (Figuras 13 e 14).

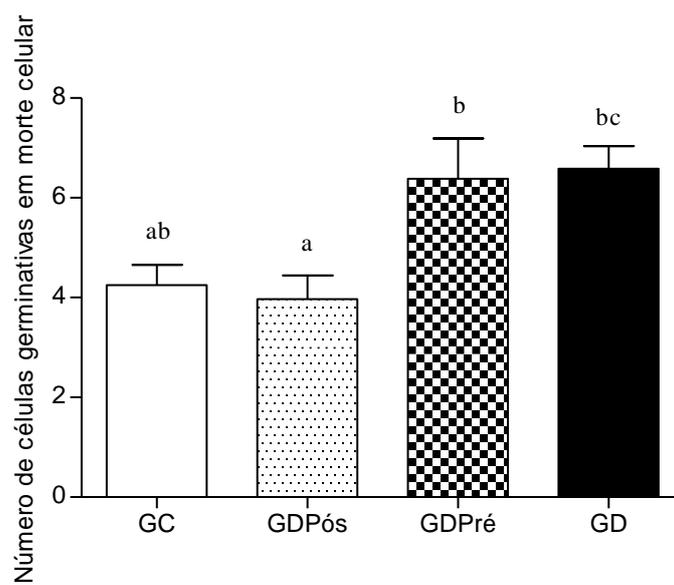


Figura 13. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células germinativas em morte celular do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

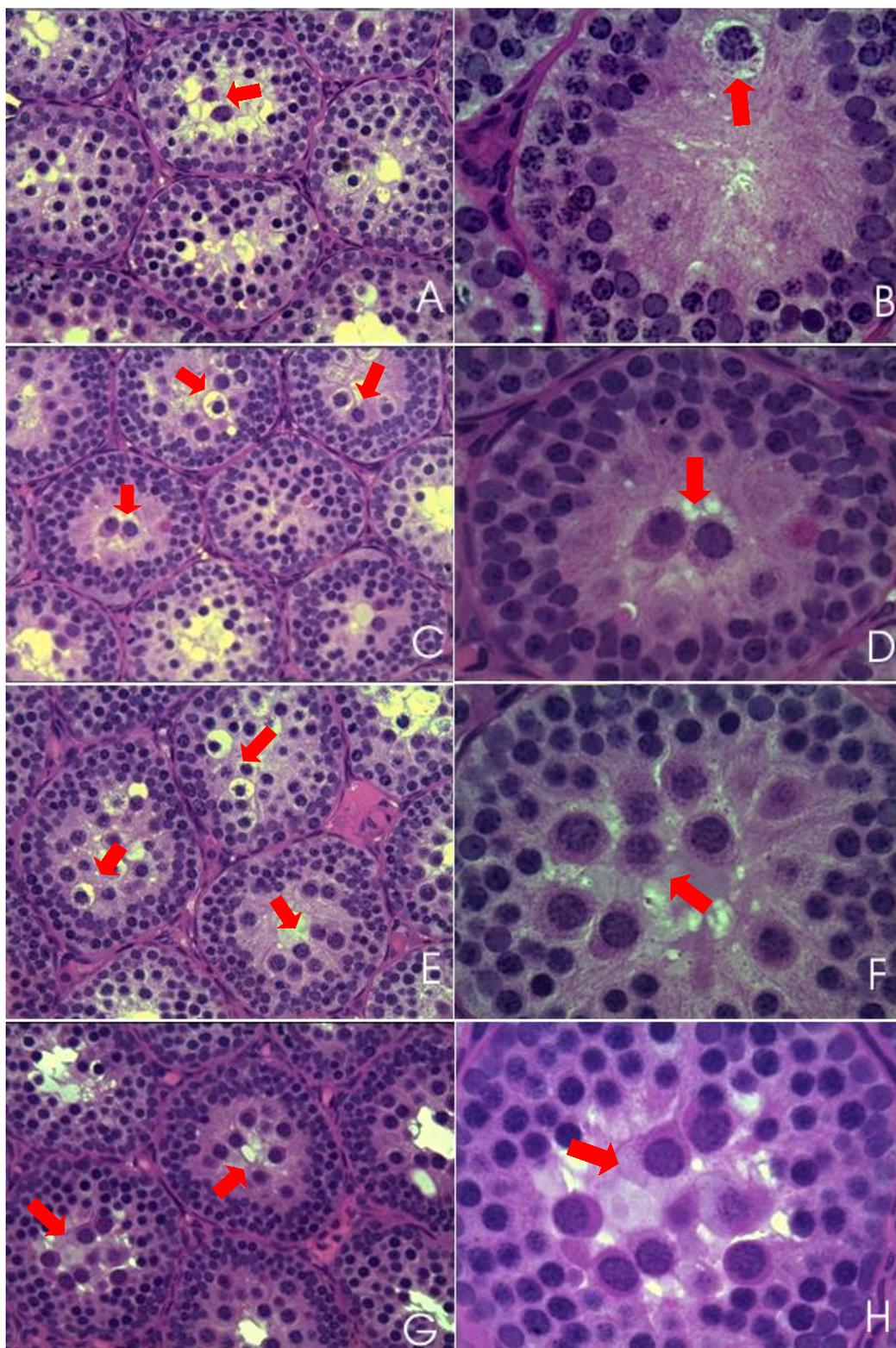


Figura 14. Fotomicrografias da secção transversal do testículo de ratos Wistar imaturos (21 dias) pertencentes aos GC (A e B), GDPós (C e D), GDPré (E e F) e GD (G e H). As setas vermelhas indicam células germinativas em processo de morte celular no interior dos cordões seminíferos. A, C, E e G mostram um aumento de 400x, enquanto as B, D, F e H representam aumento de 1000x.

5.5. População de células de Sertoli, células de Leydig e concentração de testosterona

O Grupo Controle apresentou as maiores médias com relação à população de células de Sertoli nos animais aos 21 dias de idade, contudo, não diferiu com relação aos GDPós ($p = 0,128$) e GDPré ($p = 0,066$). O GD apresentou os menores valores, sendo significativamente menor do que o GC ($p = 0,012$), mas não diferindo dos GDPós ($p = 0,777$) e GDPré ($p = 0,837$) (Figura 17 e Tabela 19).

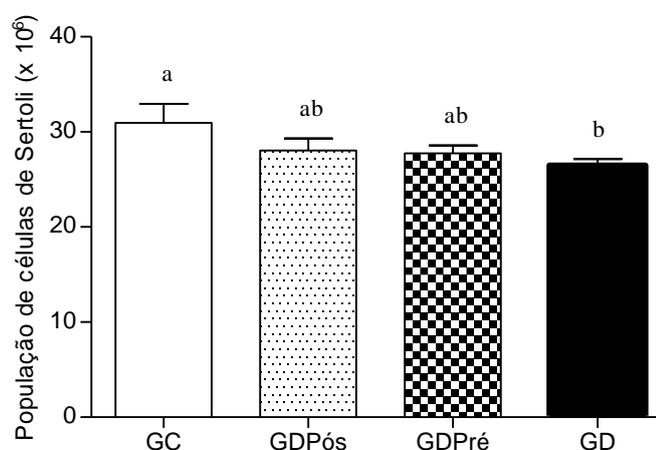


Figura 15. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 19. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli do testículo de ratos Wistar aos 21 dias de idade.

População de células de Sertoli (x 10 ⁶)			
GC	GDPós	GDPré	GD
32,10 ± 4,75 a	28,05 ± 3,11 ab	27,76 ± 2,37 ab	26,48 ± 1,85 b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Contudo, aos 90 dias de idade, a população de células de Sertoli do GD foi menor do que as populações de todos os demais grupos experimentais. Por outro lado, da mesma forma que aos 21 dias de idade, os GC, GDPós e GDPré não diferiram entre si (Figura 18 e Tabela 20).

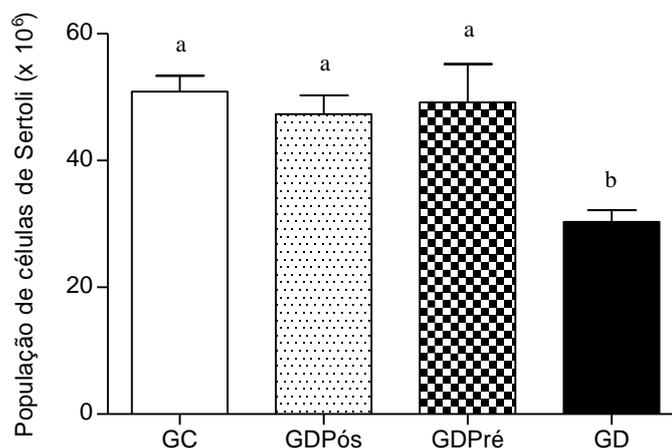


Figura 16. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 20. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Sertoli ($\times 10^6$) do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

População de células de Sertoli ($\times 10^6$)			
GC	GDPós	GDPré	GD
50,85 ± 6,20 a	47,340 ± 7,15 a	49,15 ± 14,91 a	30,32 ± 4,51 b

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

O maior número de célula de Leydig por testículo foi observada no GC, contudo, este não diferiu quando comparado ao GDPré. Por outro lado, a população de células de Leydig do GD e do GDPós reduziu quando comparada ao GC e ao GDPré (Figura 17 e Tabela 21).

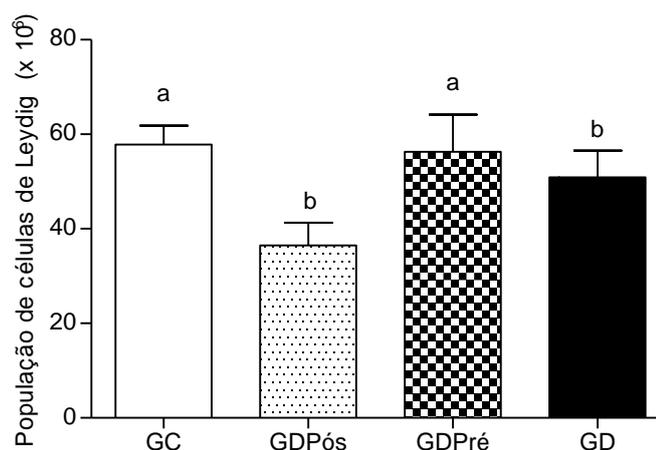


Figura 17. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 21. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

População de células de Leydig (x 10 ⁶)			
GC	GDPós	GDPré	GD
57,85 ± 9,83 a	36,52 ± 11,71 b	56,28 ± 19,34 a	50,89 ± 13,82 b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Não foi constatada diferença significativa entre os grupos com relação ao número de células de Leydig presente por grama de testículo. Contudo, o GDPós mostrou uma tendência de redução em relação aos demais grupos (Figura 18 e Tabela 22).

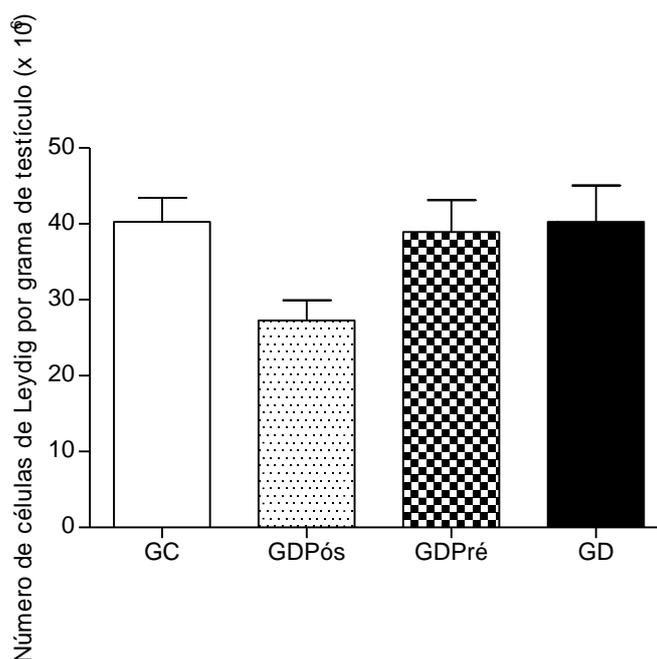


Figura 18. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células de Leydig por grama de testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Tabela 22. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na população de células de Leydig por grama de testículo do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

População de células de Leydig por grama de testículo (x 10 ⁶)			
GC	GDPós	GDPré	GD
40,28 ± 7,73	27,27 ± 6,51	38,93 ± 10,32	40,28 ± 11,72

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Os volumes nucleares das células de Leydig dos animais pertencentes aos GDPré e GD foram semelhantes entre si ($p = 0,973$) e menores quando comparados aos GDPós e GC (Figura 19). Estes dois últimos também apresentaram valores iguais entre si ($p = 1,00$) (Tabela 23).

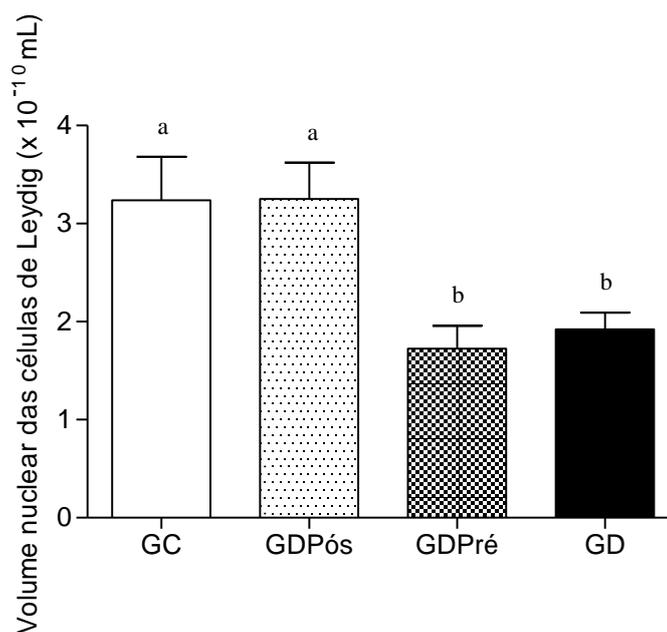


Figura 19. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume nuclear das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Tabela 23. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume nuclear das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Volume nuclear das células de Leydig (x 10 ⁻¹⁰ mL)			
GC	GDPós	GDPré	GD
3,24 ± 1,00 a	3,25 ± 0,82 a	1,72 ± 0,53 b	1,92 ± 0,38 b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Os valores correspondentes ao volume citoplasmático das células de Leydig do GDPós foram os maiores entre os grupos experimentais, diferindo do GDPré ($p = 0,013$) e do GD ($p = 0,032$), mas iguais aos do GC ($p = 0,475$). Os GC, GDPré e GD não diferiram entre si (Figura 20 e Tabela 24).

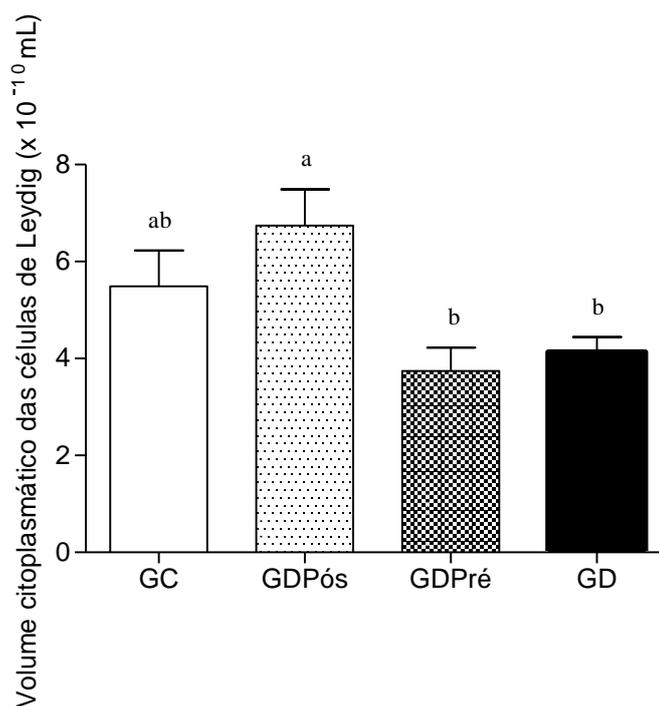


Figura 20. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume citoplasmático das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Tabela 24. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume citoplasmático das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Volume citoplasmático das células de Leydig (x 10 ⁻¹⁰ mL)							
GC		GDPós		GDPré		GD	
5,49 ± 1,65	ab	6,74 ± 1,67	a	3,75 ± 1,08	b	4,13 ± 0,71	b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Com relação ao volume total das células de Leydig, o GDPós mais uma vez apresentou os maiores valores entre os grupos experimentais, diferindo dos GDPré ($p = 0,014$) e GD ($p = 0,035$) e igual ao GC ($p = 0,765$). Os GC, GDPré e GD também não diferiram entre si (Figura 21 e Tabela 25).

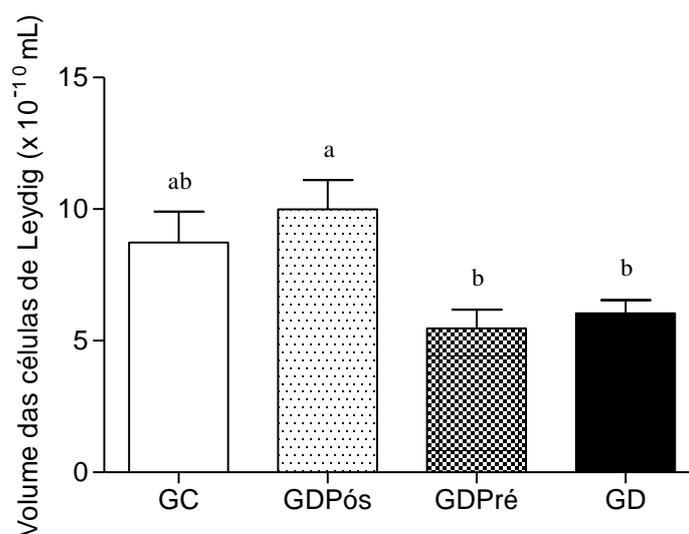


Figura 21. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Tabela 25. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no volume das células de Leydig do testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Volume das células de Leydig (x 10 ⁻¹⁰ mL)							
GC		GDPós		GDPré		GD	
8,73 ± 2,62	ab	9,99 ± 2,48	a	5,47 ± 1,59	b	6,05 ± 1,09	b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

O GC apresentou a maior concentração de testosterona sérica, enquanto os menores valores pertenceram ao GDPré, havendo diferença estatística entre tais grupos. Entre os GC, GDPós e GD não houve diferença significativa, apesar de o GD tender a apresentar menores valores. Diferença também não foi constatada entre os GDPós, GDPré e GD (Figura 22 e Tabela 26).

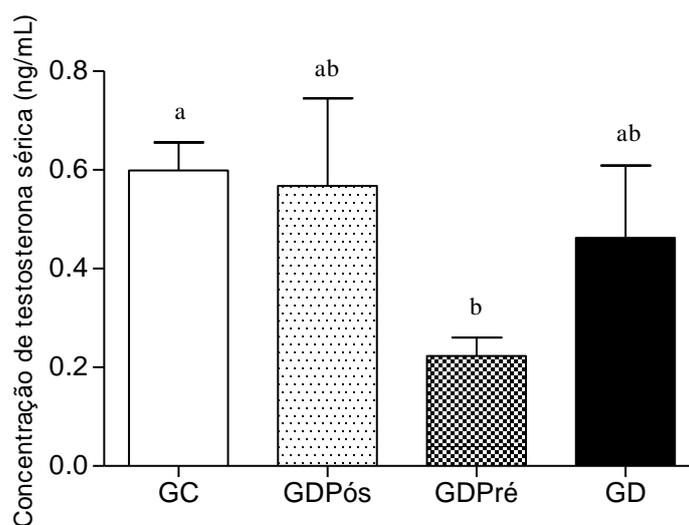


Figura 22. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na concentração de testosterona sérica (ng/mL) de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Tabela 26. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na concentração de testosterona sérica de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Concentração de testosterona sérica (ng/mL)			
GC	GDPós	GDPré	GD
0,599 ± 0,140 a	0,568 ± 0,396 ab	0,223 ± 0,084 b	0,462 ± 0,293 ab

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

5.6. Células germinativas e produção espermática

Com relação ao número de células germinativas por secção transversal dos túbulos seminíferos em estágio VII, os valores para espermatogônia ($p = 0,158$), espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno ($p = 0,875$) e espermatócito primário em paquíteno ($p = 0,064$) não apresentaram diferença estatística entre os quatro grupos experimentais. Já as espermátides arredondadas dos animais

pertencentes ao GD estiveram presentes em menor número quando comparada ao GC ($p = 0,029$) (Tabela 27).

Tabela 27. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação no número de células germinativas por secção transversal dos túbulos seminíferos em estágio VII de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Número de células germinativas por secção transversal					
	Espermatogônia	Pré-Leptóteno/Leptóteno	Paquíteno	Espermátide arredondada	
GC	1,077 ± 0,417	27,541 ± 2,773	28,091 ± 2,680	96,295 ± 8,627	a
GDPós	1,391 ± 0,362	26,175 ± 2,571	23,942 ± 1,556	87,528 ± 6,752	ab
GDPré	1,503 ± 0,324	27,081 ± 3,785	26,694 ± 3,466	87,700 ± 8,844	ab
GD	1,314 ± 0,223	26,695 ± 2,687	24,216 ± 3,722	81,608 ± 9,610	b

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

A produção espermática diária foi menor no GD quando comparada aos demais grupos. Os valores do GCC, GCD e GDC não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 23 e Tabela 28).

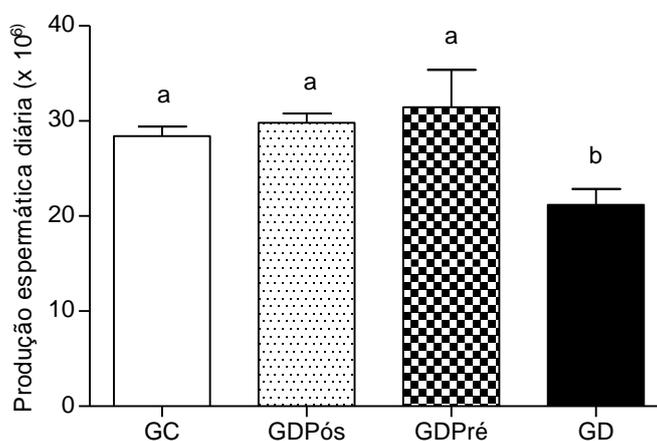


Figura 23. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática de ratos Wistar aos 90 dias de idade. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,005$).

Tabela 28. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Produção espermática ($\times 10^6$)			
GC	GDPós	GDPré	GD
28,42 \pm 2,46 a	29,80 \pm 2,41 a	31,45 \pm 9,63 a	21,18 \pm 3,72 b

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

Os valores para a produção espermática diária por g de testículo não diferiram entre os grupos experimentais ($p = 0,069$), apesar do GD apresentar uma tendência à redução (Figura 24 e Tabela 29).

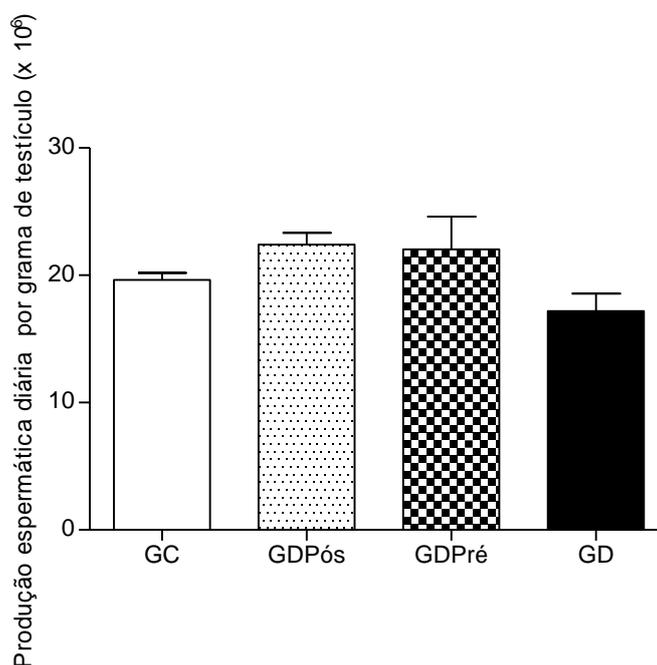


Figura 24. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática por grama de testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Tabela 29. Efeitos da restrição proteica durante a prenhez e a lactação na produção espermática por grama de testículo de ratos Wistar aos 90 dias de idade.

Produção espermática por grama de testículo ($\times 10^6$)			
GC	GDPós	GDPré	GD
19,63 \pm 1,39 a	22,42 \pm 2,27 a	22,04 \pm 6,27 a	17,18 \pm 3,11 b

Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,005$).

6. Discussão

A redução do peso corporal ao nascer dos animais alimentados com a dieta hipoproteica durante a vida intrauterina indica um retardo no desenvolvimento fetal de tais animais. A restrição alimentar durante as etapas iniciais da vida implica em uma adaptação sistêmica que visa a sobrevivência, alterando a expressão do genoma fetal e reduzindo as taxas de divisão celular dos tecidos e órgãos e, assim, o crescimento total do organismo (ELGELBREGT et al., 2000; GUZMAN et al., 2006; ALMEIDA, 2009).

Vários estudos mostram diminuições no peso de nascimento diante de restrições proteicas na fase intrauterina, como Menendez-Patterson et al. (1985), Guzmán et al. (2006), Gosby et al. (2009) e Toledo et al. (2011).

Aos 21 dias de idade, os três grupos que sofreram restrição alimentar apresentaram pesos corporais menores com relação ao grupo controle, da mesma forma do observado nos estudos realizados por Menendez-Patterson et al. (1985), Elgelbregt et al. (2000), Zambrano et al. (2005), Guzman et al. (2006), Ramos et al. (2006), Teixeira et al. (2007), Alves et al. (2008), Gosby et al. (2009), Toledo et al. (2011) e Rodriguez-Gonzalez et al. (2012).

Além disso, os animais sujeitos à restrição proteica durante a lactação apresentaram os menores pesos corporais, o que mostra uma maior importância de tal período para o crescimento corpóreo do que o período de vida intrauterino. Resultado semelhante foi observado nos estudos realizados por Zambrano et al. (2005), Guzman et al. (2006) e Rodriguez-Gonzalez et al. (2012).

Ao longo do experimento até os 80 dias de vida, os grupos restritos durante a lactação continuaram a possuir as menores médias de peso. Aos 90 dias de vida, o GDPós apresentou uma recuperação em seu peso, sendo o GD o único a apresentar redução neste parâmetro. Toledo et al. (2011) também observaram diminuições no peso corporal de ratos aos 90 dias de idade submetidos à restrição proteica durante a vida intrauterina.

No experimento realizado por Guzman et al. (2006), os animais restritos apenas durante a vida intrauterina se tornaram mais pesado aos longo do

experimento. Tal tendência também foi observada neste trabalho para o GDPré, o que poderia ter sido confirmada com o aumento do tempo experimental.

O peso testicular é um parâmetro que apresenta pouca variação entre os indivíduos de uma mesma espécie, sendo então utilizado na avaliação inicial de riscos ao sistema reprodutor masculino (TOLEDO et al., 2011; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012). De acordo com Amann (1970) e França e Russel (1998), o peso dos testículos é importante na avaliação andrológica dos mamíferos, refletindo a sua normalidade e sendo possível inferir a sua produção espermática.

As reduções nos peso testicular observadas nestes estudo, tanto para os animais imaturos quanto para os adultos, corroboram com os estudos realizados por Menendez-Patterson et al., (1985); Mota et al. (2001), Zambrano et al. (2005); Ramos et al. (2006), Teixeira et al. (2007); Rodríguez-González et al. (2012).

Para o peso testicular, assim como para o peso corporal, os animais alimentados com a dieta hipoproteica durante a lactação apresentaram os menores valores, assim como observado nos estudos de Zambrano et al. (2005) e Rodríguez-González et al. (2012).

Com relação ao IGS, no 21^o dia, as alterações nos pesos corporal e testicular dos animais pertencentes ao GDPré e GDPós aconteceram de maneira proporcional, de modo a não alterar o seu valor, assim como no estudo realizado por Rodriguez-Gonzalez et al. (2012). Contudo, no GDPós, a redução do peso corporal foi maior do que a do peso testicular, resultando em um aumento do IGS. Nos animais adultos, o GD exibiu um padrão de redução de pesos semelhante ao GDPós aos 21 dias, possuindo um IGS mais elevado. Enquanto isso, no GDPós e no GDPré aos 90 dias, as reduções ocorreram de maneira proporcional, como observado por Zambrano et al. (2005), Teixeira et al. (2007) e Toledo et al. (2011).

A diminuição do diâmetro tubular nos animais imaturos diante da restrição proteica corrobora com os resultados de Guaragna et al. (1986) e Chiarini-Garcia et al. (2011). De acordo com Hotzel et al. (1998), as reduções no diâmetro tubular estão diretamente relacionadas com a redução do peso testicular devido à nutrição. Contudo, os valores do GD não diferiram com relação ao GC, o que representa uma

adaptação eficiente de tais animais diante de uma carência proteica aplicada desde o início da formação testicular.

Aos 90 dias de idade, o diâmetro tubular do GD continuou a não diferir com relação ao GC. Contudo, o aumento do diâmetro do lúmen resultou na redução da altura do epitélio seminífero quando comparado ao GC. Para os GDPré e GDPós, a redução no diâmetro tubular e o aumento do diâmetro do lúmen causaram uma redução na altura do epitélio seminífero.

Chiarini-Garcia et al. (2011) obtiveram resultados diferentes para os animais submetidos à restrição proteica durante a vida intrauterina e pós-natal, os quais apresentaram redução em seu diâmetro tubular. Contudo, aqueles animais pertencentes aos grupos em que a restrição proteica foi aplicada em apenas um período tiveram o seu diâmetro tubular apenas parcialmente afetado, assim como foi demonstrado por este estudo.

A redução observada no comprimento tubular no GD aos 21 dias de vida continuou a ser observada aos 90 dias. Os GDPré e GDPós não diferiram estatisticamente do grupo controle em nenhuma das idades, mas os valores apresentados aos 90 dias foram maiores do que os do GC.

De acordo com França e Russel (1998), parâmetros estruturais como o tamanho do testículo, o diâmetro tubular e o volume dos túbulos seminíferos estão intimamente relacionados com o comprimento total dos túbulos. Dessa forma, a redução do comprimento tubular do GD está de acordo com as reduções no peso testicular e no volume dos túbulos seminíferos. Além disso, para o GDPré e GDPós, a elevação dos valores do comprimento tubular pode ser explicada pelo aumento do volume tubular aos 90 dias em relação aos 21 dias.

A manutenção do volume intersticial em ambas as idades torna claro que as reduções no peso do testículo são devido às reduções no volume do compartimento tubular.

Em ambas as idades investigadas, o número de células de Sertoli reduziu no animais do GD, ou seja, que foram sujeitos à restrição proteica durante ambos os períodos de proliferação das células de Sertoli. Resultado semelhante foi encontrado por Genovese et al., onde os animais submetidos à restrição alimentar durante a

vida intrauterina e pós-natal apresentaram um menor número de células de Sertoli na fase adulta. Já no estudo realizado por Toledo et al., apenas a restrição proteica durante a vida intrauterina foi suficiente para reduzir o número de células de Sertoli.

Com relação à formação do lúmen nos túbulos seminíferos, os GDPós e GD mostraram uma tendência em possuir um maior número de cordões seminíferos. Tal tendência poderia ser considerada uma diferença estatística se houvesse um aumento no número de animais nos grupos experimentais. Isso mostra um atraso no desenvolvimento das células de Sertoli durante o período pós-natal, refletindo em um atraso na maturação testicular, o que ocorre de acordo com o estado nutricional e o peso corporal do indivíduo, de acordo com Stoker et al. (2000) e Harding et al. (2010).

Atrasos com relação à puberdade são encontrados na literatura como resultado da redução do suprimento proteico. Engelbregt et al. (2000) demonstraram um retardo da separação prepucial enquanto Zambrano et al. (2005) observaram atrasos na deiscência testicular.

O equilíbrio entre a proliferação e a apoptose é um fator de extrema importância na regulação da população de células germinativas no epitélio dos túbulos seminíferos, refletindo diretamente na produção espermática (CLERMONT, 1972; RUSSELL et al., 1990; TAKASHIBA). Na fase espermatogonial, o mecanismo homeostático da regulação é densidade-dependente, limitando a quantidade de células que entrarão em meiose a um número passível de suporte pelas células de Sertoli (DE ROOIJ; LOK, 1987; DE ROOIJ, 1998; TAKASHIBA). Já o mecanismo de regulação nas células germinativas é considerado uma competição por fatores de crescimento ou outros fatores necessários para a sequência de desenvolvimento celular (JACOBSON et al., 1997; TAKASHIBA).

Um atraso no desenvolvimento das células de Sertoli resultará na sua incapacidade em formar um meio ambiente especializado para o desenvolvimento das células germinativas. Os animais pertencentes ao GD exibiram um maior número de células germinativas com características de morte celular, enquanto que no GDPré foi observada uma tendência ao aumento. Tais resultados demonstram

um atraso na maturação testicular como um todo, o que acarretará no atraso do estabelecimento do processo espermatogênico.

De acordo com Takashiba et al. (2011), o número de células germinativas, principalmente o número de espermátide arredondadas, é o melhor indicativo da produção espermática. Para o presente estudo, o GD apresentou uma redução no de espermátides arredondadas e, conseqüentemente, na produção espermática diária. Com relação à produção espermática diária por grama de testículo, não foi observada diferença devido à redução do peso testicular no GD.

O número de células de Sertoli é um fator determinante para a máxima produção espermática no adulto (SHARPE, 1994). Dessa forma, alterações em seu número, estrutura ou função podem danificar o epitélio germinativo e comprometer a espermatogênese (BOEKELHEID et al., 2005). A redução no número de células de Sertoli no animais do GD pode explicar a diminuição na produção espermática diária de tais animais.

No estudo realizado por Chiarini-Garcia et al. (2011), foi observada uma redução no número de espermátides produzidas a partir da diferenciação de uma única espermatogônia do tipo A1, em ratos adultos cujas mães foram alimentadas com dieta proteica nos períodos de prenhez e lactação. Já Toledo et al. (2011) constataram diminuição na produção espermática diária em ratos submetidos à restrição proteica durante a vida intrauterina.

Os grupos GDPós e GD apresentaram uma redução na população de célula de Leydig por testículo. Isso deve-se ao fato da diferenciação das células de Leydig adultas no rato acontecer por volta da segunda semana de vida pós-natal (MENDIS-HANDAGAMA et al., 2001), sendo assim, o período de lactação é o mais importante para o estabelecimento da população de tais células no indivíduo adulto. Quando comparado ao peso testicular, o número de células de Leydig por grama de testículo não se mostrou diferente entre os grupos devido à redução que ocorreu também em tal parâmetro nos grupos GDPós e GD.

Na literatura, vários estudos mostram alterações no eixo hipofisário-gonadal da prole, com diminuições da concentração do LH e da testosterona, diante de restrições proteicas durante a vida intrauterina e pós-natal (ZAMBRANO et al., 2005;

TOLEDO et al., 2011; RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2012). Neste estudo, os GDPós e GD, os quais apresentaram redução no número de células de Leydig, apresentaram valores para a concentração de testosterona sérica que não diferiram do grupo controle, apesar de o GD mostrar uma tendência para a redução de tal hormônio.

Isso pode ser explicado pelo fato de que as médias para o volume nuclear, o volume citoplasmático e volume da célula de Leydig do GDPós terem sido os maiores entre os grupos experimentais, apesar de não apresentarem diferença com relação ao grupo controle. Enquanto no GD, as volumetrias para a célula de Leydig se apresentaram reduzidas.

Para o GDPré, apesar de o número de células de Leydig não ter reduzido, as reduções observadas para o volume nuclear, o volume citoplasmático e volume da célula acarretaram em uma menor concentração de testosterona sérica. De acordo com Costa e Paula (2006), existe uma correlação positiva e significativa entre o volume individual da célula de Leydig e o nível sérico de testosterona. Para Castro et al. (2002), o percentual volumétrico do núcleo e o número de células de Leydig por grama de testículo se correlacionam significativamente para determinar os níveis plasmáticos e testiculares de testosterona.

Em um estudo realizado por Teixeira et al. (2007), utilizando-se ratas prenhez submetidas à restrição proteica durante a lactação, observou-se um aumento nas concentrações sérica e testicular de testosterona da prole. Tais autores sugeriram, então, um mecanismo adaptativo das células de Leydig diante dos distúrbios causados pela restrição proteica. Uma adaptação semelhante também pôde ser vista no presente estudo, onde os grupos com menores populações de células de Leydig alteraram a sua volumetria para garantir a produção de testosterona.

7. Conclusão

Através dos dados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que a restrição proteica provocou reduções significantes em vários parâmetros testiculares, tanto nos animais imaturos quanto no adultos. Observou-se que aqueles animais submetidos à restrição em ambos os períodos de vida intrauterina e pós-natal foram os mais severamente prejudicados, com os grupos restritos em apenas um período apresentando danos intermediários.

8. Anexos

Anexo 1. Autorização do CEUA (Comitê de ética de Uso Animal) da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 19 de dezembro de 2012.

Ofício nº 534/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Elizabeth Neves de Melo**
 Departamento de Anatomia- UFPE
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.050993/2012-24

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "Efeito da dieta hipoproteica durante os períodos de **preñez e lactação no testículo de ratos Wistar adultos**".

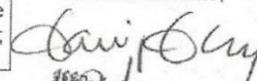
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição-UFPE; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos e fêmeas; Número de animais previsto no protocolo: 52 ratos; Peso: 200-300g; Idade: 4 meses.

Atenciosamente,


 Dra. Maria Teresa Jans
 Presidente do CEF

Referências

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **The Anatomical Record**, v. 94, p. 238-248, 1946.
- ALMEIDA, F. R. C. L. Influência da nutrição da fêmea sobre a qualidade do leite ao nascer. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 31-33, 2009.
- ALVES, A. P.; DÂMASO, A. R.; DAL PAI, V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. 264-271, 2008.
- AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal of Dairy Science Home**, v. 45, p. 774-781, 1962.
- AMANN, R. P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). **The testis**. New York: Academic Press, 1970. p. 433-482, v. 1, cap. 7.
- BOEKELHEID, K.; JOHNSON, K.J.; RICHBURG, J.H. Sertoli cell toxicants. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. (Eds.) **Sertoli cell Biology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 345-382, 2005.
- BROWN, J.; WALKER, S. E. STEINMAIN, K.; 2004. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA.
- CALDEIRA, B. C.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; BALARINI, M. K.; CAMPOS, P. K. A. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyonthus*, Linnaeus, 1766). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 569-575, 2010.
- CASTRO, A. C. S; BERNDTSON, W. E; CARDOSO, F. M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 493-498, 2002.
- CHIARINI GARCIA, H.; MELO, M. C.; ALMEIDA, F. R. C. L. Effects of pre and postnatal protein under nutrition over spermatogenesis in adult rats. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 5, n. 1, p. 5-6, 2011.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.
- COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 58, p. 1086-1094, 2006.
- DE ROOIJ, D. G. Stem cells in the testis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 79, n. 2, p. 67-80, 1998.

DE ROOIJ, D. G.; LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. **The Anatomical Record**, v. 217, n. 2, p. 131-136, 1987.

ENGELBREGT, M. J. T.; HOUDIJK, M. E. C. A. M.; POPP-SNIJDERS, C.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. **Pediatric Research**, v. 48, p. 803-807, 2000.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: LUCA, R. R. **Manual para técnicos de biotério**. São Paulo: Cobeia, 1994.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview**. Madrid: Churchill Communications, 1998. p. 198-219.

GENOVESE, P.; NÚÑEZ, M.E.; POMBO, C; BIELLI, A. Undernutrition During Foetal and Post-Natal Life Affects Testicular Structure and Reduces the Number of Sertoli Cells in the Adult Rat. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, p. 233-236, 2010.

Gosby, A. K.; Stanton, L. M. L.; Maloney, C. A.; Thompson, M.; Briody, Baxter5, J. R. C.; Bryson, J. M.; Denyer, G. S., Caterson, I. D. Postnatal nutrition alters body composition in adult offspring exposed to maternal protein restriction. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 1878–1884, 2009.

GUARAGNA, R.; ROSA, N. B. S.; MORAES, G. G. S.; PERRY, M. L. S.; BERNARD, E. A. Effect of protein malnutrition on glycoprotein synthesis by testes of 20-day-old rats. **International Journal of Andrology**, v. 9, p. 467- 476, 1986.

Guzmán, C.; Cabrera1, R.; Cárdenas, M.; Larrea1, F.; Nathanielsz, P. W.; Zambrano, E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **Journal of Physiology**, v. 572, n. 1, p. 97–108, 2006.

HARDING, J. E.; DERRAIK, J. G. B.; BLOOMFIELD, F. H. Maternal undernutrition and endocrine development. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 5, n. 2, p. 297–312, 2010.

HOTZEL, M. J.; MARKEY, C. M.; WALKDEN-BROWN, S. W.; BLACKBERRY, M. A.; MARTIN, G. B. Morphometric and endocrine analyses of the effects of nutrition on the testis of mature Merino rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.113, p. 217 - 230, 1998.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347-354, 1997.

MAGALHÃES, C. P. **Influência da desnutrição na programação serotoninérgica de áreas encefálicas homeostáticas e hedônicas do comportamento alimentar: um estudo morfo-fisiológico**. 2010. Tese (Doutorado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C.; ARIYARATNE, H. B. S.; TEUNISSEN VAN MANEN, K. R.; HAUPT, R. L. Differentiation of Adult Leydig Cells in the Neonatal Rat

Testis Is Arrested by Hypothyroidism. **Biology of Reproduction**, v.59, p. 351–357,1998.

MENENDEZ-PATTERSON, A.; MENENDEZ, E.; FERNANDEZ, S.; FERNANDEZ, M.; MARÍN, B. Influence of Undernutrition during Gestation and Suckling on Development and Sexual Maturity in the Rat. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 1025-1032, 1985.

MOTA, E. C., SANTOS, A. M., TOSTE, F. P., SAMPAIO, F. J. B., RAMOS, C. F. Effects of Malnutrition in the Testis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 27, p. 500-506, 2001.

MOURA, A. S., FRANCO DE SÁ, C. C.; CRUZ, H. G., COSTA, C. L. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptina. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 617-622, 2002.

ORTH, J.M.; GUNSAWS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v.122, p.787-794, 1988.

PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F. MOURA, E. G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v. 20, n. 11, p. 1603-1612, 2000.

RAMOS, C. da F.; da SILVA, A. M.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. **Urologia Internationalis**, v. 76, n. 1, p. 63-66, 2006.

ROCHA, D. C. M.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L. R. Exposure to constant light during testis development increase daily sperm production in adult Wistar rats. **Tissue & Cell**, v.31, p.372-379, 1999.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M.; MILLÁN, S.; MORAN, N.; TREJO, R.; NATHANIELSZ, P. W.; LARREA, F.; ZAMBRANO, E. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 3, iss.5, p. 1-6, 2012.

RUSSELL, L. D.; SINHÁ-HIKIM, A. P.; ETTLIN, R. A.; CLEGG, E. D. **Evaluation of the testis: Histological and Histopathological**. Clearwater: Cache River Press, p. 286, 1990.

RUSSELL, L. D. Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. In: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. (Eds.). **The Sertoli cell**. Clearwater: Cache River Press, p.1-37, 1993.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Nelly, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven press, p. 1363-1434, 1994.

SILVA JUNIOR, V. A.; VIEIRA, A. C.; PINTO, C. F.; DE PAULA, T. A.; PALMA, M. B.; LINS AMORIM, M. J.; AMORIM, JUNIOR, A. A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm

production in adult rats. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 46, n. 2, p. 157-166, 2006.

STOKER, T. E.; LAWS, S. C.; GUIDICI, D. L.; COOPER, R. L. The Effects of Atrazine Metabolites on Puberty and Thyroid Function in the Male Wistar Rat. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 50-59, 2000.

TAKASHIBA, K. S.; SEGATELLI, T. M.; MORAES, S. M. F.; NATALI, M. R. M. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. **Acta Scientiarum. Health Sciences Maringá**, v. 33, n. 1, p. 25-33, 2011

TEIXEIRA, C. V.; SILANDRE, D. SANTOS, A. M. S.; DELALANDE, C.; F. J. B.; CARREAU, S.; RAMOS, C. F. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. **Journal of Endocrinology**, v.192, p. 301–311, 2007.

TOLEDO, F. C.; PEROBELLI, J. E.; PEDROSA, F. P. C.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KEMPINAS, W. D. G. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 94-102, 2011.

ZAMBRANO, E.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; GUZMÁN, C.; GARCÍA-BECERRA, R.; BOECK, L.; DÍAZ, L.; MENJIVAR, M.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **The Journal of Physiology**, v. 563, pt. 1, p. 275-284, 2005.