

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Morfologia

Implicações do consumo crônico de dieta hipoproteica durante a gestação sobre a foliculogênese, a morfologia placentária e suas consequências sobre a prole em camundongos heterogênicos

Belo Horizonte/MG
2019

Fernando Felicioni

Implicações do consumo crônico de dieta hipoproteica durante a gestação sobre a foliculogênese, a morfologia placentária e suas consequências sobre a prole em camundongos heterogênicos

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Maio/2019

Fernando Felicioni

Implicações do consumo crônico de dieta hipoproteica durante a gestação sobre a foliculogênese, a morfologia placentária e suas consequências sobre a prole em camundongos heterogênicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Fernanda R. C. L. Almeida

Co-orientador: Dr. Enrrico Bloise

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Maio/2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Felicioni, Fernando

Implicações do consumo crônico de dieta hipoproteica durante a gestação sobre a foliculogênese, a morfologia placentária e suas consequências sobre a prole em camundongos heterogênicos [manuscrito] / Fernando Felicioni. - 2019.

87 p. : il.

Orientadora: Fernanda Almeida.

Coorientador: Enrrico Bloise.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Instituto de Ciências Biológicas.

1.Camundongo heterogênico. 2.Dieta hipoproteica. 3.Placenta.
4.Ovário. I.Almeida, Fernanda. II.Bloise, Enrrico. III.Universidade
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.
IV.Título.



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

FERNANDO FELICIONI

208/2019
entrada
2º/2015
2015710056

Às **nove horas** do dia **31 de maio de 2019**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**IMPLICAÇÕES DO CONSUMO CRÔNICO DE DIETA DE BAIXO TEOR PROTEICO DURANTE A GESTAÇÃO SOBRE A FERTILIDADE, A MORFOLOGIA PLACENTÁRIA E SUAS CONSEQUÊNCIAS SOBRE A PROLE EM CAMUNDONGOS HETEROGÊNICOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADO
Dr. Enrrico Bloise	UFMG	APROVADO
Dra. Tania Maria Ruffoni Ortiga	UFRJ	APROVADO
Dr. Juneo Freitas Silva	UESC	APROVADO
Dra. Dirce Ribeiro de oliveira	UFJF Campus GV	APROVADO
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de maio de 2019.**

Dr^a. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida (Orientadora) Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Dr. Enrrico Bloise (Coorientador) Enrrico Bloise

Dr^a. Tania Maria Ruffoni Ortiga Tania Maria Ruffoni Ortiga

Dr. Juneo Freitas Silva Juneo Freitas Silva

Dr^a. Dirce Ribeiro de oliveira Dirce Ribeiro de oliveira

Dr^a. Erika Cristina Jorge Erika Cristina Jorge

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Vanessa Pinho da Silva

Prof. Vanessa Pinho da Silva
Sub-Coordenadora do Programa de
Pós Graduação em Biologia Celular ICB/UFMG

Aos meus pais, Luis Roque e Sônia, e meu
irmão, Antônio Henrique, pelo amor.
O mais nobre dos sentimentos!

Aos professores Fernanda, Enrrico e Hélio.
Grandes orientadores!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me permitir entrar, cursar e concluir este curso; por permitir que eu tenha tantas pessoas a quem agradecer; por ser tão presente em minha vida a ponto de eu não saber como agradecê-lo adequadamente.

À minha família que, mesmo com tamanha distância, sempre se fez presente. Sempre senti saudades, mas nunca me senti distante de vocês! Ao meu pai Luis Roque, por ser sempre um de meus maiores incentivadores e me ensinar a ser perseverante; à minha mãe pela serenidade e pelo amor puro, compreendendo minha ausência mesmo diante de tanta saudade; ao meu irmão Antônio Henrique e sua esposa Mayra, pelo apoio, compreensão e me estimularem a lutar pelos meus sonhos.

À professora Fernanda Almeida, incrível orientadora, pela dedicação, persistência nos difíceis momentos, discussões sobre a biologia do nosso estudo e também sobre a estatística que tanto expandiram meus horizontes. Obrigado pela preocupação de formar um pesquisador nas mais diversas dimensões e apoiar meu interesse pela docência. Obrigado pelos ensinamentos não apenas acadêmicos e profissionais, mas também por ser um ser humano à frente desse tempo! A admiro e sou imensamente grato!

Ao professor Hélio Chiarini, por ensinar o pensamento crítico sobre a morfologia, pela imensurável abertura ao diálogo e aos questionamentos, por ser inspiração a tantas pessoas na docência. Me sinto honrado por você ter participado de minha formação!

Ao professor Enrrico, um co-orientador extremamente presente, pelo estímulo a pensamentos mais críticos sobre a placenta, por ajudar a enfrentar desafios e vencer obstáculos.

Aos professores colaboradores nesta tese, Elizete Rizzo e Marcelo Caliari, pela disponibilidade, pelas conversas extremamente construtivas, pelo interesse em fazer deste um trabalho ainda melhor.

A todos os professores do Departamento de Morfologia que de uma forma ou outra contribuíram para minha formação. Levo um pouco de cada um para construir aquilo que busco ser!

Aos alunos do LABER, grandes amigos que pretendo levar para a vida, em especial os pós-graduandos Thaís Garcia, André, Thaís Mérici, Kennedy e Tailine. É impossível descrever o quanto vocês foram importantes nesses anos, o quanto aprendi com cada um de vocês, o quanto me ensinaram a crescer como ser humano e como profissional. É com muita emoção que escrevo isso! É com muita dificuldade que me despedirei de vocês! Muito obrigado! Quantos bordões! #oooowwwwnnnnnnnn #saudadesdenossoscafés

À Camila pelo apoio em novas técnicas e campos científicos. Ao Walyson pela grande amizade! À Beatriz e ao Lucas pela imensa contribuição que deram com o estudo do ovário, pela seriedade e comprometimento com este trabalho. Serão sempre lembrados com muito orgulho! A todos os demais alunos do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (nosso LABER, nosso segundo lar!), todos contribuindo tanto para que esse trabalho pudesse acontecer, muito obrigado!

À Wiviane, um ser humano especial, que me ajudou a enfrentar inúmeras dificuldades e dividiu comigo momentos tão bons. É difícil descrever o tamanho da importância dessa amizade! Ao Arthur, grande amigo de vida e de república. Aja ouvidos né? Muito obrigado pelos conselhos, pela paciência e pela mentoria! hahaha Ao Daniel Galdino que tanto me ajudou nos difíceis momentos do início de vida em BH, muito obrigado! Seria difícil iniciar a vida nessa cidade sem seu apoio.

Aos grandes amigos que não estão em BH, mas são extremamente importantes: Edvaldo, Kátia, Gabi (saudades dessa pequena! 😊), Rafaela, Rodrigo e Évila. Vocês foram (e são!) pessoas que, mesmo distante, estão próximos ajudando a fazer a vida se tornar melhor! Devo muito a cada um de vocês!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular que recebeu o então projeto de pesquisa e possibilitou condições de sua execução.

À UFMG por permitir a realização deste trabalho e ser, de uma forma tão estimuladora, o espaço por onde passei minhas manhãs, tardes e noites.

À CAPES pela bolsa de estudos e ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro para participação em congressos.

Aos camundongos, meu respeito! Torço para que um dia a ciência não necessite mais de modelos animais!

A TODOS que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, mesmo não sendo citados individualmente, meus sinceros agradecimentos!

“Você está onde você se põe”

Luiz Gasparetto

RESUMO

A ingestão de proteína merece atenção, especialmente durante a gestação, uma vez que o desenvolvimento fetal adequado é dependente do estado nutricional materno. Neste âmbito, a placenta é um órgão-chave para a promoção da interação entre o feto e a mãe. Informações a respeito do impacto da ingestão crônica de dieta com baixo teor proteico sobre a fertilidade, a foliculogênese bem como as características morfológicas placentárias e suas consequências para a prole em populações heterogênicas são limitadas. Para avaliar tais parâmetros, camundongos heterogênicos Swiss receberam dietas com baixo nível proteico (TT) ou nível proteico normal (CC) 15 dias antes e durante a gestação. Dados biométricos foram obtidos e tecidos processados para avaliação histomorfométrica de ovários e placentas nos dias gestacionais (DG) 7.5 e 17.5. Nos DG7.5 e 17.5, a responsividade aos fatores de crescimento IGF1 e VEGF2 foi avaliada nos folículos por meio de seus respectivos receptores (IGF1R e VEGF2R). No DG17.5, os índices de proliferação e apoptose celular, autofagia e sua regulação foram avaliados em placentas através de Ki67, fragmentação de DNA e os marcadores Lc3 e Bcl-2, respectivamente. Embora a estimativa da população folicular não tenha sido afetada seja no DG7.5 ou 17.5, maior proporção de folículos atrésicos foi observada no DG7.5 ($P < 0.05$); os oócitos de folículos secundário e terciário no DG7.5 apresentaram maior tamanho ($P < 0.05$) enquanto folículos secundários e seus respectivos oócitos foram menores no DG17.5 ($P < 0.05$) em fêmeas TT. Tais achados não foram afetados pela expressão de receptores VEGF2R, mas são corroborados por valores de P próximos da significância para uma maior área de expressão de IGF1R em folículos primário e secundário no DG7.5 ($P = 0.09$ e $P = 0.07$, respectivamente) e menor área de IGF1R em folículo secundário no DG17.5 ($P < 0.05$). Nenhuma alteração foi encontrada na interface materno-fetal no DG7.5, mas placentas de fêmeas TT foram mais leves e menores ($P < 0.05$), embora a eficiência, proporção das camadas e os percentuais de proliferação e morte celular não tenham sido afetadas no DG17.5. A autofagia e sua regulação foram semelhantes em ambos os grupos experimentais, as proteínas Lc-3 e Bcl-2 foram simultaneamente localizadas nas células de glicogênio da zona juncional. Fetos do grupo TT foram menores, apresentaram maior prevalência na frequência de peso relativo entre os percentis 10-25, menor frequência de peso acima do percentil 75 e exibiram maior relação peso cérebro:fígado e menor relação peso

fígado:corpo ($P < 0.05$). Mesmo que tamanho e frequência relativa de peso tenham sido semelhantes em ambos os grupos ao nascimento, a relação peso fígado:corpo foi menor em recém-nascidos do grupo TT ($P < 0.01$). Este trabalho demonstra que embora a placenta de camundongos heterogênicos apresente redução em tamanho e peso devido à má nutrição proteica materna, ela preserva seus aspectos morfológicos e aloca os recursos nutricionais preferencialmente ao feto, assegurando adequados peso e tamanho ao recém-nascido. No entanto, tal recuperação não ocorre no fígado fetal, o que poderia predispor o indivíduo a complicações metabólicas futuras.

Palavras-chave: Camundongo heterogênico. Dieta hipoproteica. Ovários. Histomorfometria placentária. Crescimento fetal. Autofagia. Peso ao nascimento.

ABSTRACT

Maternal protein intake deserves special attention since proper fetal development is dependent on maternal nutritional status, and the placenta mediates such interactions. Information on impacts of chronic low protein intake during pregnancy in outbred populations is limited. To evaluate ovarian and placental morphological alterations under chronic maternal low protein intake, adult Swiss outbred female mice were fed either low (TT) or normal (CC) protein diets. Biometrical data were obtained, tissues were processed for histomorphometrical evaluation at gestational days (GD) 7.5 and 17.5. At GD17.5, proliferative and apoptotic indices, autophagy and its regulation were evaluated in placentae through Ki67, DNA fragmentation, Lc3 and Bcl-2 markers, respectively. Even though the estimated follicle population was similar between experimental groups at GD7.5 and 17.5, greater proportion of atretic follicles was observed at GD7.5 ($P<0.05$), oocytes from secondary and tertiary follicles at GD7.5 were larger ($P<0.05$) and secondary follicles and their oocytes were smaller at GD17.5 ($P<0.05$) in TT females. No alterations were found at GD 7.5, but placentae from the TT group were lighter and smaller ($P<0.05$), although efficiency, proportion of layers, cell proliferative and death percentages were not affected at GD17.5. Autophagy and its regulation were similar, and Lc3 and Bcl-2 proteins were simultaneously localized to glycogen cells of the junctional zone. Fetuses from the TT group were smaller, presented higher prevalence of relative weight frequency in the 10th-25th percentiles, lower frequency above the 75th percentile, and exhibited higher brain:liver weight ratio and lower liver:body weight ratio ($P<0.05$). Even though size and relative weight frequency were similar in both groups at birth, liver:body weight ratio was lower in TT newborn ($P<0.01$). Thus, the present results reveal that even though chronic protein malnutrition does not affect fertility, it compromises folliculogenesis. Additionally, placental morphological aspects are preserved in outbred mice to meet fetal growth demands and ensure adequate newborn weight. However, fetal growth impairment affects organ development, predisposing to chronic adult diseases and deserves further investigation.

Key words: Outbred mice. Hypoprotein diet. Ovary. Placental histomorphometry. Fetal growth. Autophagy. Birth weight.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros reprodutivos avaliados em fêmeas não gestantes e gestantes submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 55
- Tabela 2:** Parâmetros biométricos da prole nos períodos gestacional inicial (embrionário) e tardio (fetal) e ao nascimento (recém-nascido) cujas mães foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 61
- Tabela 3:** Parâmetros morfológicos de cones ectoplacentários (DG7.5 – período embrionário) e placentas (DG17.5 – período fetal tardio) após consumo materno crônico (TT) ou não (CC) de dieta hipoproteica 63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Localização das células trofoblásticas gigantes (CTG) na placenta madura de camundongos. São demonstradas as posições morfofuncionais das CTG nas camadas de decídua basal (*Decidua basalis*), zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica da placenta e também a inserção das artérias espiraladas na decídua basal 28
- Figura 2:** Consumo de ração (A) e ganho de peso corporal (B) nos grupos experimentais controle (CC: N=39) e tratado (TT: N=39) durante o período de indução à cronicidade da dieta hipoproteica 53
- Figura 3:** Consumo de ração (A), proteína total ingerida (B), alterações no peso corporal (C) e ganho de peso (D) ao longo da gestação nos grupos experimentais controle (CC: N=29) e tratado (TT: N=25) ... 54
- Figura 4:** Avaliação histomorfométrica dos ovários nos períodos gestacionais (DG) inicial (DG7.5) e tardio (DG17.5) 56
- Figura 5:** Identificação imunohistoquímica de receptores para os fatores de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R) e de crescimento do endotélio vascular tipo 2 (VEGF2R) em folículos ovarianos de camundongos gestantes no DG7.5 submetidos (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 58
- Figura 6:** Identificação imunohistoquímica de receptores para os fatores de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R) e de crescimento do endotélio vascular tipo 2 (VEGF2R) em folículos ovarianos de camundongos prenhes no DG17.5 submetidos (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 59

- Figura 7:** Mensuração da área positiva para os receptores dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF1R, A-B) e do fator de crescimento do endotélio vascular tipo 2 (VEGF2R, C-D) nos períodos de gestação inicial (DG7.5: A; C) e tardia (DG 17.5: B; D) em grupos controle (CC: coluna branca) e tratado (TT: coluna preta) 60
- Figura 8:** Frequência relativa do peso fetal no DG 17.5 (A) e do peso ao nascimento (B) da prole cujas mães foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 62
- Figura 9:** Identificação via imunofluorescência de células Ki67 positivas nas camadas placentárias de zona juncional (A-B), labirintotrofoblasto (C-D) e placa coriônica (E-F) em fêmeas submetidas (TT: B;D;F) ou não (CC: A;C;E) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 64
- Figura 10:** Identificação via imunohistoquímica com técnica de TUNEL de células cujo DNA está fragmentado nas camadas placentárias de zona juncional (A-B), labirintotrofoblasto (C-D) e placa coriônica (E-F) em fêmeas submetidas em fêmeas submetidas (TT: B;D;F) ou não (CC: A;C;E) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 65
- Figura 11:** Quantificação dos índices de proliferação e morte celular na placenta de camundongos submetidos (TT; barra preta) ou não (CC; barra branca) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 66
- Figura 12:** Avaliação da autofagia em placentas cujas fêmeas foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica 67
- Figura 13:** Avaliação da regulação da autofagia e morte celular pela proteína Bcl-2 em placentas cujas fêmeas foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica..... 68

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	NUTRIÇÃO E GESTAÇÃO	20
2.1.1.	A dieta a favor da saúde: a proteína em foco	20
2.2.	FERTILIDADE E GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS	22
2.2.1.	Ovário, foliculogênese e fertilidade	22
2.2.2.	Implantação embrionária	25
2.2.3.	Placentação e placenta murina	27
2.2.3.1.	Proliferação, apoptose e autofagia no contexto placentário	31
2.2.4.	Crescimento fetal	33
2.3.	DIETAS HIPOPROTEICAS DURANTE A GESTAÇÃO	35
3.	OBJETIVOS	38
3.1.	OBJETIVO GERAL	38
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1.	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	39
4.1.1.	Animais e cuidado animal	39
4.1.2.	Dieta e desenho experimental	39
4.2.	ESTUDO DO CONSUMO DE RAÇÃO, BIOMETRIA CORPORAL E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	40
4.2.1.	Consumo de ração e peso corporal	40
4.2.2.	Coleta de material biológico, avaliação biométrica e preparação histológica	40
4.3.	ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO OVÁRIO	42
4.3.1.	População folicular	42
4.3.2.	Proporção volumétrica dos componentes ovarianos	43
4.3.3.	Responsividade do folículo ovariano aos fatores de crescimento IGF1 e VEGF2R	43
4.3.3.1.	Identificação imunohistoquímica das proteínas IGF1R e VEGF2R	43

4.3.3.2.	Determinação da área positiva para IGF1R e VEGF2R	44
4.4.	ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DA INTERFACE MATERNO-FETAL	45
4.4.1.	Área relativa dos componentes da interface materno-fetal	45
4.4.2.	Proporção volumétrica do labirintotrofoblasto	46
4.4.3.	Espessura da membrana interheme	46
4.5.	ESTUDO DE EVENTOS CELULARES RELACIONADOS A HOMEOSTASIA CELULAR PLACENTÁRIA	47
4.5.1.	Avaliação da proliferação celular	47
4.5.1.1.	Imunofluorescência para identificação de células em proliferação	47
4.5.1.2.	Análise de imunofluorescência e determinação do percentual de proliferação celular	48
4.5.2.	Avaliação da morte celular	48
4.5.2.1.	Imunohistoquímica para identificação da morte celular através de fragmentação do DNA – ensaio de TUNEL	48
4.5.3.	Avaliação da autofagia na placenta	49
4.5.3.1.	Imunolocalização das proteínas LC3 e BCL-2	49
4.5.3.2.	Quantificação da proteína LC3 via <i>Western blotting</i>	50
4.5.3.3.	Quantificação da área BCL-2 positiva	51
4.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5.	RESULTADOS	53
5.1.	CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE PESO NOS PERÍODOS DE ADAPTAÇÃO À DIETA E GESTACIONAL	53
5.2.	A FERTILIDADE DA FÊMEA NÃO É COMPROMETIDA PELA CARÊNCIA CRÔNICA DE PROTEÍNAS	54
5.3.	A FOLICULOGÊNESE É COMPROMETIDA PELA CARÊNCIA CRÔNICA DE PROTEÍNAS	55
5.4.	A CARÊNCIA CRÔNICA DE PROTEÍNAS COMPROMETE O DESENVOLVIMENTO FETAL	60

5.5.	ADAPTAÇÕES PLACENTÁRIAS À DIETA CRÔNICA DE BAIXO TEOR PROTEICO ASSEGURAM PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS ADEQUADOS DE TROCAS MATERNO-FETAIS	62
6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO I: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFMG (CETEA)	84
	ANEXO II: PERFIS NUTRICIONAL E CALÓRICO DA DIETA AIN-93G (GRUPO CC)	85
	ANEXO III: PERFIL NUTRICIONAL DA DIETA DE BAIXO TEOR PROTEICO (GRUPO TT)	86
	ANEXO IV: PERFIL CALÓRICO DA DIETA DE BAIXO TEOR PROTEICO (GRUPO TT)	87

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o grande contingente de populações no mundo cujas dietas não satisfazem suas necessidades nutricionais, é uma preocupação da Organização Mundial de Saúde (OMS). Em inúmeros países, inclusive no Brasil, o baixo poder aquisitivo em expressiva parcela da população prejudica sua qualidade nutricional, sendo a carência de proteínas um grande entrave, dado o alto custo dos alimentos ricos em proteína. Assim, tais populações consomem dietas deficientes em proteína, conforme as recomendações da OMS, trazendo sérias consequências à saúde nas mais diversas fases da vida. Adicionalmente, o número crescente de pessoas adeptas ao vegetarianismo exige da OMS grande atenção, já que há necessidade destas terem acompanhamento nutricional adequado para assumir este novo perfil dietético. Independente da origem, a deficiência de proteína na dieta pode prejudicar a fertilidade e a saúde humana e, em se tratando de gestantes, comprometer o desenvolvimento do conceito, uma vez que este é regido pela quantidade de proteínas e demais nutrientes disponíveis através da placenta.

Diante destes e de outros desafios mundiais, a Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu no ano 2000, com o apoio de 191 nações, os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio. Nesse sentido, em 2016, a OMS e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) definiram que os anos entre 2016 a 2025 seriam a Década das Nações Unidas de Ação em Nutrição, objetivando o aprimoramento das dietas, bem como o combate dos sintomas decorrentes às deficiências nutricionais.

Nesse contexto, inúmeros trabalhos têm demonstrado que a deficiência de proteínas pode estar envolvida com as origens fetais das doenças do adulto, devido às alterações biológicas geradas nessa fase do desenvolvimento pré-natal (Armitage et al., 2004). Embora de grande importância para o avanço científico nesse campo, esses trabalhos se utilizam de camundongos *inbred* – camundongos de padrão genético isogênico – como modelo experimental. Contudo, esta tese se atenta à heterogeneidade genética e fenotípica da população humana e, através do camundongo heterogênico – camundongos de padrão genético heterogênico – apresenta dados resultantes de *background* genético mais compatível entre as espécies de camundongos e humanos.

Assim sendo, este estudo objetivou a avaliação da fertilidade da fêmea e de parâmetros placentários diante da deficiência crônica de proteínas durante a gestação. Uma vez que a placenta é o órgão responsável pela nutrição materno-fetal por disponibilizar ao feto os nutrientes e oxigênio necessários ao seu desenvolvimento, ela foi avaliada por meio de análises morfológicas, histomorfométricas e moleculares para uma melhor compreensão da saúde fetal e do recém-nascido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. NUTRIÇÃO E GESTAÇÃO

2.1.1. A dieta a favor da saúde: a proteína em foco

Nas últimas décadas a ciência intensificou os estudos investigando os efeitos adversos de vários fatores ambientais, incluindo o efeito da nutrição, sobre a saúde da gestante, do concepto e sobre a saúde pós-natal deste indivíduo, através da teoria sobre as “Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD)”. Nesta área, pesquisas tem demonstrado que a saúde do indivíduo, até mesmo em idade adulta, é dependente de seu desenvolvimento pré-natal. Portanto, a adequada nutrição da gestante contribui para que o indivíduo tenha assegurado seu potencial genético de desenvolvimento pré-natal que repercute na saúde ao nascimento até a vida adulta (Martin-Gronert; Ozanne, 2006).

Dentre os macronutrientes, aqueles nutrientes de maior predominância na dieta (carboidratos, proteínas e lipídios), a proteína merece destaque, principalmente durante a gestação, por contribuir intensamente com a formação de um novo organismo. Proteínas são macromoléculas constituídas por aminoácidos que, a depender de quais as constitui e como estão dispostos na estrutura da macromolécula, proporcionam a conformação tridimensional necessária para assumir sua forma ativa e exercer suas respectivas funções (Lehninger, 2014). São encontradas em todos os tecidos biológicos e exercem as mais diversas funções biológicas: no metabolismo na forma de enzimas, na composição de hormônios, na composição das membranas biológicas, como transportadores de substâncias, como componente estrutural na musculatura, dentre tantas outras funções (Harvey; Ferrier, 2012).

A OMS preconiza que a quantidade diária de proteína consumida por indivíduos adultos seja 0,75g/kg peso corporal/dia (WHO, 2007). Além da quantidade, é importante que a origem dessas proteínas seja diversificada no intuito de assegurar a ingestão de todos os aminoácidos essenciais – aqueles não sintetizados pelo organismo, mas necessários ao seu adequado funcionamento. Quando gestante, o consumo diário de proteína é importante para que, além da manutenção das

demandas maternas, os aminoácidos recrutados sejam disponibilizados para desenvolvimento de placenta e feto. Desta forma, na medida com que a gestação avança, além da placenta, os sistemas orgânicos do feto se tornam também mais complexos de modo que nos estágios finais do período fetal, o intenso crescimento fetal demanda as mais altas taxas gestacionais de nutrientes maternos e de oxigênio. Nesse sentido, a OMS reportou que 1,2g, 6,0g, e 10,7 g/dia no primeiro, segundo e terceiro trimestres de gestação, respectivamente, são níveis seguros de proteína adicional na dieta (WHO, 2007). O depósito de proteína ocorre predominantemente no feto (42%), útero (17%), sangue (14%), placenta (10%) e mamas (8%) (WHO, 2007).

Os aminoácidos que compõem proteínas da dieta são disponibilizados para assimilação pelo organismo sendo direcionados, via circulação sanguínea, para todos os tecidos e órgãos, inclusive a placenta. Dela, parte destes aminoácidos é transferida, via cordão umbilical, para a circulação fetal (Moore; Persaud, 2008). Independente do destino destes aminoácidos, eles sustentam a síntese proteica local. Portanto, a quantidade adequada de proteínas na dieta contribui para a manutenção da homeostase, seja da mãe, da placenta ou do feto e repercute na saúde do conceito antes e após o nascimento. Por esse motivo, mulheres adeptas à dieta vegetariana ou suas variantes necessitam de acompanhamento nutricional adequado, principalmente durante a gestação de modo que seja assegurada à gestante a quantidade e variedade necessária de aminoácidos em sua dieta.

Nesse contexto, Pawlak (2017) relatou que seriam insuficientes as evidências existentes para que a mulher escolhesse entre ser ou não vegana durante a gestação e lactação. Neste estudo, foram demonstradas as divergências observadas entre o posicionamento da Academia de Nutrição e Dietética e da Sociedade Alemã de Nutrição. Enquanto a primeira afirmava que uma dieta vegana bem planejada seria apropriada para todos os estágios do ciclo da vida, a segunda afirmava que seria difícil ou, até mesmo, impossível obter uma oferta adequada de alguns nutrientes, destacando a vitamina B12, também conhecida como cianocobalamina, uma vez que esta estaria disponível em maior abundância em alimentos de origem animal. De fato, inúmeros trabalhos afirmam que a abstenção de alimentos de origem animal dificulta a assimilação de vitamina B12. Assim, a suplementação desta vitamina na dieta seria recomendável mediante a ocorrência de sintomas de sua deficiência, o que ocorre

apenas em períodos prolongados de ausência da vitamina devido às reservas hepáticas (FLESHER, 2019).

2.2. FERTILIDADE E GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS

2.2.1. Ovário, foliculogênese e fertilidade

Semelhante à mulher, a fêmea de camundongo possui um período reprodutivo que se inicia junto à puberdade. Na mulher, esse período é marcado pela menarca. Contudo, em camundongos não há a ocorrência da menstruação e, por isso, o início da vida reprodutiva é marcado por regulação hormonal ou pela idade da fêmea (7-9 semanas de idade em camundongos heterogênicos, ocorrência de abertura vaginal) (McVey, 2012).

Iniciado o período reprodutivo, a interação entre Sistema Nervoso Central e ovário se torna mais sólida, promovendo eventos hormonais que atuam sobre o sistema genital de forma cíclica. O Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), secretado pelo hipotálamo, atua sobre os gonadotrófos da hipófise anterior, também conhecida como adeno-hipófise ou pituitária, através de vasos sanguíneos que comportam o sistema porta hipotálamo-hipofisário. Na hipófise anterior, o estímulo pulsátil do GnRH irá promover a secreção pulsátil dos Hormônios Folículo Estimulante (FSH) e Luteinizante (LH), essenciais para o crescimento e maturação folicular, respectivamente. Estas ações descrevem um eixo de ação endócrina denominado como eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. (Costanzo, 2017).

No ovário, desde o folículo primordial quiescente até o folículo maduro (também denominado como folículo de Graaf), todos os estágios de desenvolvimento folicular são observados na região cortical: folículo primordial quiescente, cujas células foliculares se apresentam com morfologia pavimentosa; folículo primordial ativado, cujas células foliculares iniciam a mudança na morfologia celular para cúbico; folículo primário unilaminar, folículo no qual ocorre a maturação oocitária e as células foliculares, agora denominadas como células da granulosa, apresentam morfologia cuboide e se estratificam; folículo pré-antral (primário multilaminar), cuja granulosa é composta por duas ou mais camadas celulares e antro ausente; folículo secundário, com início de formação da cavidade antral; folículo terciário (Graaff), cujo antro

envolve todo o oócito que se encontra na periferia do folículo a exceção da porção ocupada pelo *cumulus oophorus* (Voronina et al., 2007).

Estes diferentes tipos foliculares caracterizam as etapas do desenvolvimento folicular, a foliculogênese. Neste processo, a maturação folicular ocorre para propiciar ao oócito o microambiente necessário para seu desenvolvimento. Recentemente, Baumgarten et al. (2017) demonstraram que não apenas o FSH é crucial para a proliferação e diferenciação das células da granulosa, mas o IGF1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1) também apresenta um papel crítico na função destas células e, conseqüentemente, na fertilidade feminina. Em seu estudo, Baumgarten et al. (2017) demonstraram que em camundongos *knockdown* para o receptor de IGF1 (IGF1R) os folículos não atingiam o estágio antral do desenvolvimento mesmo após estimulação por gonadotrofinas e relacionaram este achado à ausência de RNAm e proteínas IGF1R. Além disso, constataram níveis significativamente menores de marcadores de folículos pré-ovulatórios, incluindo aromatase, receptor de LH e α -inibina, sugerindo que IGF1 atua de forma sinérgica a FSH na diferenciação das células da granulosa e coopera para manter a função destas células (Baumgarten et al., 2017).

Então, um dos papéis da endocrinologia reprodutiva é contribuir, através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, para regular o desenvolvimento folicular e o recrutamento do folículo que será liberado durante a ovulação. A endocrinologia ovariana é orquestrada através de duas células que compõem o folículo ovariano. A teoria das duas células, duas gonadotrofinas, estabelece que duas células do folículo ovariano, são responsáveis a FSH e LH e produzem, como resultados os esteroides, andrógenos, estrógenos e progesterona e precursores e ou derivados correlatos.

Nesse intuito, as células do estroma que circundam o folículo primário formam uma bainha de células de tecido conjuntivo que dará origem à teca folicular composta por duas camadas: a teca interna e externa. A teca interna possui receptores para o LH que quando ativados, sintetizam andrógenos a partir de colesterol. Esta é uma camada altamente vascularizada, uma vez que na medida com que o desenvolvimento folicular ocorre o folículo exige maior aporte de nutrientes e oxigênio. Externamente, as células da teca interna são circundadas por células da teca externa, que, até onde se sabe, não possuem atividade endócrina. Contudo, internamente, as células da teca interna são circundadas pelas células da granulosa (denominadas

anteriormente como células foliculares que circundavam o folículo primordial). As células da granulosa, no folículo pré-ovulatório, apresentam grande quantidade de receptores para FSH e promovem a síntese e induzem a atividade da enzima aromatase, que converte andrógenos sintetizados pelas células da teca interna, em estrógenos, hormônios chaves que orquestram o ciclo uterino e a receptividade do endométrio. Após a ovulação, ocorre a luteinização das células da granulosa e da teca interna que irão produzir estrógenos e progesterona em grandes quantidades, em resposta aos hormônios gonadotróficos hipofisários e em resposta à gonadotrofina coriônica humana (hCG), originada do trofoderma embrionário (veja abaixo) (Ross, 2016).

Embora haja um controle para assegurar o pleno desenvolvimento folicular, a maioria dos folículos primordiais sucumbem ao longo da vida reprodutiva por meio de um processo denominado atresia. Matsuda et al. (2012) relataram que as células da granulosa tem se mostrado primordiais na decisão sobre o destino dos folículos através de moléculas que são essenciais para seu crescimento e manutenção bem como na eliminação das próprias células da granulosa por processos apoptóticos que resultam em atresia folicular. De fato, é característico da atresia folicular, a presença de núcleos picnóticos, regressão do núcleo ou afastamento das células da granulosa da membrana basal (Uslu et al., 2017).

Concomitante ao desenvolvimento folicular, o endométrio uterino vive um processo cíclico que o prepara para abrigar o blastocisto resultante do processo de ovulação e fertilização. Em camundongos, este ciclo é denominado como ciclo estral e corresponde ao ciclo menstrual da mulher. No ciclo estral, as fases de pró-estro, estro, metaestro e diestro ocorrem nesta ordem e caracterizam os períodos nos quais o endométrio uterino encontra-se receptivo (metaestro e diestro) ou refratário (proestro e estro) à implantação embrionária (Wang; Dey, 2006). Na fase pré-receptiva, ainda com predomínio de estrógeno em relação à progesterona, aqueles folículos que alcançam a maturidade são selecionados pelo LH para ovulação durante o proestro. Nos períodos de proestro e estro, a fêmea de camundongo está receptiva ao acasalamento, e após a ovulação, a estrutura folicular restante, composta por células da granulosa e da teca, iniciará um processo de diferenciação dando origem ao corpo lúteo, responsável pela síntese do hormônio progesterona. Havendo implantação, a internalização do blastocisto ao endométrio será possibilitada por ação

de células de origem trofoblástica. Na mulher, o hCG age sobre o corpo lúteo e o mantém ativo até a formação da placenta, que irá assumir o seu papel endócrino (Moore; Persaud, 2008).

De forma semelhante, por ação das Células Trofoblásticas Gigantes (CTG) primárias responsáveis pela implantação do blastocisto no endométrio uterino em camundongos, há liberação da forma murina dessa gonadotrofina. A gonadotrofina coriônica mantém a sobrevivência do corpo lúteo que, por sua vez, atuará na síntese e secreção de progesterona, o hormônio predominante da fase endometrial secretória. Nesta fase, o endométrio atinge sua espessura máxima com glândulas endometriais (secretando histótrofo) e vasos sanguíneos desenvolvidos. Tais modificações ocorrem para que o blastocisto tenha ali um ambiente adequado para implantação e aquisição de nutrientes e oxigênio.

2.2.2. Implantação embrionária

Em camundongos, parte do ejaculado é coagulado por meio da enzima vesiculase presente no fluido seminal, formando um plugue vaginal após o acasalamento (Foreman; Schmitt, 1979). Este plugue demonstra a ocorrência da cópula e, caso progrida para uma gestação, a presença do plugue determina o dia gestacional (DG) 0.5. Os espermatozoides no restante do ejaculado se direcionarão através do trato reprodutivo feminino até chegarem ao infundíbulo do oviduto, onde ocorrerá o processo de fecundação dos oócitos, dando origem a zigotos. Posteriormente, cada zigoto sofrerá diversas divisões mitóticas e rearranjo celular que culminarão nos estágios de mórula e blastocisto (DG3.5). Os blastocistos possuem dois tipos celulares: as células do embrioblasto e as células do trofoderma ou trofoblasto (Sutherland, 2003). O embrioblasto dará origem ao embrião propriamente dito, enquanto a trofoderma irá originar a placenta (Sutherland, 2003).

O período no qual o endométrio recebe o blastocisto (DG4.5-DG7.5) é denominado como janela de implantação (Wang; Dey, 2006). Neste momento, há a ocorrência de um diálogo molecular altamente orquestrado no qual as proteínas de superfície do blastocisto são reconhecidas por suas respectivas proteínas no epitélio luminal uterino e vice-versa (Modi et al., 2012). Para tanto, a eclosão do blastocisto possibilita que sejam expostas tais proteínas para iniciar a implantação no endométrio

(Cross et al., 1994), que ocorre em três etapas: aposição, adesão e invasão. Inicialmente ocorre a aposição, o contato do blastocisto com o epitélio luminal uterino no interior da cripta uterina e, posteriormente, o reconhecimento de moléculas de superfície marcam o processo denominado como adesão para dar início à invasão ao endométrio (Wang; Dey, 2006).

Em camundongos, as células células trofoblásticas gigantes (CTG) primárias, originárias do trofoderma blastocístico, invadem o endométrio através da ação de proteinases e metaloproteinases. Em contrapartida, em humanos, o trofoderma se diferencia em citotrofoblasto. Múltiplos citotrofoblastos adjacentes se fundem, através da ação indutora da sincicina 1, e formam o sinciciotrofoblasto, capaz de invadir o estroma endometrial, o que possibilitará a implantação do embrião dentro do endométrio materno (Müntener; Hsu, 1977; Zuckermann; Head, 1986; Bevilacqua; Abrahamsohn, 1989; Hoffman; Wooding, 1993; Kanai-Azuma et al., 1994; Georgiades et al., 2002). Ávidas por nutrientes e oxigênio, estas células liberam enzimas proteolíticas, degradam a matriz extracelular (Alexander et al., 1996) e rompem vasos sanguíneos e glândulas endometriais para promover a aquisição de espaço para desenvolvimento e nutrição inicial do embrião (Bevilacqua; Abrahamsohn, 1989). Com o avançar da gestação, a placenta é formada e assumirá este papel.

Simultaneamente à invasão do trofoblasto, uma importante reação acontece no tecido endometrial, a decidualização. Além de ocorrer intensa modificação das características morfológicas do tecido endometrial, a decidualização é acompanhada de alterações morfológicas das células Natural Killer uterinas (uNK). Durante a gestação, estas células sofrem influxo ao útero e acredita-se que ali residam até o término da gestação. As uNK são observadas na decídua (Stewart; Peel, 1978) a partir do DG4.5 (Ashkar et al., 2003; Paffaro-Jr et al., 2003) e atuam inicialmente na dilatação das artérias espiraladas por meio da secreção de IFN- γ (Ashkar; Croy, 1999; Ashkar et al., 2000). Estas células aumentam seu tamanho gradualmente, bem como o de seus grânulos. À semelhança das NK encontradas no sangue circulante (cNK), as uNK produzem inúmeras citocinas, tais como: TNF- α , VEGF (Lash et al., 2006), IFN- γ (Ashkar; Croy, 1999; Ashkar et al., 2000; Seaward et al., 2010), CSF-1, LIF, IL-1 (Croy et al., 1991), além de iNOS e eNOS (Hunt et al., 1997) que atuarão posteriormente no desenvolvimento e na fisiologia vascular da placenta.

2.2.3. Placentação e placenta murina

A interface materno-fetal exerce um papel fundamental para o desenvolvimento do embrião/feto, pois nutrientes e oxigênio presentes no sangue materno são direcionados à circulação embrionária/fetal para sua nutrição enquanto metabólitos e dióxido de carbono são direcionados à circulação materna para excreção (Moore; Persaud, 2008). Estas trocas materno-fetais disponibilizam nutrientes para a organogênese e são aprimoradas ao longo da gestação na medida em que a placenta se desenvolve.

O desenvolvimento da placenta de camundongos é marcado inicialmente pela ocorrência da junção corioalantoica no DG7.5, seguida por formação e ramificação do labirintotrofoblasto com formação de densas vilosidades e rearranjo dos tecidos para que, na placenta madura, as regiões de decídua materna, zona juncional e labirintotrofoblasto estejam adequadamente estabelecidas (Watson; Cross, 2005). Devido a estes eventos, a placenta de camundongos é classificada como hemocorial, pois o sangue materno encontra-se diretamente em contato com o córion (Enders; Welsh, 1993).

Ainda no DG7.5, uma intumescência celular, de origem das células do trofoderma polar do blastocisto, passa a ser observada localizada entre a decídua mesometrial e o embrião, o cone ectoplacentário (CEP). Contendo células de origem trofoblástica, as células do CEP sofrem intensa proliferação celular e se destinam a tipos específicos de CTG de acordo com o *milieu* no qual estão inseridas. Dessa forma, um dos genes que atuam na diferenciação dessas células é o gene *Tpbpa*, cuja expressão ocorre nas células presentes na região periférica do CEP, enquanto nas demais células é ausente. Além disso, outros fatores contribuem para estabelecimento desse *milieu*, de modo que para algumas células se diferenciarem é necessária a expressão do gene *Tpbpa* (a célula CTG associada à artéria espiralada, SpA-CTG; e a Célula de Glicogênio, CG), enquanto outras não necessitam dessa expressão (células Synt I, Synt II; e a célula CTG sinusoidal, CTG-S) e há ainda aquelas que estando ou não sob estímulo da expressão deste gene conseguem se diferenciar (CTG parietal, CTG-P; CTG de canal, CTG-C) (Simmons et al., 2007). No DG10.5, são reconhecidas as regiões de decídua basal, zona juncional e labirintotrofoblasto em formação bem como ramos de vasos sanguíneos umbilicais presentes na placa

coriônica (Müntener; Hsu, 1977). Neste período também são observadas as CTG secundárias em proliferação assumindo suas posições morfofuncionais. No DG14.5, a placenta apresenta sua morfologia definitiva e as CTG já diferenciadas encontram-se nas suas distintas posições (Fig. 1) (Simmons et al., 2007).

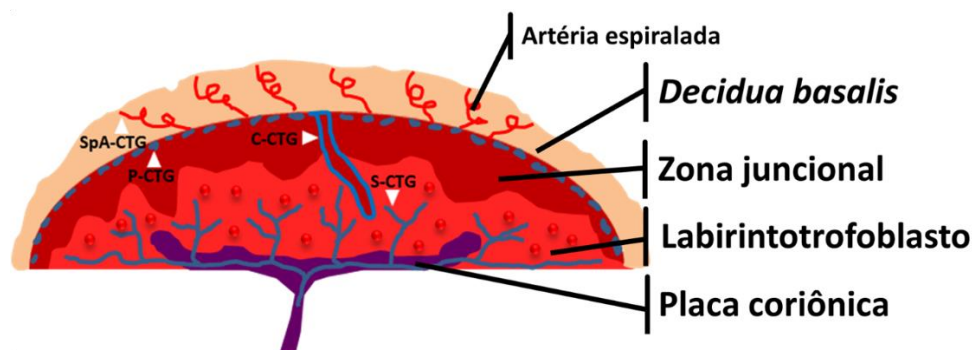


Figura 1: Localização das células trofoblásticas gigantes (CTG) na placenta madura de camundongos. São demonstradas as posições morfofuncionais das CTG nas camadas de decídua basal (*Decidua basalis*), zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica da placenta e também a inserção das artérias espiraladas na decídua basal. SpA-CTG: CTG Associada à Artéria Espiralada; P-CTG: CTG Parietal; C-CTG: CTG de Canal; S-CTG: CTG Sinusoidal. Fonte: do autor.

Na placenta madura, a SpA-CTG, em contato com a artéria espiralada uterina presente na decídua promove o extravasamento do sangue por ela direcionado. O sangue extravasado das artérias é direcionado ao labirintotrofoblasto por meio de canais delimitados pela C-CTG. Estes canais atravessam a camada de zona juncional e, no labirintotrofoblasto, próximo à região de placa coriônica, o sangue jorrado banha os vasos fetais, possibilitando as trocas materno-fetais: nutrientes e oxigênio são direcionados para nutrição do feto enquanto metabólitos e dióxido de carbono são direcionados pelas veias endometriais para excreção pela mãe. Delimitando as regiões de decídua basal e zona juncional é observada a P-CTG, uma CTG de formato fusiforme que se interpõe entre os tecidos maternos e a zona juncional durante toda a gestação. Acredita-se que de origem trofoblástica, a célula de glicogênio presente na zona juncional contribua para a manutenção das reservas energéticas para uso pela placenta e também pelo feto em seus processos metabólicos durante o desenvolvimento. Embora Crim1, um regulador transmembrana da atividade do fator de crescimento, é requerido para o desenvolvimento placentário e necessário para a

diferenciação adequada das células de glicogênio (Pennisi et al., 2012), tanto a origem como a função destas células necessitam ser melhor esclarecidas (Coan et al., 2006).

No labirintotrofoblasto, as trocas materno-fetais ocorrem por meio de uma extensiva rede de vasos nos quais as células endoteliais se relacionam a três camadas de células coriônicas interpondo-se entre sangue materno e fetal. Esse conjunto, portanto, de quatro células formam a membrana interheme – a membrana responsável pela seletividade daquilo que transita de uma circulação sanguínea à outra, sendo anteriormente denominada barreira placentária. Assim, na composição da membrana interheme, a S-CTG encontra-se voltada para os sinusoides maternos da placenta, seguida por duas camadas de células sinciciais (synt I e synt II) e, finalmente, a célula endotelial voltada para o lúmen do vaso de circulação sanguínea fetal (Coan et al., 2005). Tal morfologia da membrana interheme de camundongos é semelhante àquela da membrana interheme da placenta humana, salvo algumas peculiaridades que caracterizam cada espécie. Enquanto a placenta de camundongos apresenta quatro camadas celulares, na placenta humana, a membrana interheme é composta por três camadas: o sinciotrofoblasto voltado para a circulação sanguínea materna e, posteriormente, pelos citotrofoblastos que estão separados do endotélio fetal por uma camada de células mesenquimais fetais. O lúmen do vaso sanguíneo fetal compõe a circulação sanguínea fetal. Portanto, em camundongos, as células synt I e II correspondem ao sinciotrofoblasto humano (Georgiades et al., 2002)

Vale ressaltar que à medida em que a gestação humana avança, as camadas de cito e sinciotrofoblasto sofrem ajustes em suas abundâncias: o número de citotrofoblasto se fundindo ao sinciotrofoblasto ao longo da gestação aumenta, resultando em uma menor proporção de citotrofoblastos a termo, o que resulta em uma maior proporção de sinciotrofoblasto na placenta humana a termo. Os núcleos apoptóticos do sinciotrofoblastos se desprendem para a circulação materna ao longo da gestação (syncytiotrophoblast turnover) na forma de nós sinciciais, o que possibilita a detecção de DNA fetal na corrente sanguínea materna. Tal reestruturação morfológica da membrana interheme torna-a mais delgada, facilitando as trocas materno-fetais, com o avançar da gestação, período no qual as demandas fetais se intensificam (Montenegro; Filho, 2015). No entanto, estes eventos não são relatados para a placenta de camundongos de modo que ao findar a gestação, é possível

observar que a posição assumida pelas quatro camadas celulares da membrana interheme está inalterada (Coan et al., 2005).

Quer seja em humanos ou em camundongos, a maturação morfofisiológica da placenta ocorre com o seu adequado desenvolvimento ao longo da gestação (Georgiades et al., 2002; Watson; Cross, 2005; Cross et al., 2002). Além das próprias células, que compõem as camadas placentárias bem como os vasos presentes no órgão, diversos fatores auxiliam a formação vascular para que as extensivas redes de vasos características da placenta madura sejam estabelecidas (Cross, 2005). Fazem parte destes os fatores de crescimento vascular (VEGF) e placentário, os fatores inibidores dos crescimentos vascular e placentário bem como os fatores reguladores do fluxo sanguíneo, dentre outros.

Jackson e colaboradores (1994) sugeriram que o VEGF atuaria no desenvolvimento da placenta visto que a quantificação deste fator de crescimento foi mais intensa no início da gestação, diminuindo ao longo do período gestacional. Sabe-se que o VEGF, além de ser expresso nos ovários (Reynolds; Redmer, 1998), é sintetizado pelas células trofoblásticas gigantes (Cross et al., 2002; Hu; Cross, 2010), estimula a angiogênese (Carmeliet et al., 2001) e é tido como um dos principais fatores de crescimento placentário (Reynolds; Redmer, 2001). Sua ação é iniciada por meio da interação com seu receptor. Um deles, o Flk-1, é reconhecido como o principal receptor para o VEGF na placenta (Maynard et al., 2003), promovendo proliferação da célula endotelial, migração celular e permeabilidade vascular (Plaisier et al., 2007).

Juntamente com o VEGF, seu homólogo, o fator de crescimento placentário (PIGF ou PGF) (Carmeliet et al., 2001) atua durante o início da embriogênese, momento no qual é sugerido que haja um papel de coordenar a vascularização na decídua (Achen et al., 1997) e, posteriormente, na placenta (Vuorela et al., 1997; Plaisier et al., 2007) por meio de sua atividade quimiotática, mitogênica e angiogênica (Ziche et al., 1997) estimulada pela interação com seu receptor Flt-1 (Luttun et al., 2002). As angiopoetinas (Ang), outro fator de crescimento atuante na placenta, atuam em períodos mais tardios da angiogênese após a indução de novos capilares pelo VEGF (Geva; Jaffe, 2000), conferindo estabilidade ao crescimento destes novos vasos (Yancopoulos et al., 2000). Ang-1 participa da vascularização placentária tendo o Tie-2 como receptor (Reynolds; Redmer, 2001).

Segundo Coan e colaboradores (2004), embora a placenta atinja seu volume máximo no DG16.5, o volume do labirintotrofoblasto ainda aumenta até o DG18.5 em relação à decídua e zona juncional. O volume absoluto e a área de superfície dos espaços sanguíneos maternos se expandem rapidamente entre os dias DG14.5 e DG16.5. Em contrapartida, o desenvolvimento dos capilares fetais é linear e continua durante mais tempo do que dos espaços sanguíneos maternos para que haja capacidade máxima de difusão de oxigênio no DG16.5, em virtude da necessidade de suportar o rápido crescimento fetal até o fim da gestação (COAN et al., 2004).

2.2.3.1. Proliferação, apoptose e autofagia no contexto placentário

Além da vascularização, para que o crescimento da placenta ocorra de forma sadia, é necessário que os processos de manutenção da homeostase tecidual como proliferação e morte celular, bem como a autofagia nas células, ocorram de forma compatível às necessidades teciduais.

Nesse contexto, Ki67 é uma proteína presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (fases G1, S, G2 e mitose), mas ausente no restante do ciclo celular (fase G0) (Scholzen; Gerdes, 2000). Durante a proliferação celular, Ki67 impede que os cromossomos se colapsem em uma massa isolada de cromatina, agindo como um surfactante e permitindo a mobilidade dos cromossomos (Cuylen et al., 2016). Sun e Kaufman (2018) descrevem que a distribuição celular de Ki67 altera consideravelmente durante a progressão do ciclo celular de modo que estas localizações são correlacionadas a distintas funções. Desta forma, durante a interfase, Ki67 é requerida para distribuição celular normal da heterocromatina e sua associação nucleolar, enquanto durante a mitose é essencial para a formação da camada pericromossômica (Sun; Kaufman, 2018), uma região constituída por componentes de processamento de RNAr. Em se tratar da proliferação celular na placenta, Ki67 tem sido uma proteína amplamente avaliada nos mais diversos contextos (Yu et al., 2019; Stenhouse et al., 2018; Unek et al., 2012).

Também contribuindo para a homeostase tecidual, a morte celular por apoptose, é identificada por características típicas de retração citoplasmática; condensação da cromatina que se inicia nas margens do envoltório nuclear (marginalização) e posteriormente envolve todo o núcleo (picnose); fragmentação

nuclear (cariorrexe); alterações pouco acentuadas em outras organelas e formação de corpos distintos, os quais retêm a integridade da membrana plasmática (corpos apoptóticos) (Melo, 2018). Para promoção deste processo finamente regulado, proteínas agem como iniciadoras ou efetoras: caspases iniciadoras (caspases 8 e 9, por exemplo) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras que, uma vez ativas (caspases 3 e 7, por exemplo), estas formas ativas clivam outros substratos proteicos levando ao processo apoptótico que culmina na morte da célula (Carvalho, 2007). Contudo, sabendo que a apoptose trata-se de um processo fisiológico que contribui na manutenção da homeostase tecidual, tem sido avaliado se estas formas proteicas de caspase ativa afeta a apoptose diante de diferentes condições (Pérez-Pérez et al., 2019; Kameshima et al., 2019; Kassan et al., 2016), inclusive na placenta de babuínos submetidos à redução de nutrientes maternos durante a gestação (Arroyo et al., 2010).

Além de mecanismos de proliferação e morte celular contribuírem com a homeostase tecidual, a autofagia tem sido descrita como um processo catalítico intracelular altamente conservado evolutivamente cujo papel é tornar mais eficiente a utilização dos recursos intracelulares e contribuir para a fisiologia normal da célula e do organismo (Thorburn, 2018) através de respostas adaptativas à privação nutricional ou outros estímulos intracelulares (Oh; Roh, 2017). Para tanto, uma vez interessada na reciclagem de nutrientes/organelas intracelulares, uma vesícula denominada como fagóforo é formada para isolar componentes intracelulares e, quando madura, tal vesícula recebe o nome de fagóforo maduro (He; Klionsky, 2009).

Inúmeras proteínas têm sido reconhecidas no estabelecimento da vesícula autofágica e, dentre elas, uma proteína LC3 (a LC3-II) se destaca por se apresentar na membrana plasmática do fagóforo. Este, por sua vez, funde-se ao lisossomo, havendo a lise dos componentes internos da vesícula, agora denominada como autofagolisossomo (Oh; Roh, 2017; Klionsky et al., 2014). Os produtos desse processo catabólico são utilizados para as demais demandas celulares. Ambas as formas proteicas oriundas de LC3, a LC3-I citosólica e a LC3-II ligada à membrana, são produzidas pós-tradução. LC3-I é formada pela remoção dos 22 aminoácidos da porção C-terminal de LC3 recentemente sintetizada e, posteriormente, LC3-I é convertida a LC3-II por conjugação de LC3-I à fosfatidiletanolamina formando um conjugado LC3-fosfatidiletanolamina (LC3-II), a forma proteica recrutada às membranas do autofagossomo. Esta organela, caracteristicamente apresenta duas

membranas celulares que a delimitam e são utilizadas como estratégia morfológica para sua identificação (Klionsky et al., 2014; Hale et al., 2013).

Embora a autofagia tenha sido descoberta na década de 1960, somente nesta última década tem recebido maior atenção para esclarecimento dos fenômenos nos quais esteja envolvida. Adicionalmente, tal processo mostrou-se responsivo a diferentes contextos biológicos, sejam eles fisiológicos ou patológicos, tais como em células placentárias devido à privação de nutrientes (Oh; Roh, 2017; He; Klionsky, 2009), como em placentas de indivíduos que sofreram restrição intrauterina de crescimento (RIUC) (Hung et al., 2012), em doenças como o câncer (White et al., 2015) e, até mesmo, em casos de tratamento de doenças específicas (Thorburn, 2018). Além disso, a autofagia, assim como a morte celular, apresentam mecanismos reguladores. Dentre eles, a proteína Bcl2 é reconhecida por sua função anti-apoptótica e também anti-autofágica (He; Klionsky, 2009), sendo defendida como uma das proteínas que participam da intermediação entre ambos os processos de apoptose e morte celular (Fan; Zong, 2013).

Portanto, desde a sua formação até o seu estabelecimento enquanto órgão maduro, por meio de mecanismos intracelulares a estratégias sistêmicas, a placenta tem um papel soberano: propiciar ao feto condições para seu pleno desenvolvimento. Geralmente, em camundongos, o parto ocorre entre DG18.5-DG20.5, e o recém-nascido passa a ter suas necessidades nutricionais supridas pelo aleitamento materno. Este se prolonga até os 30 dias de vida, momento no qual o camundongo é capaz de iniciar seu comportamento roedor para ingestão de alimento sólido.

2.2.4. Crescimento fetal

Durante o desenvolvimento intrauterino, a transição entre os períodos embrionário e fetal representa o marco de um momento no qual os órgãos e sistemas irão crescer e se especializar para assumir suas funções. Simultaneamente, ocorre um intenso crescimento corporal do feto até o término da gestação, razão pela qual as demandas nutricionais do feto são maiores em relação às do embrião. Para suprir tal demanda crescente de nutrientes, especificamente em camundongos, a placenta cresce até o DG16.5 e, posteriormente, a rede vascular do labirintotrofoblasto se torna ainda mais ramificada como estratégia adicional para aumento das capacidades de

trocas materno-fetais (Cross et al., 2002). Dessa forma, o aporte de nutrientes e oxigênio é aumentado, contribuindo para o crescimento fetal. (Wang; Zhao, 2010)

O acompanhamento do crescimento corporal do feto permite a avaliação de parâmetros que refletem sua saúde intrauterina (Kiserud et al., 2017). Em humanos, esse acompanhamento é feito por meio de exames de imagem (ultrassonografia), no qual parâmetros biométricos como circunferência de cabeça, circunferência abdominal, comprimento do fêmur e comprimento cabeça-nádegas, por exemplo, são avaliados para estimativa da idade gestacional bem como para avaliação da saúde fetal e de possíveis perturbações do crescimento corporal. Recentemente, em um trabalho coordenado pela OMS envolvendo dez países, inclusive o Brasil, os padrões biométricos de estimativa de peso e crescimento fetais foram atualizados (Kiserud et al., 2017). Tais padrões são de extrema importância, pois, dentre diversos parâmetros, apontam os valores dos percentis de peso corporal do feto para cada idade gestacional. Assim, sendo os parâmetros apontados por Kiserud e colaboradores (2017) oriundos de gestações saudáveis, quanto mais próximo o peso estimado do feto estiver daquele determinado pelo percentil 50 para sua idade gestacional, mais adequado estará o peso do feto.

Contudo, é sabido que o crescimento e o desenvolvimento fetais são guiados pelo genoma, mas a regulação genética do crescimento fetal é influenciada pelo ambiente intrauterino no qual o feto cresce (Martin-Gronert; Ozanne, 2006). Nesse sentido, a má nutrição materna pode repercutir na qualidade do ambiente intrauterino e resultar em perturbações do crescimento fetal. Nestes casos, quando as características biométricas do feto estão abaixo do esperado, diz-se que o feto é pequeno para a idade gestacional (PIG). Em casos severos de má nutrição materna, a disponibilidade de nutrientes para o feto é intensamente comprometida, fazendo com que ele não atinja seu pleno potencial de desenvolvimento. Com isso, indivíduos com prejuízo de crescimento possuem peso corporal estimado abaixo do percentil 10, o que caracteriza a ocorrência da restrição intrauterina de crescimento (RIUC) (Sharma et al., 2016), podendo ser também diagnosticado por meio da avaliação da circulação sanguínea no cordão umbilical via doppler. Esta avaliação é de grande relevância uma vez que é sabido que na RIUC o fluxo sanguíneo corporal do feto é direcionado mais intensamente para o cérebro, em detrimento aos demais órgãos, a fim de preservá-lo de condições precárias de desenvolvimento como baixa

oxigenação e carência de nutrientes (efeito de “poupar o cérebro” (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2006)).

Além disso, o acompanhamento pré-natal através da ultrassonografia e avaliação biométrica fetal permite que diante da suspeita de RIUC, também seja estabelecido uma avaliação diferencial: compreender se a RIUC é do tipo assimétrica ou simétrica. O que difere uma condição de outra é a preservação (assimétrica) ou não (simétrica) da circunferência cefálica – o que reflete o tamanho do cérebro. O diagnóstico para determinação desses dois tipos de RIUC foi proposto há quatro décadas por Kurjak et al. (1978). É notório que a RIUC do tipo simétrica é ainda mais prejudicial à saúde fetal, uma vez que o desenvolvimento cerebral também é comprometido. Vale ressaltar que, embora seja possível a suspeita da ocorrência de RIUC por meio do acompanhamento pré-natal, o diagnóstico é dado apenas diante da avaliação do recém-nascido, limitando o diagnóstico fetal a PIG (Sharma et al., 2016).

Uma vez diagnosticada a RIUC, ela inevitavelmente trará comprometimentos à saúde do indivíduo que o acompanharão desde sua fase neonatal até a vida adulta. Tais indivíduos apresentam maior predisposição para ocorrência de doenças crônicas como hipertensão (Barker et al., 2006), doenças cardiovasculares (Barker et al., 1993), diabetes tipo 2 (Hales; Barker, 1992), obesidade (Desai; Ross, 2011) e síndrome metabólica na vida adulta (Gottlieb et al., 2008), assim como postulado pela hipótese de David Barker, a hipótese DOHaD.

2.3. DIETAS HIPOPROTEICAS DURANTE A GESTAÇÃO

Quando a dieta não apresenta quantidade adequada de proteínas, o organismo não consegue suprir seus requerimentos de aminoácidos para manutenção de suas atividades fisiológicas.

Durante a gestação, tal deficiência é ainda mais prejudicial, pois irá afetar não apenas a mãe, mas também a placenta e o feto (WHO, 2016). Segundo Díaz e colaboradores (2014), a placenta é capaz de caracterizar o estado nutricional da mãe e direcionar os nutrientes ao feto. Tal estratégia teria surgido devido a pressões evolutivas de subnutrição materna (Díaz et al., 2014) que prejudicam o crescimento placentário (Coan et al., 2010) e limitam o crescimento fetal (Díaz et al., 2014).

Nesse contexto, a manipulação experimental da dieta é um modelo bem definido para estudar a programação fetal em roedores (Armitage et al., 2004), uma vez que, por razões éticas, a restrição dietética experimental não deve ser realizada em seres humanos. Há evidências de que a restrição proteica (6% de proteína) prejudica a placenta, resultando em peso reduzido da zona juncional e da região de labirintotrofoblasto no DG13.5 (Gao et al., 2013). Rutland e colaboradores (2007) relataram que camundongos submetidos à restrição proteica (9% de proteínas) durante a gestação, apresentaram redução no comprimento dos vasos sanguíneos do labirintotrofoblasto e redução do peso fetal no DG18.5, sugerindo que tal deficiência comprometeria a vascularização placentária. Por outro lado, a restrição proteica materna em ratos resultou em redução do peso do labirintotrofoblasto e expressão aumentada dos genes marcadores de células-tronco trofoblásticas, *Esrrb*, *Id1* e *Id2* na zona juncional da placenta, demonstrando que a restrição proteica prejudica a diferenciação do trofoblasto (Gao et al., 2013).

Além disso, foi demonstrado que a restrição proteica causa prejuízos que repercutem para além da placenta, afetando fetos, recém-nascidos e até mesmo indivíduos adultos. Trabalhos relatam que a restrição proteica (8% de proteínas) promove a diminuição de alvéolos pulmonares em fetos devido à alteração da sinalização de VEGF (Liu et al., 2014), redução do peso de neonatos (10% de proteínas – Gheorghe et al., 2009) e comprometimento no desenvolvimento pós-natal e morfologia de fígado, rins e ovários (6% de proteínas – Almeida et al., 2012). Portanto, é reconhecido que, ainda *in utero*, tais deficiências podem resultar em programação fetal (Coan et al., 2010) e maior predisposição para ocorrência de hipertensão (Barker et al., 2006), doenças cardiovasculares (Barker et al., 1993), diabetes tipo 2 (Hales; Barker, 1992), obesidade (Desai; Ross, 2011) e síndrome metabólica (Gottlieb et al., 2008) relatados previamente.

Esses prejuízos placentários, fetais e do recém-nascido que geram consequências no indivíduo até a vida adulta são debatidos constantemente no campo da DOHaD (Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença) e consistentes com a hipótese do fenótipo econômico proposta por Hales e Barker (1992) na qual se defende que o ambiente intrauterino precário em decorrência a uma deficiência nutricional leva a uma resposta adaptativa que pode perdurar até a vida adulta ou apenas nela se manifestar.

Dado o contexto, é necessário avaliar as consequências da carência crônica de proteínas em linhagens de camundongos que possuem maior diversidade genética e respostas fenotípicas, de modo a refletir a diversidade genética humana. Nesse sentido, Tuttle e colaboradores (2018) defendem que camundongos heterogênicos são mais apropriados na pesquisa biomédica devido à sua heterogeneidade genética, melhorando a reprodutibilidade na pesquisa translacional.

Certamente, políticas de saúde pública precisam ser estabelecidas para assegurar adequada nutrição fetal pela promoção da saúde nutricional de mulheres gestantes. Contudo, no estabelecimento destas políticas públicas, há carência na literatura a respeito de estudos com modelos murinos cuja diversidade genética seja compatível com a diversidade genética humana. Portanto, o presente estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que, embora a má nutrição proteica materna possa contribuir nas alterações epigenéticas e prejudicar o crescimento fetal, ela não promove alterações morfológicas na placenta. Nesse sentido, este estudo utilizou camundongos *Swiss* heterogênicos para avaliar a fertilidade da fêmea e os aspectos morfológicos placentários sob má nutrição proteica crônica, bem como as consequências aos fetos e recém-nascidos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do consumo crônico de dieta de baixo teor proteico durante a gestação sobre a fertilidade, morfologia placentária e sobre parâmetros biométricos da prole em camundongos heterogênicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparando o grupo controle, cuja dieta apresenta níveis adequados de proteína, ao grupo submetido à deficiência proteica, os objetivos específicos foram avaliar:

- Os parâmetros indicadores de fertilidade da fêmea;
- As medidas biométricas de embriões, cones ectoplacentários, fetos e placentas nos períodos inicial e final do desenvolvimento placentário;
- Os parâmetros morfológicos da placenta nos períodos embrionário inicial e fetal tardio;
- A ocorrência dos processos de morte, crescimento e autofagia celular na placenta ao final do período gestacional;
- As medidas biométricas da prole ao nascimento;
- A população folicular bem como a proporção volumétrica dos componentes ovarianos;
- A responsividade do folículo ovariano aos fatores de crescimento IGF1 e VEGF2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

4.1.1. Animais e cuidado animal

Camundongos heterogênicos fêmeas (n=121, 6-8 semanas de idade, 30-40 gramas de peso, nulíparas) de linhagem *Swiss*, foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, e mantidos na sala de experimentação animal do departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em condições padrão de ciclo claro-escuro (12h de luz: 12 h de escuro) e temperatura ($23 \pm 2^{\circ}$ C), com ração e água disponíveis à vontade. Após a sua aquisição, as fêmeas foram pareadas e mantidas durante uma semana para aclimação antes de iniciar o experimento. Os procedimentos animais, incluindo a dieta modificada utilizada, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG, registrado sob protocolo número 290/2015 (Anexo I).

4.1.2. Dieta e desenho experimental

No dia após a aclimação, as fêmeas foram alocadas aleatoriamente em grupos controle (CC, n=62) e tratado (TT, n=59). Em seguida, com 8 semanas de idade, as fêmeas receberam suas respectivas dietas para grupo controle (dieta normoproteica – NPD; AIN-93G cujo teor proteico é de 20% – Anexo II) e tratado (dieta de baixo teor proteico – LPD; AIN-93G modificada para apresentar teor proteico de 8% (Anexo III) contudo, isocalórica em relação à dieta NPD: 3,7kcal/g – Anexo IV) até a eutanásia. Ambas as dietas foram adquiridas da Rhoster® (São Paulo, SP, Brasil) e sua formulação obedece aos padrões estabelecidos por Reeves e colaboradores (Reeves et al., 1993) e adotados pelo *American Institute of Nutrition*. Para indução da cronicidade da dieta, ambas foram fornecidas durante 15 dias, semelhante a estudos prévios (Gonzalez et al., 2016; Ito et al., 2011; Wainwright; Stefanescu, 1983; Muñoz; Bongiorno-Malavá, 1979). Em seguida, o ciclo estral foi acompanhado e então quando em estágio de pró-estro ou estro, identificado via análise da citologia da mucosa vaginal, as fêmeas foram mantidas junto aos machos (três fêmeas por macho),

pernoite para acasalamento. A presença do tampão vaginal na manhã seguinte caracterizou o dia gestacional (DG) DG0.5. Posteriormente, confirmada a gestação, a taxa de prenhez (número de fêmeas prenhes:número de fêmeas) de cada grupo experimental foi obtido. Sabendo que o parto em camundongos *Swiss* ocorre após vinte dias de gestação, ambos os grupos, controle e tratado, foram subdivididos em três grupos: para avaliar a interface materno-fetal e prole nos períodos inicial (DG7.5, período embrionário; CC: 8 animais, TT: 8 animais) e final (DG17.5, período fetal tardio; CC: 11 animais, TT: 10 animais) do desenvolvimento placentário, bem como os recém-nascidos (CC: 85 animais; TT: 63 animais).

4.2. ESTUDO DO CONSUMO DE RAÇÃO, BIOMETRIA CORPORAL E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

4.2.1. Consumo de ração e peso corporal

Para avaliar se a deficiência de proteínas afetaria o consumo de ração ou o ganho de peso corporal, estes parâmetros foram monitorados a partir do primeiro dia de indução à cronicidade da dieta até a eutanásia dos animais. O consumo de ração foi determinado por sua diferença de peso entre as pesagens. Durante o período de indução, ambos os parâmetros foram mensurados diariamente. No entanto, durante a gestação, o monitoramento foi realizado em dias específicos: DG0.5 – à observação do tampão vaginal); DG7.5 - início do desenvolvimento placentário; DG11.5 - transição entre os períodos embrionário e fetal; DG17.5 - crescimento placentário máximo. Tal procedimento visou minimizar a manipulação do animal e, conseqüentemente, o estresse.

4.2.2. Coleta de material biológico, avaliação biométrica e preparação histológica

Para coleta de amostras biológicas, fêmeas prenhes (CC – n= 17; TT – n= 15) foram pesadas, receberam previamente anticoagulante (Heparina 125UI/mL, 20mg/kg, s.c.) e anestésico (Xilazina 2%, 20mg/kg combinado com ketamina 5%, 50mg/kg, i.m.). Em seguida, os camundongos foram submetidos à fixação por

perfusão intravascular de corpo inteiro usando solução salina 0,9% para limpeza do leito vascular, seguida pelo fixador Karnovsky (Paraformaldeído 2%; Glutaraldeído 2,5%) (Chiarini-Garcia et al.2011). Posteriormente, sítios embrionários (DG7.5), bem como fetos e placentas (DG17.5) foram isolados de seus cornos uterinos, por procedimento semelhante ao descrito por Pang e colaboradores (2012) e foram pesados. Adicionalmente, os ovários foram coletados em ambos os períodos gestacionais (DG7.5 e DG17.5), sendo também pesados para obtenção do índice gonadossomático (IGS; peso do ovário:peso da fêmea multiplicado por 100). Posteriormente, ovários, sítios e placentas foram incluídos em resina plástica à base de Glicol Metacrilato (Historesin Embedding Kit, Leica Biosystems 7022 31731, Nussloch/Heidelberg) segundo metodologia proposta pelo fabricante.

Além do peso, outras medidas foram obtidas das amostras coletadas: diâmetro placentário (média entre o maior e o menor diâmetros), tamanho corporal do feto (obtido pela medida do comprimento cabeça-base da cauda), peso do cérebro e fígado fetais (utilizados para cálculo da razão peso cérebro/fígado - parâmetro para diagnóstico de RIUC).

Para avaliação histomorfométrica ovariana e da interface materno-fetal, ambos os ovários, assim como três sítios embrionários e três placentas foram selecionados. Após a inclusão, foram obtidas secções com 3µm de espessura em micrótomo rotativo. Dos ovários foram obtidos cortes semi-seriados de toda a extensão ovariana para estudo da população folicular e da proporção volumétrica dos componentes ovarianos. A profundidade de corte escolhida para os sítios embrionários foi assegurada quando observada a invaginação alantoica bem como a presença do cone ectoplacentário (CEP) em sua maior extensão. Já a profundidade de corte da placenta foi alcançada em sua posição central. Estas secções foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio (Chiarini-Garcia et al., 2011).

Além disso, 5 fêmeas prenhes por grupo no DG17.5 foram anestesiadas como previamente descrito e então eutanasiadas por deslocamento cervical para expor suas placentas e ovários durante laparotomia. Placentas foram isoladas e armazenadas em RNA later® (RNA later®, Sigma Aldrich R0901, SP, Brasil) ou fixadas juntamente com os ovários em paraformaldeído 4% durante 24 horas para posterior análise. Placentas e ovários fixados em paraformaldeído (4% em tampão fosfato, pH=7.3) foram submetidos à desidratação em gradientes crescentes de etanol, clarificados por xilol

e embebidos em parafina (Histosec®, Merck, Darmstadt, Alemanha). Dos blocos em parafina resultantes, secções histológicas de 5µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo. Estas secções foram direcionadas para avaliação de eventos celulares distintos na placenta (proliferação, morte e autofagia bem como regulação de autofagia celulares) e nos ovários (responsividade a IGF1 e VEGF2 por meio da imunomarcagem de suas proteínas receptoras IGF1R e VEGF2R, respectivamente).

Para avaliação do desenvolvimento da prole até o nascimento, os pesos corporal, do cérebro e fígado dos recém-nascidos foram obtidos.

4.3. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO OVÁRIO

4.3.1. População folicular

No intuito de averiguar se a dieta crônica de baixo teor proteico afetaria a quantidade e a qualidade dos folículos ovarianos, folículos viáveis e atrésicos foram avaliados. Folículos viáveis foram classificados nas seguintes categorias conforme Voronina et al. (2007): folículo primordial quiescente, cujas células foliculares se apresentam em morfologia pavimentosa; folículo primordial ativado, cujas células foliculares ganham um aspecto morfológico cúbico; folículo primário, folículo no qual ocorre a maturação oocitária e as células foliculares, agora denominadas como células da granulosa, apresentam morfologia cuboide; folículo pré-antral, cuja camada da granulosa é composta por dois ou mais estratos celulares e ausência de antro; folículo secundário, que apresenta antro de formação incompleta e oócito em posição central; e folículo terciário, oócito deslocado para a periferia do folículo e antro envolvendo todo o oócito à exceção da porção ocupada pelo *cumulus oophorus*. Os folículos atrésicos foram determinados pela invasão da camada granulosa por neutrófilos e macrófagos; invasão da camada granulosa por filamentos de tecido conjuntivo vascularizado; descamação das células da granulosa no antro do folículo; hipertrofia das células da teca interna; colapso do folículo à medida que a degeneração continua; invasão do tecido conjuntivo na cavidade do folículo (ROSS, 2016).

O número estimado de cada categoria folicular foi obtido por meio do fator de correção " $N_i = N_o \times S_t \times T_s / S_o \times d_n$ ", onde: N_i é o número estimado de folículos para

dada classe folicular; No é o número de folículos observados nas secções analisadas; St é o número total de secções no ovário; Ts é a espessura da secção; So é o número de secções observadas; e dn é o diâmetro médio do núcleo do oócito para cada classe folicular (Lopes et al., 2017; Gougeon; Chainy, 1987).

4.3.2. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos

Para avaliar se a carência crônica de proteínas alterou a proporção volumétrica dos componentes ovarianos (folículos primordial, primário, pré-antral, secundário, terciário e atrésico, corpo lúteo, tecido conjuntivo e vaso), foram obtidas fotomicrografias da secção histológica central de ovários incluídos em resina plástica em aumento de 40 vezes. Utilizando o software Image Pro Plus, uma gráticula contendo 192 pontos foi sobreposta à imagem. Os componentes ovarianos indicados pelos pontos foram contados. Em caso de os pontos indicarem artefatos ou nenhum componente, a intersecção foi caracterizada como inválida, reduzindo o número de intersecções válidas naquele campo. Os resultados foram expressos como proporção de cada componente em relação à soma de intersecções válidas.

4.3.3. Responsividade do folículo ovariano aos fatores de crescimento IGF1 e VEGF2

Para avaliar se a carência crônica de proteínas durante a gestação alterou a responsividade dos folículos ovarianos aos fatores de crescimento IGF1 e VEGF2 foram mensuradas após reação imunohistoquímica nestes tecidos, a área positiva para as proteínas IGF1R e VEGF2R, respectivamente.

4.3.3.1. Identificação imunohistoquímica das proteínas IGF1R e VEGF2R

Secções histológicas de ovários maternos nos dias gestacionais DG7.5 (CC=5; TT=5) e DG17.5 (CC=4; TT=4) foram desparafinizadas por xilol, hidratadas em gradiente decrescente de etanol e água destilada, sendo posteriormente lavadas em PBS. Para recuperação antigênica, as secções foram mantidas em tampão citrato de sódio (10 mM; pH=6,0) durante 5 minutos em microondas a 70% da potência por 5

vezes. Em seguida, as lâminas foram imersas em PBS por 3 vezes durante 5 minutos por vez. Para bloqueio da avidina endógena, foi utilizado solução de bloqueio de Avidina (Avidin/Biotin Blockin kit, SP-2001, Vector) a 10% em PBS durante 10 minutos e lavada, em seguida, com PBS por duas vezes durante 5 minutos por vez. Em seguida, foi feito bloqueio da biotina endógena utilizando solução de bloqueio de Biotina (Avidin/Biotin Blockin kit, SP-2001, Vector) a 10% em PBS durante 10 minutos. Os cortes foram, então, lavados em PBS/Triton X-100 0,025% por duas vezes durante 5 minutos por vez. O bloqueio das ligações inespecíficas ao anticorpo foi promovido utilizando solução de BSA/PBS a 3% durante 40 minutos. Após remoção do excesso desta solução, os cortes foram imersos em solução contendo os anticorpos anti IGF1R (mouse anti-rabbit, abcam, ab4065, 1:200 em PBS) ou anti VEGF2R (goat anti-mouse, IgG, AF644, R&D Systems, 1:50 em PBS), overnight. No dia seguinte, PBS foi utilizado por 4 vezes durante 5 minutos por vez para retirar os anticorpos não ligados. Então, as secções que receberam anticorpos anti IGF1R e anti VEGF2R foram incubadas em câmara úmida com, respectivamente, o anticorpo biotilado Vector ba9200 (goat anti-mouse, IgG, 1:200 PBS/BSA 1%) e Dako E0466 (rabbit anti-goat, 1:200 PBS/BSA 1%) durante 60 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS por 3 vezes durante 5 minutos por vez, seguido por streptavidina conjugada com peroxidase durante 30 minutos. Em seguida, foi utilizado o kit cromogênico Peroxidase Substrate Kit (ImmPACT™ DAB, SK-4105, Vector) durante 30 segundos para reação da peroxidase e revelação da marcação. As secções foram imediatamente lavadas com água destilada por 3 vezes durante 3 minutos por vez para bloqueio da reação. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina e seu excesso foi removido com água corrente durante 10 minutos. As secções histológicas foram então desidratadas em gradiente crescente de etanol, clarificadas com xilol e, posteriormente, Entelan foi depositado entre lâmina e lamínula para estoque e preservação até o momento de análise.

4.3.3.2. Determinação da área positiva para IGF1R e VEGF2R

Secções histológicas de ovários após imunohistoquímica para marcação de IGF1R e VEGF2R foram visualizadas utilizando lentes objetivas de 20x em microscópio Axiolab (Carl Zeiss – Oberkochen, Germany). A digitalização foi realizada

utilizando microcâmara Samsung SDC-415 (Seul, South Korea). Para determinação da área positiva para IGF1R, foram digitalizadas as células da granulosa dos folículos ovarianos e para determinação da área positiva para VEGF2R, foi digitalizada toda a extensão da camada da Teca que envolve o folículo ovariano. Em seguida, as imagens foram submetidas a algoritmos do software analisador de imagens KS300 da Carl Zeiss para avaliar a área positiva para ambos os marcadores IGF1R e VEGF2R em metodologia semelhante à descrita por Prata e colaboradores (2017). Para obter a área imunohistoquímica positiva, pixels marrons foram selecionados exclusivamente da região de interesse, uma imagem binária foi criada e realizado o processamento digital. Os resultados foram expressos como área (μm^2) positiva para IGF1R ou VEGF2R.

4.4. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DA INTERFACE MATERNO-FETAL

Para avaliar se a carência crônica de proteínas afeta a nutrição fetal, parâmetros histomorfométricos que refletem a capacidade de trocas materno-fetais foram escolhidos para o período embrionário (proporção entre sítio de desenvolvimento embrionário, *Decidua basalis*, CEP e embrião) e fetal (proporção ocupada pelas camadas placentárias, proporção volumétrica dos componentes do labirintotrofoblasto e espessura da membrana interheme).

4.4.1. Área relativa dos componentes da interface materno-fetal

Uma vez que o CEP originará todas as células trofoblásticas observáveis nas camadas placentárias da *Decidua basalis*, Zona Juncional, Labirintotrofoblasto e Placa Coriônica da placenta madura e contribuirão para a adequada função placentária, estes compartimentos foram escolhidos para avaliar se as proporções entre essas camadas em relação à placenta foram afetadas pela carência crônica de proteínas. Nesse sentido, uma secção em resina plástica de cada sítio embrionário e placenta foi corada com azul de toluidina-borato de sódio e digitalizada pelo Histech 3D blade scanner. Posteriormente, o software Panoramic Viewer (versão 1.15.4 – versão livre, 3D Histech) foi utilizado para delimitar a área de cada compartimento usando a ferramenta “*create polygonal or freehand annotation*”. Em seguida, a

ferramenta “*manage/locate annotations*” foi utilizada para obter a área de cada compartimento. A área de secção transversa da interface materno-fetal foi dada pela soma da área de todos os compartimentos no DG7.5 ou no DG17.5. A área de cada camada foi expressa como área relativa, uma taxa em que cada área do compartimento é avaliada em relação à área de secção transversa.

4.4.2. Proporção volumétrica do labirintotrofoblasto

Para esta avaliação, os sinusoides maternos, membrana interheme, e vasos fetais foram os componentes escolhidos para quantificação usando um sistema quadrático composto por uma gráticula de 220 intersecções. Foram avaliadas quatro fotomicrografias obtidas sob aumento de 40 vezes em cada labirintotrofoblasto de placenta em resina plástica (Grupo controle: n=9; Grupo tratado: n=7). A quantidade de intersecções para cada componente do labirinto bem como a quantidade total de intersecções contada foi definida. Em caso de as intersecções indicarem artefatos ou nenhum componente, a intersecção foi caracterizada como inválida, reduzindo o número de intersecções naquele campo. Os resultados foram expressos como proporção de cada componente em relação à soma de intersecções válidas.

4.4.3. Espessura da membrana interheme

Uma vez que a variação da espessura da membrana interheme resulta em alterações na capacidade de trocas materno-fetais, de cada placenta (Grupo controle: n=9; Grupo tratado: n=7) incluída em resina plástica, foram obtidos 12 campos de labirintotrofoblasto sob aumento de 100 vezes: 6 campos na metade do labirinto voltada para a decídua basal e 6 campos na metade do labirinto voltada para o feto. Em seguida, de cada secção transversa de vaso fetal a espessura mais fina da secção transversa da membrana interheme foi obtida por meio da ferramenta “Straight” que permite o traço à mão livre no software Image J (versão 1.49, National Institutes of Health, USA). Os valores obtidos foram expressos pelo software como comprimento (μm).

4.5. ESTUDO DE EVENTOS CELULARES RELACIONADOS A HOMEOSTASIA CELULAR PLACENTÁRIA

Para avaliação das taxas de proliferação e morte celular, tais células foram identificadas, respectivamente, através do marcador KI67 por imunofluorescência e DNA fragmentado pelo ensaio de TUNEL nas camadas placentárias de zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica. Em seguida, o percentual de células identificadas foi obtido.

4.5.1. Avaliação da proliferação celular

4.5.1.1. Imunofluorescência para identificação de células em proliferação

Secções histológicas de placentas incluídas em parafina foram desparafinizadas por xilol e hidratadas em gradiente decrescente de etanol (etanol em água destilada). Para expor o epítipo da proteína, foi realizada recuperação antigênica com tampão citrato (10mM; pH=6.0) seis vezes (5 minutos cada) em micro-ondas com 70% de potência. Em seguida, Triton X-100 diluído em tampão TBS a 0.025% (m/v; água destilada) foi utilizado como método para permeabilidade celular. Devido à auto fluorescência das hemácias e por sua abundância na placenta, os cortes foram imersos em Sudan Black (1% em etanol 70%) durante 30 minutos para bloquear a autofluorescência das hemácias. Em seguida, Triton X-100 diluído em TBS foi utilizado novamente por três vezes (5 minutos cada). Para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos foi utilizada solução contendo BSA e soro de cabra (BSA 1%, soro de cabra 10% em TBS) durante 90 minutos. Então, para identificar as células em proliferação, anticorpo anti-KI67 (IgG, policlonal, produzido em coelho, abcam ab15580, diluição 1:100 em PBS) foi adicionado, a 4°C em câmara úmida, overnight. No dia seguinte, os cortes foram lavados por tampão TBS em quatro banhos (5 minutos por banho) para remoção de anticorpos não ligados. Posteriormente, para reconhecimento dos anticorpos primários, os cortes ficaram imersos em anticorpo secundário (IgG, 555nm, policlonal, anti coelho, produzido em cabra, Thermo Fisher A-1108, diluído em TBS) na proporção 1:200 (anticorpo:TBS) durante 90 minutos em

câmara úmida a 4°C. Em seguida, anticorpos excedentes foram removidos por TBS (4 banhos, 5 minutos/banho). Para identificação de núcleos celulares, foi utilizado DAPI. Posteriormente, os cortes foram novamente lavados com tampão TBS 4 vezes (5 minutos por vez). Glicerol (1:1; glicerol:TBS) foi utilizado entre lâmina e lamínula para estocagem e preservação dos cortes até o momento de análise.

4.5.1.2. Análise de imunofluorescência e determinação do percentual de proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular, fotomicrografias de tecidos placentários foram obtidas usando o software Zen (blue edition, Carl Zeiss Microscopy) através do microscópio Imager Z2 equipado com o sistema de melhoramento de imagens Apotome.Z2. Cinco campos em aumento de 20 vezes de cada camada placentária de zona juncional e labirintotrofoblasto foram obtidos para avaliar homogeneamente a extensão de cada uma destas camadas. Além disso, para obter fotomicrografias da placa coriônica, no mínimo dois campos foram obtidos de regiões em que a placa se internalizava na camada de labirintotrofoblasto. Para contagem das células, foi utilizada a ferramenta “Cell counting” no software Image J (versão 1.49 – versão livre, National Institutes of Health, USA). O percentual de proliferação celular foi calculado considerando o seguinte cálculo: número de células positivas/número de células positivas somado ao número de células negativas. O resultado foi multiplicado por 100 para ser expresso como percentual de células em proliferação.

4.5.2. Avaliação da morte celular

4.5.2.1. Imunohistoquímica para identificação da morte celular através de fragmentação do DNA – ensaio de TUNEL

O ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*) foi utilizado para identificar células cujo DNA estaria fragmentado (ou seja, células apoptóticas) em tecidos placentários. Nesse sentido, secções placentárias embebidas em parafina foram desparafinizadas em xilol e hidratadas por gradiente decrescente de etanol. Para permeabilização das membranas celulares, foi utilizado

Triton X-100 0,1% diluído em tampão citrato (0,1%, m/v, água destilada; pH=6,0) durante 2 minutos. Em seguida, a digestão proteica foi realizada por Proteinase K 1% em PBS durante 15 minutos. Posteriormente, os tecidos foram lavados em PBS duas vezes (5 minutos por vez) e os demais procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Merck #S7100). Posteriormente, as camadas placentárias de zona juncional e labirintotrofoblasto foram avaliadas usando o microscópio Olympus BX51 acoplado ao sistema de captura de imagens Q Colour3 através do software Q Capture. Fotomicrografias com aumento de 80 vezes foram obtidas de 5 campos para avaliar homogeneamente a extensão de cada uma delas. As regiões placentárias e a contagem de células foram determinadas sob o mesmo método previamente descrito para determinação do percentual de proliferação celular. O percentual de morte celular em cada região da placenta analisada foi calculado considerando o seguinte cálculo: (soma de núcleos positivos/soma de núcleos positivos e negativos). O resultado foi multiplicado por 100 e expresso como percentual de células com DNA fragmentado.

4.5.3. Avaliação da autofagia na placenta

A autofagia na placenta foi avaliada através de seu marcador clássico LC3 e sua regulação pelo marcador BCL-2. Contudo, uma vez que LC3 tem ambas as isoformas LC3-I e LC3-II identificadas pelo mesmo anticorpo e apenas LC3-II está presente na membrana do autofagolisossomo durante o processo de autofagia, a imunohistoquímica permitiu a identificação de células e tecidos dispostos a promover (LC3-I) e promovendo (LC3-II) autofagia, enquanto o western blotting permitiu a quantificação da isoforma proteica relacionada à autofagia propriamente dita (LC3-II).

4.5.3.1. Imunolocalização das proteínas LC3 e BCL-2

Para determinar a região placentária positiva para as proteínas LC3 e BCL-2, seis secções histológicas de placentas (Controle: n=3; Tratado: n=3) incluídas em parafina foram escolhidas para cada proteína avaliada separadamente. Essas secções histológicas foram desparafinizadas por xilol, hidratadas em gradiente decrescente de etanol e água destilada. Para recuperação antigênica, as secções

foram mantidas em tampão citrato de sódio (10 mM; pH=6,0) durante 20 minutos à temperatura de 96°C e posteriormente o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H₂O₂ 3% em PBS durante 30 minutos em câmara úmida. O H₂O₂ remanescente foi lavado por PBS durante 5 minutos. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, BSA 2% foi utilizado durante 30 minutos em câmara úmida. Então, para reconhecimento das proteínas LC3 e BCL-2, anticorpos anti-LC3 (IgG1, produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology sc28266, 1:100 em BSA 1% em PBS) e anti-BCL-2 (IgG, produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology sc492, 1:100 em BSA 1% em PBS) foram adicionados às secções placentárias em câmara úmida a 4°C, overnight. No dia seguinte, PBS foi utilizado para retirar os anticorpos remanescentes. As secções foram incubadas em câmara úmida com anticorpo biotilado (LSAB 2 System-HRP, Dako) durante 45 minutos. Lavados com TBS por quatro vezes (5 minutos por vez), seguido por streptavidina conjugada com peroxidase durante 45 minutos. Em seguida, foi utilizado o kit cromogênico Peroxidase Substrate Kit (ImmPACTTM DAB, SK-4105, Vector) durante 30 segundos. As secções foram lavadas com TBS por 5 minutos. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina e seu excesso foi lavado com água corrente durante 10 minutos. As secções histológicas foram então desidratadas em gradiente crescente de etanol, clarificadas com xilol e, posteriormente, Entelan foi depositado entre lâmina e lamínula para estoque e preservação até o momento de análise. Para descrever as camadas placentárias cujas proteínas LC3 e BCL-2 estavam presentes, as secções placentárias foram avaliadas no mesmo microscópio fotônico mencionado previamente. As secções placentárias foram submetidas à digitalização pelo equipamento Histech 3D blade scanner e fotomicrografias foram obtidas pelo software Pannoramic Viewer (versão 1.15.4 – versão livre, 3D Histech). Para controle negativo, anticorpo primário foi omitido para ambas as proteínas avaliadas.

4.5.3.2. Quantificação da proteína LC3 via *Western blotting*

Para quantificar a proteína LC3II foi realizada a técnica de western blotting. Uma placenta por fêmea prenhe no DG17.5 (Controle: n=3; Tratado: n=3), armazenada em RNA later, foi homogeneizada com os inibidores de protease aprotinina e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e, posteriormente, centrifugada a

15000g e 4°C durante 60 minutos. O sobrenadante, contendo as proteínas, foi coletado. A dosagem proteica foi realizada segundo Bradford (1976). Para cada amostra, 80µg de proteína foi adicionada ao gel de eletroforese (poliacrilamida a 15%) e transferido para membrana PVDF, após sua ativação em metanol, nas seguintes condições: 100V, ~180mA e 70W durante 70 minutos. Em seguida, foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos usando leite em pó Mollico a 1%. Em seguida, a incubação com anticorpo anti-LC3, previamente caracterizada, foi realizada em câmara úmida a 4°C, overnight. No dia seguinte, os anticorpos remanescentes anti-LC3 foram removidos com TBS e a membrana foi incubada durante 2 horas com anticorpo anti-coelho biotilado (IgG, produzido em cabra, Sigma A0545, 1:750). A reação cromogênica foi obtida com o kit Peroxidase Substrate (ImmPACTTM DAB, SK-4105, Vector). β -actina foi escolhida como proteína constitutiva para controle e equalização do cálculo de densidade da banda LC3-II. A densidade de bandas obtida foi estimada usando o software Image J (versão 1.49, National Institutes of Health, USA).

4.5.3.3. Quantificação da área BCL-2 positiva

Após imunolocalização da proteína BCL-2, secções placentárias da extensão das camadas placentárias de zona juncional e labirintotrofoblasto foram visualizadas utilizando lentes objetivas de 10x em microscópio Axiolab (Carl Zeiss – Oberkochen, Germany) e digitalizadas aleatoriamente pela microcâmera Samsung SDC-415 (Seul, South Korea). Em seguida, as imagens foram submetidas a algoritmos do software analisador de imagens KS300 da Carl Zeiss para avaliar a área BCL-2 positiva nas camadas de zona juncional e labirintotrofoblasto, semelhante à metodologia descrita por Prata e colaboradores (2017). Para obter a área imunohistoquímica positiva, pixels marrons foram selecionados, uma imagem binária foi criada e realizado o processamento digital. Devido à irregularidade morfológica da zona juncional, a área BCL-2 positiva foi estimada em equivalência à menor área de zona juncional encontrada e, portanto, os resultados foram expressos como área BCL-2 positiva por 35.000 μm^2 . A área BCL-2 positiva no labirintotrofoblasto foi normalizada e expressa por mm^2 .

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis quantitativas foram testadas para normalidade previamente à análise, usando o procedimento univariado do *Statistical Analysis System* (SAS Institute, 2001). Os dados foram analisados como dados não pareados. Efeitos de tratamento sobre os parâmetros ovarianos, duração do ciclo estral, em dados biométricos embrionários, fetais e do recém-nascido, peso corporal e ingestão de ração materna, avaliação histomorfométrica da placenta, percentual de proliferação e morte celular bem como índice de autofagia e regulação de morte celular e autofagia da proporção volumétrica no labirintotrofoblasto foram analisados usando o procedimento do modo linear geral (GLM) do SAS. O teste qui-quadrado foi realizado para avaliação da proporção de fêmeas gestantes e frequência relativa de peso com o Teste exato de Fisher sendo aplicado para avaliação da significância. Médias foram comparadas usando o teste t de Student. $P < 0.05$ foi considerado significativo. Nas tabelas e figuras, os dados são reportados com média e erro padrão da média (SEM).

5. RESULTADOS

5.1. CONSUMO DE RAÇÃO E GANHO DE PESO NOS PERÍODOS DE ADAPTAÇÃO À DIETA E GESTACIONAL

Durante o período de aclimação e o período gestacional, tanto o consumo de ração quanto o ganho de peso corporal materno não foram afetados pelas dietas ($P > 0,05$; Fig. 2A-B). Contudo, diferenças em ambos os parâmetros foram observadas ao final da gestação (DG17.5), período no qual o consumo de ração no grupo TT foi maior. No entanto, o consumo de proteína foi menor ao longo da gestação ($P < 0,05$; Fig. 3A-B), acompanhado por menor ganho de peso corporal ($P < 0,05$; Fig. 3C-D) nas fêmeas TT em comparação às CC.

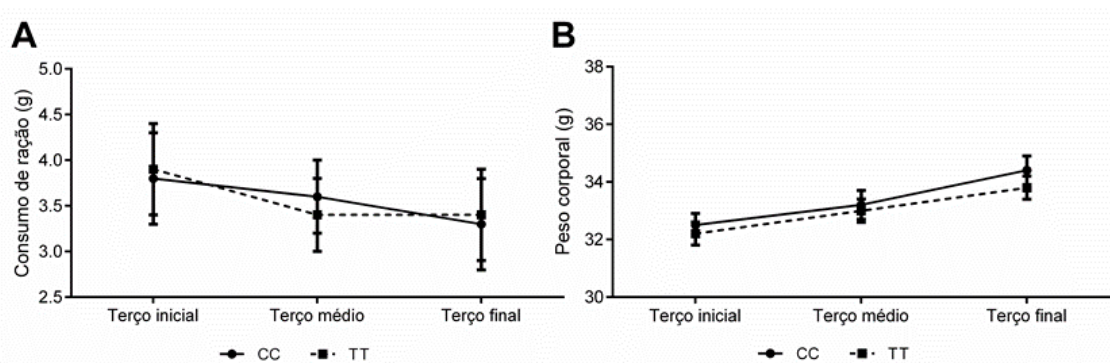


Figura 2: Consumo de ração (A) e ganho de peso corporal (B) nos grupos experimentais controle (CC: N=39) e tratado (TT: N=39) durante o período de indução à cronicidade da dieta hipoproteica. Análise estatística: teste t de Student.

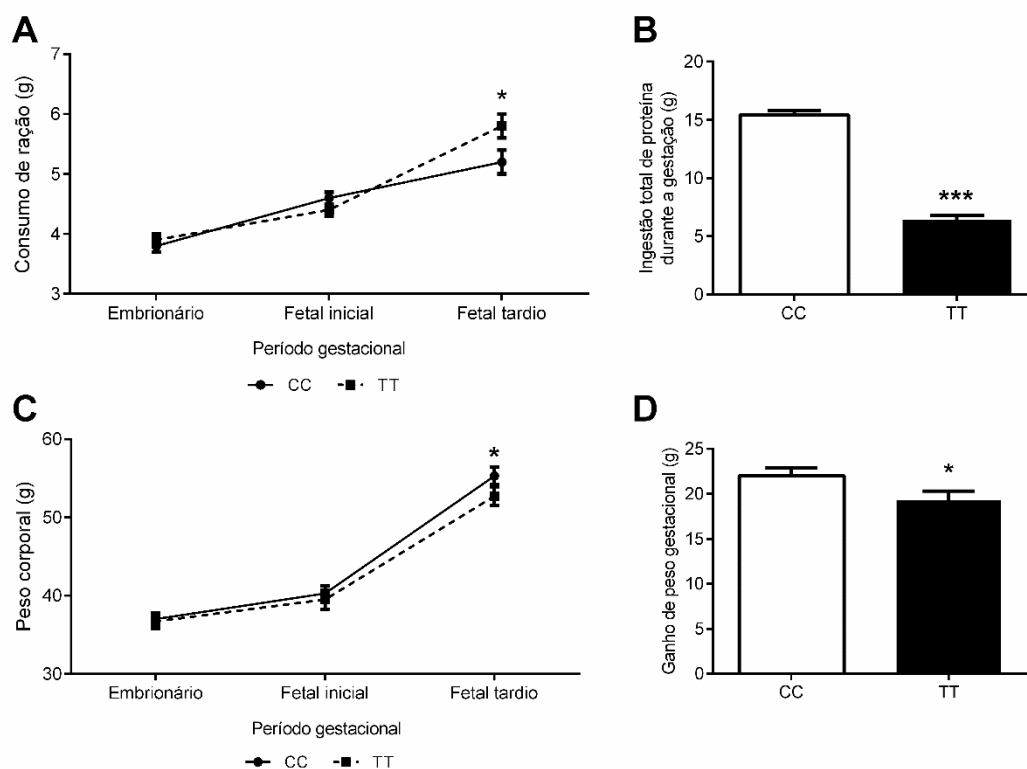


Figura 3: Consumo de ração (A), proteína total ingerida (B), alterações no peso corporal (C) e ganho de peso (D) ao longo da gestação nos grupos experimentais controle (CC: N=29) e tratado (TT: N=25). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Análise estatística: teste t de Student.

5.2. A FERTILIDADE DA FÊMEA NÃO É COMPROMETIDA PELA CARÊNCIA CRÔNICA DE PROTEÍNAS

Durante a indução à cronicidade da dieta, o número e a duração dos ciclos estrais, bem como a duração do diestro foi avaliado. Não observamos diferenças nesses parâmetros demonstrando que os mesmos não foram afetados pela carência crônica de proteínas ($P > 0,05$, **Tabela 1**). Em relação às fêmeas gestantes, o número de ciclos estrais também não sofreu influência da dieta de baixo teor proteico ($P > 0,05$, **Tabela 1**). Além disso, a taxa de prenhez, bem como os pesos materno e ovariano e o índice gonadossomático (IGS) também não foram afetados pela carência crônica de proteínas ($P > 0,05$, **Tabela 1**).

Tabela 1: Parâmetros reprodutivos avaliados em fêmeas não gestantes e gestantes submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica.

Parâmetros reprodutivos	CC	SEM	TT	SEM	P-valor
<i>Fêmea não gestante</i>					
N	62		59		
Número de ciclos estrais	6,3	0,6	6,7	0,5	NS*
Duração do ciclo estral (dias)	5,4	0,4	6,0	0,3	NS
Duração do diestro (dias)	8,5	0,8	9,2	1,2	NS
<i>Fêmea gestante</i>					
N	45		36		
Número ciclos estrais					
Duração do ciclo (dias)	6,3	0,4	5,9	0,5	NS
Taxa de prenhez (%)	73		61		NS
Peso corporal (g)	56,5	1,6	57,0	1,7	NS
Peso médio ovariano (g)	0,016	0,001	0,013	0,001	NS
IGS	0,026	0,002	0,024	0,002	NS

*NS = não significativo

5.3. A FOLICULOGÊNESE É COMPROMETIDA PELA CARÊNCIA CRÔNICA DE PROTEÍNAS

A avaliação das proporções dos diferentes componentes ovarianos revelou menor proporção de folículos primários simultaneamente à maior proporção de folículos atrésicos no DG7.5 ($P < 0,05$, **Fig. 4-A**). Por outro lado, no DG17.5 apenas folículos pré-antrais foram afetados pela carência crônica de proteínas, apresentando menor proporção em relação aos demais componentes ovarianos ($P < 0,05$, **Fig. 4-B**). Adicionalmente, observou-se que a estimativa da população folicular total não foi alterada pela carência crônica de proteínas seja no DG7.5 ($P > 0,05$, **Fig. 4-C**) ou no DG17.5 ($P > 0,05$, **Fig. 4-D**).

É interessante notar que o diâmetro dos folículos secundário e terciário e dos respectivos oócitos, avaliado em ambos os dias gestacionais, apresentou uma resposta dependente do período gestacional. Quando avaliado o DG7.5, correspondente ao período embrionário cujas demandas nutricionais do embrião são menores, oócitos de folículos secundário e terciário nos animais TT apresentaram maior diâmetro quando comparados às fêmeas CC ($P < 0,05$, **Fig. 4-E**). Por outro lado, no DG17.5, correspondente ao período fetal cujas demandas nutricionais do feto são elevadas, tanto os folículos secundários como os respectivos oócitos apresentaram menor diâmetro em fêmeas TT ($P < 0,05$, **Fig. 4-F**).

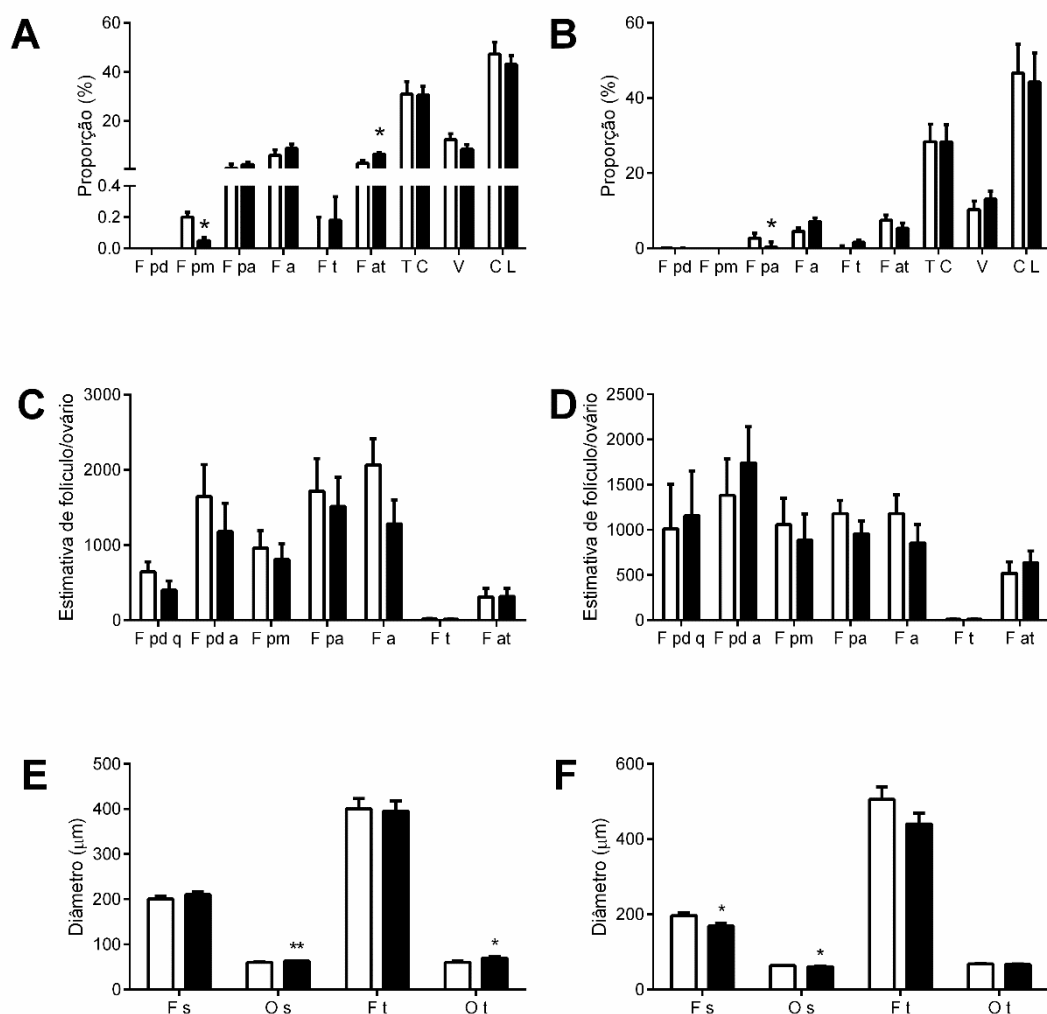


Figura 4: Avaliação histomorfométrica dos ovários nos períodos gestacionais (DG) inicial (DG7.5) e tardio (DG17.5). Proporção dos componentes ovarianos (A-B; N: CC=5, TT=5), estimativa da população folicular ovariana (C-D; N: CC=5, TT=5) e diâmetro dos folículos e oócitos secundário e terciário (E-F; N: CC=5, TT=5) nos períodos de gestação inicial (DG7.5: A;C;E) e tardia (DG17.5: B;D;F) nos grupos CC (coluna branca) e TT (coluna preta). F: Folículo; pd: primordial; pm: primário; pa: pré-antral; a: antral; t: terciário; at: atresico; pd q: primordial quiescente; pd a: primordial ativado; s: secundário; TC: Tecido Conjuntivo; V: Vaso; CL: Corpo Lúteo; O: Oócito. Análise estatística: teste t de Student. *P<0,05; **P<0,01.

A marcação imunohistoquímica para IGF1R em folículos ovarianos (**Fig. 5**) revelou que a membrana plasmática das células da granulosa é responsiva à imunomarcação para estes receptores em todos os folículos analisados tanto no DG7.5 como no DG17.5, independente se a fêmea foi submetida (TT) ou não (CC) à má nutrição proteica crônica.

Em se tratando da responsividade ao receptor de VEGF2, a marcação imunohistoquímica apresentou responsividade apenas em células endoteliais da

camada da teca de folículos ovarianos (**Fig. 6**) em ambos os dias gestacionais (DG7.5 e DG17.5) e grupos experimentais (CC e TT) analisados.

Quando avaliada a área responsiva a IGF1R em folículos ovarianos oriundos de fêmeas no DG7.5, observou-se valores de P próximos da significância em relação ao tamanho dos folículos primário e secundário no grupo TT ($P=0,09$ e $P=0,07$, respectivamente, **Fig. 7-A**). Já no DG17.5 foi observada redução da área responsiva a IGF1R em folículos secundários ($P<0,05$, **Fig. 7-B**). Quando avaliada a área responsiva ao receptor de VEGF2, observou-se que esta não foi alterada pela dieta em nenhuma das populações foliculares avaliadas seja no período de gestação inicial (DG7.5) ou tardia (DG17.5) ($P>0,05$, **Figs. 7C e D**, respectivamente).

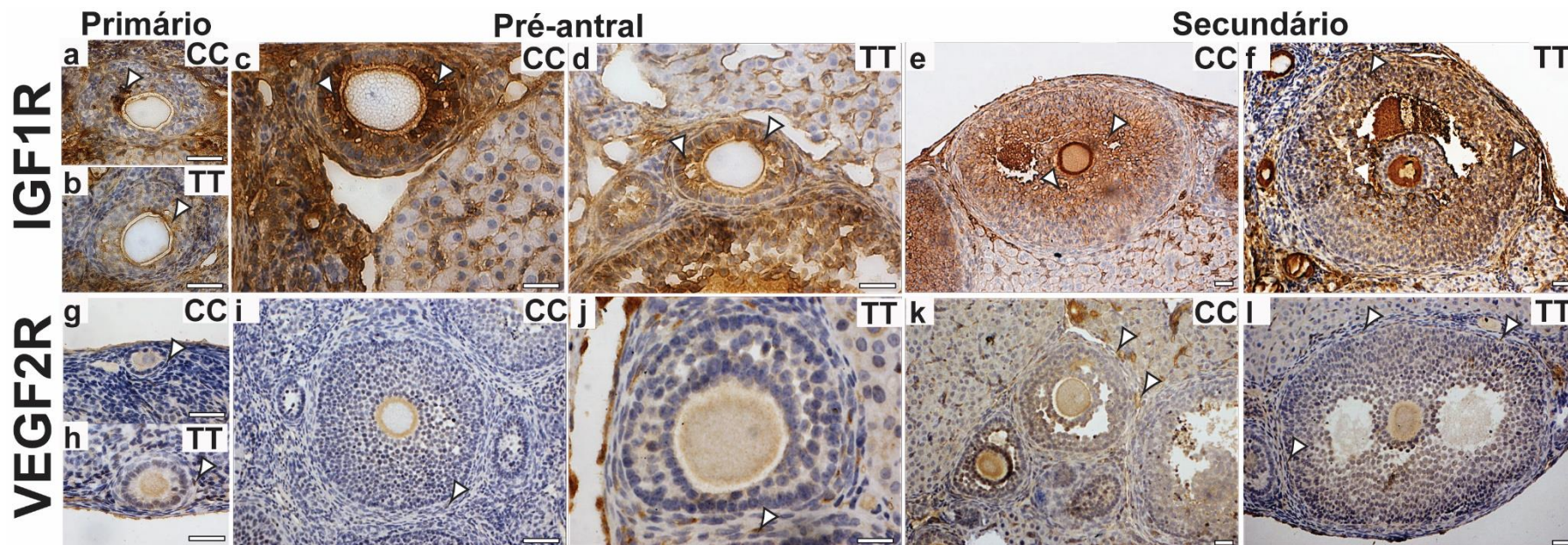


Figura 5: Identificação imunohistoquímica de receptores para os fatores de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R) e de crescimento do endotélio vascular tipo 2 (VEGF2R) em folículos ovarianos de camundongos gestantes no DG7.5 submetidos (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. (a-f): imunomarcagem de IGF1R (cabeça de seta) em folículos primário, pré-antral e secundário; (g-l): imunomarcagem de VEGF2R (cabeça de seta) em folículos primário, pré-antral e secundário. Barra: (a;b;g;h): 80 μ m; (c-f; i-l): 45 μ m.

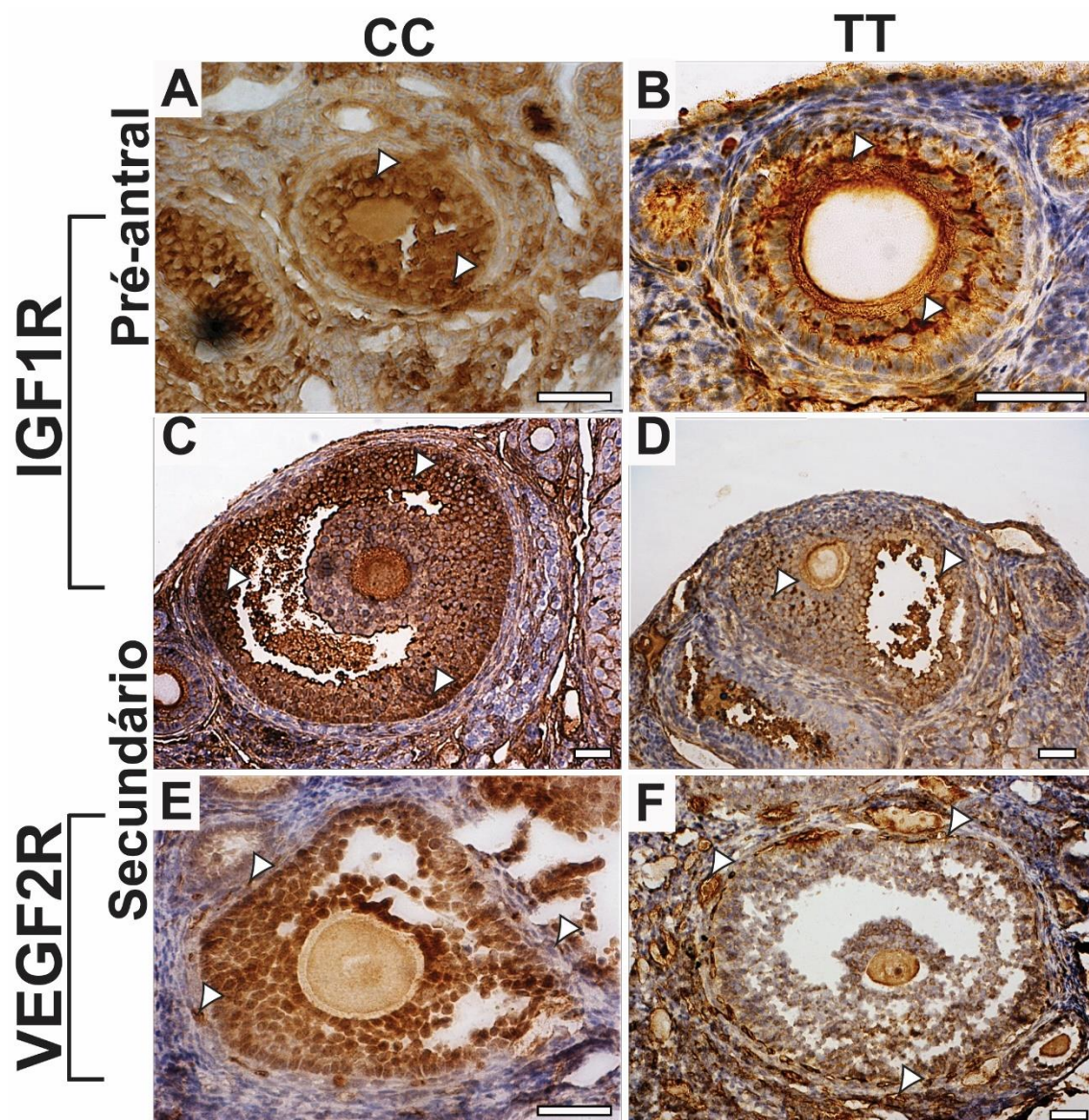


Figura 6: Identificação imunohistoquímica de receptores para os fatores de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R) e de crescimento do endotélio vascular tipo 2 (VEGF2R) em folículos ovarianos de camundongos prenhes no DG17.5 submetidos (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. (A-D): imunomarcção de IGF1R (cabeça de seta) em folículos pré-antral e secundário; (E-F): imunomarcção de VEGF2R (cabeça de seta) em folículo secundário. Barra: 56 μ m.

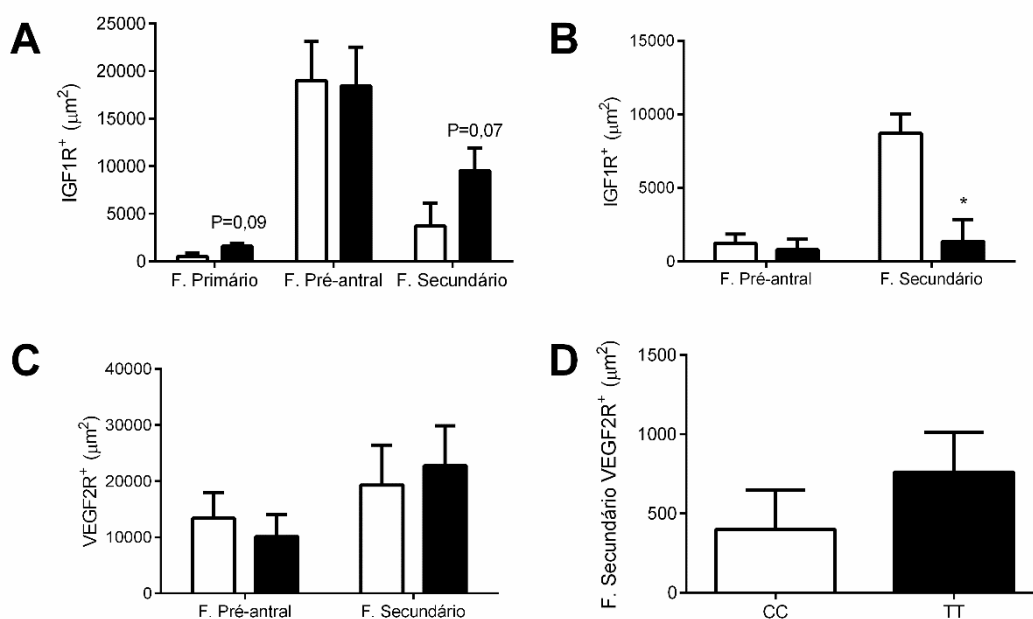


Figura 7: Mensuração da área positiva para os receptores dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF1R, A-B) e do fator de crescimento do endotélio vascular tipo 2 (VEGF2R, C-D) nos períodos de gestação inicial (DG7.5: A; C) e tardia (DG 17.5: B; D) em grupos controle (CC: coluna branca) e tratado (TT: coluna preta). F: Foliculo. Análise estatística: teste t de Student. *P<0,05

5.4. A CARÊNCIA CRÔNICA DE PROTEÍNAS COMPROMETE O DESENVOLVIMENTO FETAL

Parâmetros relacionados à prole seja em vida pré (DG7.5 – período embrionário – e DG17.5 – período fetal) como pós-natal (1º dia de vida – recém-nascido) são apresentados na **Tabela 2**. Durante a gestação inicial (DG7.5), o baixo consumo de ração não afetou os parâmetros biométricos avaliados. No entanto, no período gestacional tardio (DG17.5), a prole TT apresentou menor comprimento cabeça-inserção da cauda, menor peso do fígado, menor peso relativo do fígado (peso fígado: peso corporal) e maior relação peso cérebro:peso fígado (P<0.05). Contudo, nenhuma diferença no peso fetal foi observada (P>0.05).

Quando analisada a frequência relativa de peso corporal, uma maior prevalência de fetos TT (DG17.5) foi observada entre o 10º e 25º percentis (um aumento de 2,4 vezes) enquanto a proporção de fetos acima do 75º percentil foi drasticamente reduzida (aproximadamente 4 vezes) (**Fig. 8A**).

Surpreendentemente, quando avaliada a prole recém-nascida, a frequência relativa de peso corporal foi semelhante em ambos os grupos experimentais (**Fig. 8B**). Além disso, o tamanho dos recém-nascidos (comprimento cabeça-inserção da cauda) do grupo TT foi semelhante ao tamanho daqueles do grupo CC (**Tab. 2**), sugerindo uma recuperação de crescimento prévia ao nascimento. Entretanto, este crescimento compensatório não se estendeu ao peso do fígado, à relação peso fígado:peso corporal ou à relação peso cérebro:peso fígado de recém-nascidos ($P < 0.05$; **Tab. 2**).

Tabela 2: Parâmetros biométricos da prole nos períodos gestacional inicial (embrionário) e tardio (fetal) e ao nascimento (recém-nascido) cujas mães foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo de dieta hipoproteica.

Parâmetros biométricos	CC	SEM	TT	SEM	P-valor
Período embrionário (DG7.5) – baixa demanda de proteínas pelo embrião					
N	105		88		
Embriões/gestação	13.0 ^a	0.6	11.0 ^a	0.4	NS
Sítios embrionários (g)	0.030 ^a	0.004	0.037 ^a	0.004	NS
Reabsorções	0 ^a	0	0 ^a	0	NS
Relação área embrião/sítio	2.45 ^a	0.25	1.70 ^a	0.34	NS
Período fetal (DG17.5) – alta demanda de proteínas pelo feto					
N	99		111		
Fetos/gestação	11.0 ^a	0.5	12.0 ^a	0.6	NS
Fetos viáveis	9.0 ^a	0.7	10.4 ^a	0.8	NS
Reabsorções	2.2 ^a	0.5	1.4 ^a	0.6	NS
Peso do feto (g)	1.000 ^a	0.015	0.956 ^a	0.016	NS
Tamanho do feto (mm)	22.00 ^a	0.16	21.60 ^b	0.16	<0.05
Cérebro (g)	0.090 ^a	0.004	0.088 ^a	0.004	NS
Fígado (g)	0.072 ^a	0.002	0.057 ^b	0.002	<0.01
Relação peso cérebro:peso fígado	1.38 ^a	0.09	1.76 ^b	0.09	<0.01
Relação peso fígado:peso corporal	0.069 ^a	0.003	0.060 ^b	0.003	<0.05
Recém-nascido – efeitos pós-natal da má nutrição intrauterina					
N	85		63		
Tamanho da ninhada	12.0	0.7	10.5	0.7	NS
Peso (g)	1.65 ^a	0.02	1.65 ^a	0.02	NS
Tamanho (mm)	31.3 ^a	0.2	31.2 ^a	0.2	NS
Cérebro (g)	0.083 ^a	0.001	0.078 ^a	0.002	NS
Fígado (g)	0.069 ^a	0.001	0.057 ^b	0.001	<0.001
Relação peso cérebro:peso fígado	1.23 ^a	0.037	1.43 ^b	0.044	<0.01
Relação peso fígado:peso corporal	0.042 ^a	0.001	0.035 ^b	0.002	<0.01

^{a,b} Médias com diferentes sobrescritos na mesma linha diferem ($P < 0.05$); NS: não significativo. Análise estatística: teste t de Student.

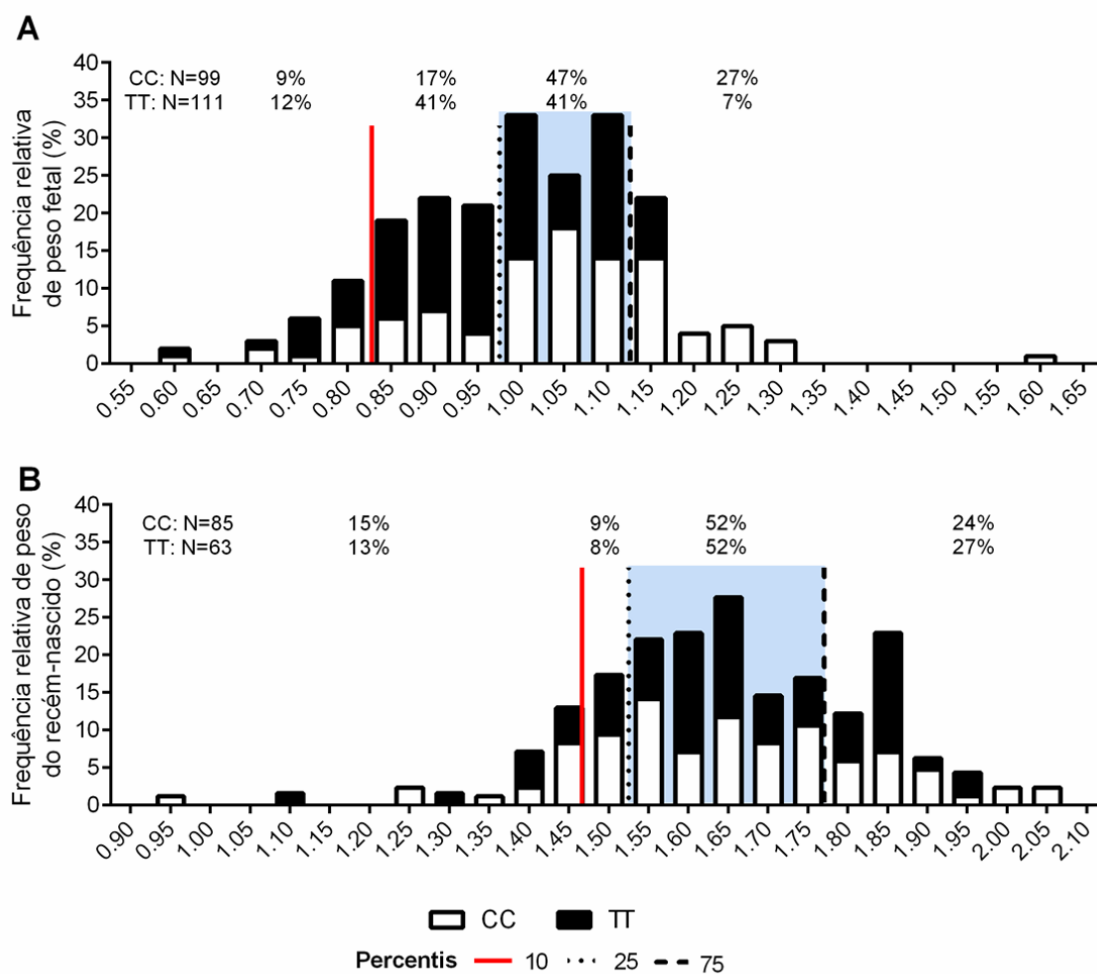


Figura 8: Frequência relativa do peso fetal no DG 17.5 (A) e do peso ao nascimento (B) da prole cujas mães foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. Colunas brancas e pretas representam os indivíduos CC e TT, respectivamente. As linhas vermelhas, pontilhadas e tracejadas representam os 10^o, 25^o e 75^o percentis de peso, respectivamente. O intervalo entre os 25^o e 75^o percentis é destacado pelo sombreamento azul e representa o peso ideal determinado pelo grupo CC. A quantidade total (N) de indivíduos por grupo e o respectivo percentual (%) para cada intervalo de percentil são apresentados. Análise estatística: teste qui-quadrado com o teste exato de Fisher.

5.5. ADAPTAÇÕES PLACENTÁRIAS À DIETA CRÔNICA DE BAIXO TEOR PROTEICO ASSEGURAM PARÂMETROS MORFOLÓGICOS ADEQUADOS DE TROCAS MATERNO-FETAIS

A avaliação de parâmetros morfológicos relacionados à formação da placenta nos períodos embrionário (DG7.5) e fetal tardio (DG17.5), demonstrou que apenas parâmetros avaliados no período fetal tardio foram afetados pela

carência crônica de proteínas. No período embrionário, a relação área cone ectoplacentário (CEP): sítio bem como a relação CEP: embrião não foram afetadas pela carência crônica de proteína na dieta (**Tab. 3**). Em se tratando do período fetal, tanto o peso quanto o tamanho placentário no grupo TT foram menores em comparação ao grupo CC ($P < 0,01$, **Tab. 3**). Contudo, a proporção das camadas placentárias, a eficiência placentária, a proporção volumétrica de componentes do labirintotrofoblasto ou a espessura da membrana interheme não foram afetados pelo consumo crônica de baixo teor proteico ($P > 0,05$, **Tab. 2**).

Tabela 3: Parâmetros morfológicos de cones ectoplacentários (DG7.5 – período embrionário) e placentas (DG 17.5 – período fetal tardio) após consumo materno crônico (TT) ou não (CC) de dieta hipoproteica.

Parâmetros morfológicos	CC	SEM	TT	SEM	P-valor
Período embrionário (DG7.5) – prévio ao desenvolvimento placentário					
N	5		6		
Relação CEP:sítio	0,65 ^a	0,11	0,39 ^a	0,16	NS
Relação CEP:embrião	29,5 ^a	8,40	21,6 ^a	4,70	NS
Período fetal (DG17.5) – placenta altamente funcional					
N	99		111		
Peso da placenta (g)	0,22 ^a	0,005	0,19 ^b	0,005	<0,01
Tamanho da placenta (mm)	10,60 ^a	0,13	9,60 ^b	0,14	<0,01
Eficiência placentária	4,80 ^a	0,12	5,12 ^a	0,12	NS
Proporção das camadas placentárias (%)					
<i>Decídua basalis</i>	8,75 ^a		11,29 ^a		NS
Zona juncional	22,91 ^a		20,08 ^a		NS
Labirintotrofoblasto	64,39 ^a		64,66 ^a		NS
Placa coriônica	3,95 ^a		3,97 ^a		NS
Proporção volumétrica de componentes do labirintotrofoblasto (%)					
N	5 ^a		5 ^a		
Sinusoides maternos	29 ^a		39 ^a		NS
Membrana interheme	51 ^a		47 ^a		NS
Vasos fetais	20 ^a		14 ^a		NS
Espessura da membrana interheme	1,92 ^a	0,08	1,92 ^a	0,09	NS

^{a,b} Médias com diferentes sobrescritos na mesma linha diferem ($P < 0,05$); NS: não significativo. Análise estatística: teste t de Student.

A responsividade a Ki67, bem como a identificação de núcleos com DNA fragmentado nas placentas de fêmeas CC e TT estão representadas nas **Figuras 9 e 10**, respectivamente. Os percentuais de células em proliferação ou apresentando fragmentação de DNA nas camadas placentárias de zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica (**Fig. 11-A**) não foram alterados

pela desnutrição proteica crônica (**Fig. 11-Be C**, respectivamente), sugerindo manutenção na homeostase placentária por meio de adequado *turnover* celular.

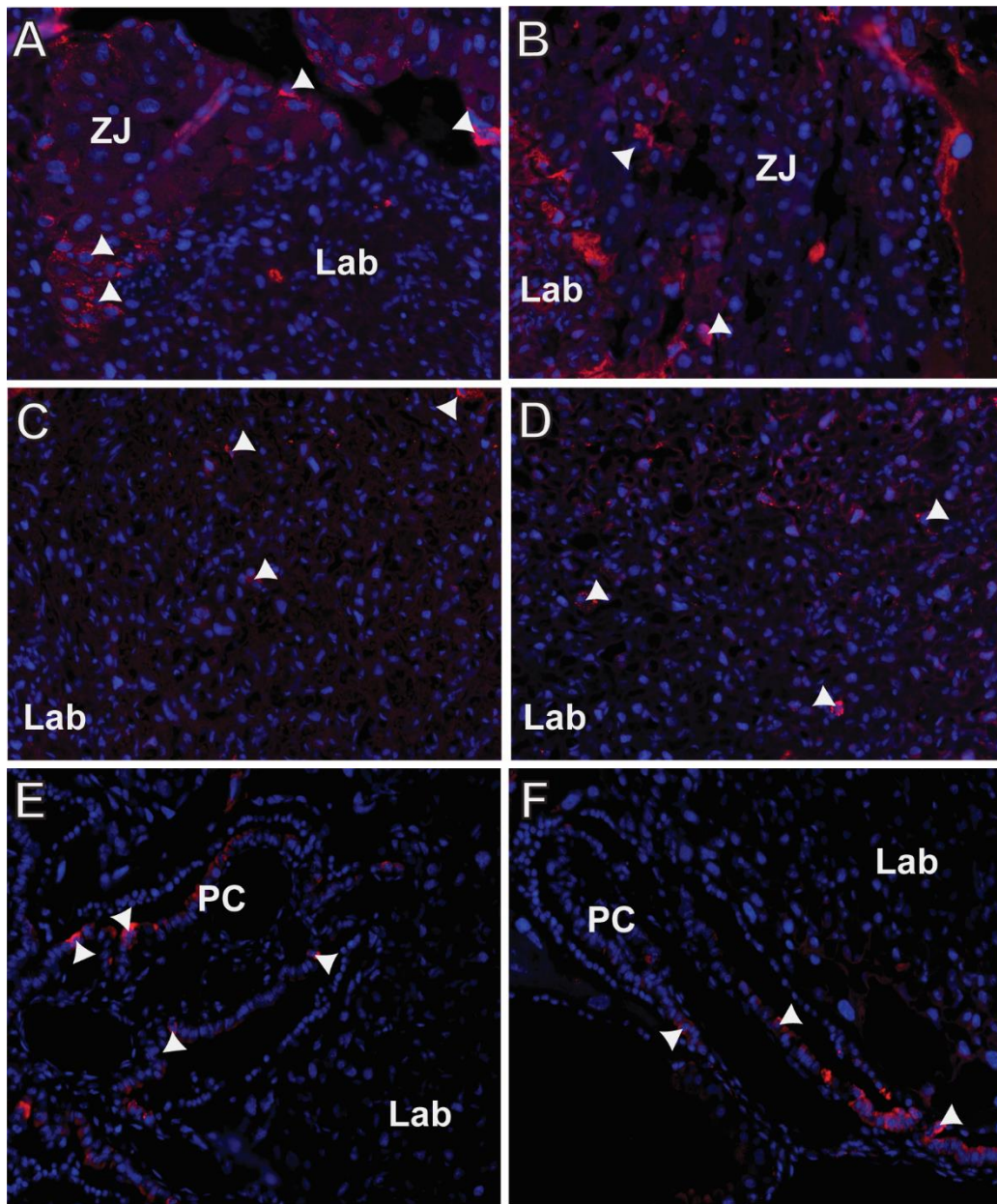


Figura 9: Identificação via imunofluorescência de células Ki67 positivas nas camadas placentárias de zona juncional (A-B), labirintotrofoblasto (C-D) e placa coriônica (E-F) em fêmeas submetidas (TT: B;D;F) ou não (CC: A;C;E) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. Cabeças de seta indicam células Ki67 positivas. ZJ: Zona Juncional; Lab: Labirintotrofoblasto; PC: Placa Coriônica. Aumento: 20x.

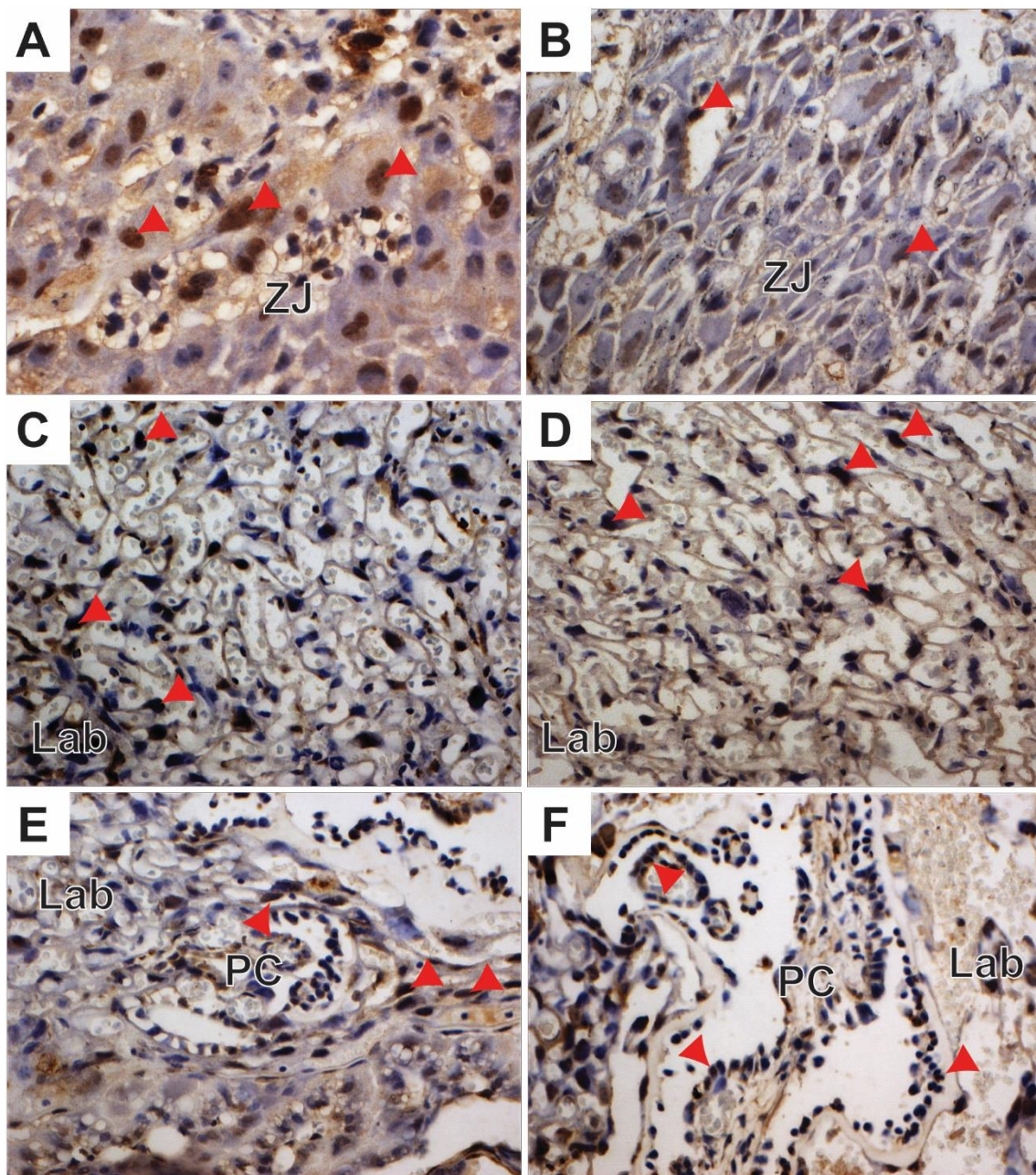


Figura 10: Identificação via imunohistoquímica com técnica de TUNEL de células cujo DNA está fragmentado nas camadas placentárias de zona juncional (A-B), labirintotrofoblasto (C-D) e placa coriônica (E-F) em fêmeas submetidas (TT: B;D;F) ou não (CC: A;C;E) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. Cabeças de seta indicam células TUNEL positivas. ZJ: Zona Juncional; Lab: Labirintotrofoblasto; PC: Placa Coriônica. Aumento: 80x.

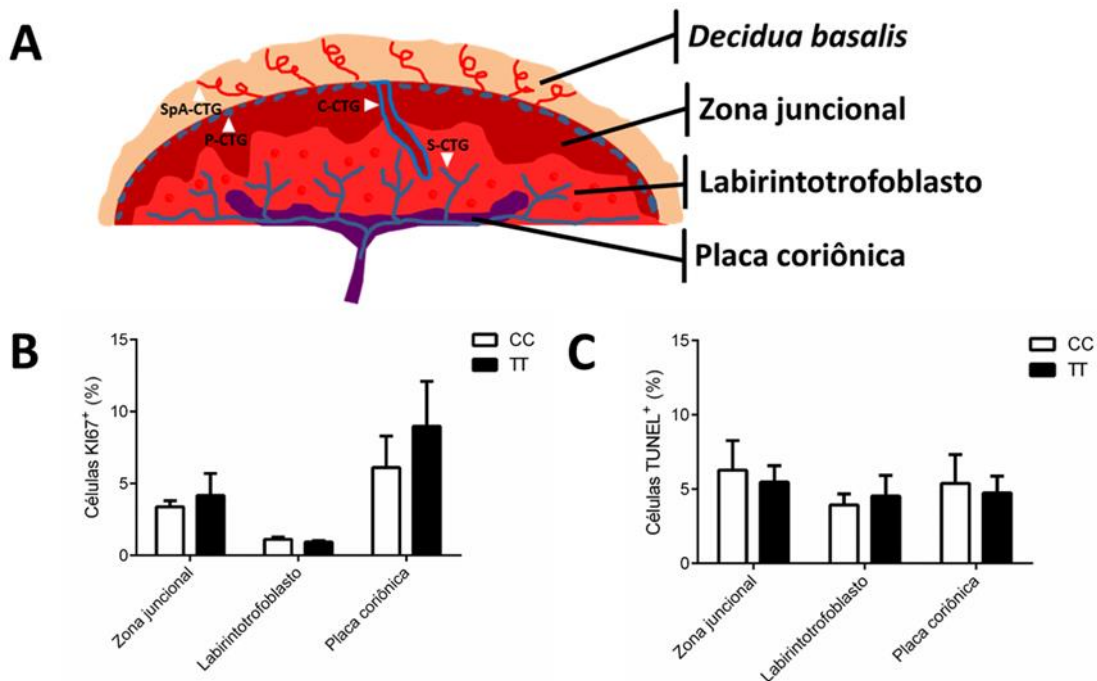


Figura 11: Quantificação dos índices de proliferação e morte celular na placenta de camundongos submetidos (TT; barra preta) ou não (CC; barra branca) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. **(A):** caracterização das camadas de decídua basal (*Decidua basalis*), zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica da placenta de camundongos; **(B e C):** percentual de células Ki67 ou TUNEL positivas nas diferentes camadas placentárias. Análise estatística: teste t de Student.

Adicionalmente, na zona juncional, foi observada responsividade à proteína Lc3, principalmente nas células de glicogênio, assim como no labirintotrofoblasto em ambos os grupos experimentais CC e TT (**Fig. 12A-A' e B-B'**, respectivamente). Posteriormente, a proteína Lc3II, a isoforma proteica de Lc3 característica do processo de autofagia em curso, foi avaliada por *western blotting* (**Fig. 12C**) e demonstrou similaridade de expressão nos grupos experimentais CC e TT, evidenciando que a autofagia não é afetada pela carência de proteínas em camundongos heterogênicos ($P > 0.05$, **Fig. 12C'**). Corroborando esses achados, a expressão da proteína Bcl-2 na placenta, um regulador de morte celular e autofagia, também se mostrou predominantemente presente nas células de glicogênio e no labirintotrofoblasto nas placentas CC e TT (**Figs. 13A-A' e 13B-B'**, respectivamente), mas não houve alteração na área positiva para Bcl2 na imunomarcação das camadas placentárias de zona juncional (**Fig. 13C**) e labirintotrofoblasto (**Fig. 13D**) ($P > 0.05$).

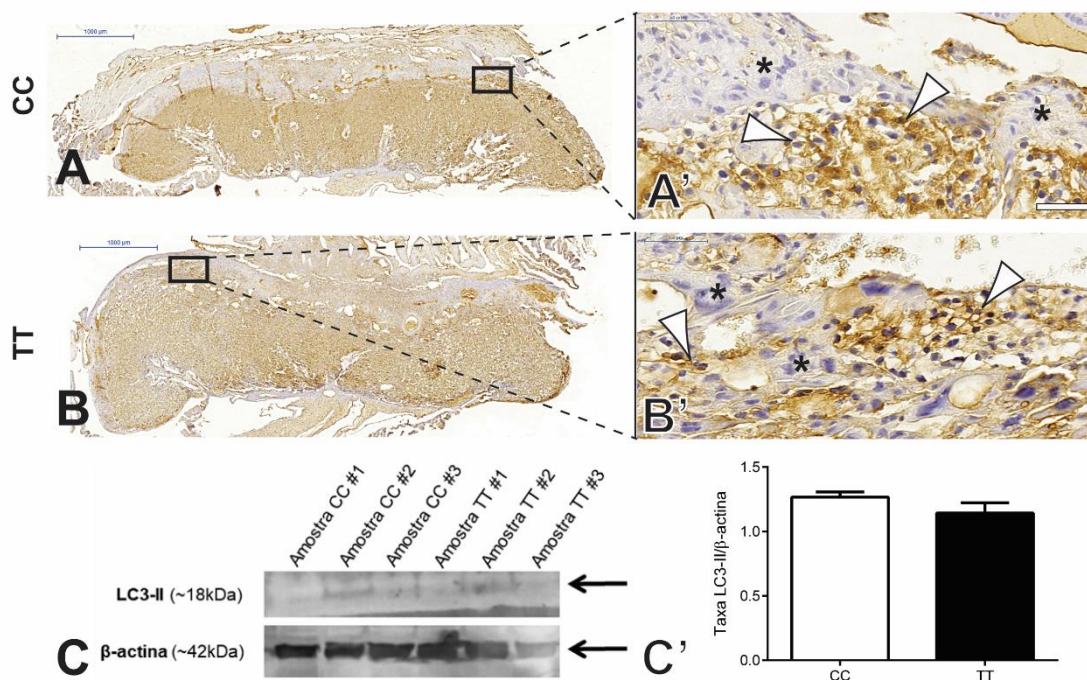


Figura 12: Avaliação da autofagia em placentas cujas fêmeas foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. (A-B): visão panorâmica da placenta demonstrando responsividade imunohistoquímica à proteína Lc3 nas camadas placentárias de zona juncional e labirintotrofoblasto; (A'-B'): caracterização dos tipos celulares positivos (células de glicogênio – cabeça de seta) ou negativos (células endócrinas – asterisco) para a proteína Lc3 na zona juncional; (C): *western blotting* para identificação da isoforma proteica Lc3-II e β-actina em amostras CC e TT; (C'): avaliação da relação Lc3-II/β-actina. Análise estatística: teste t de Student.

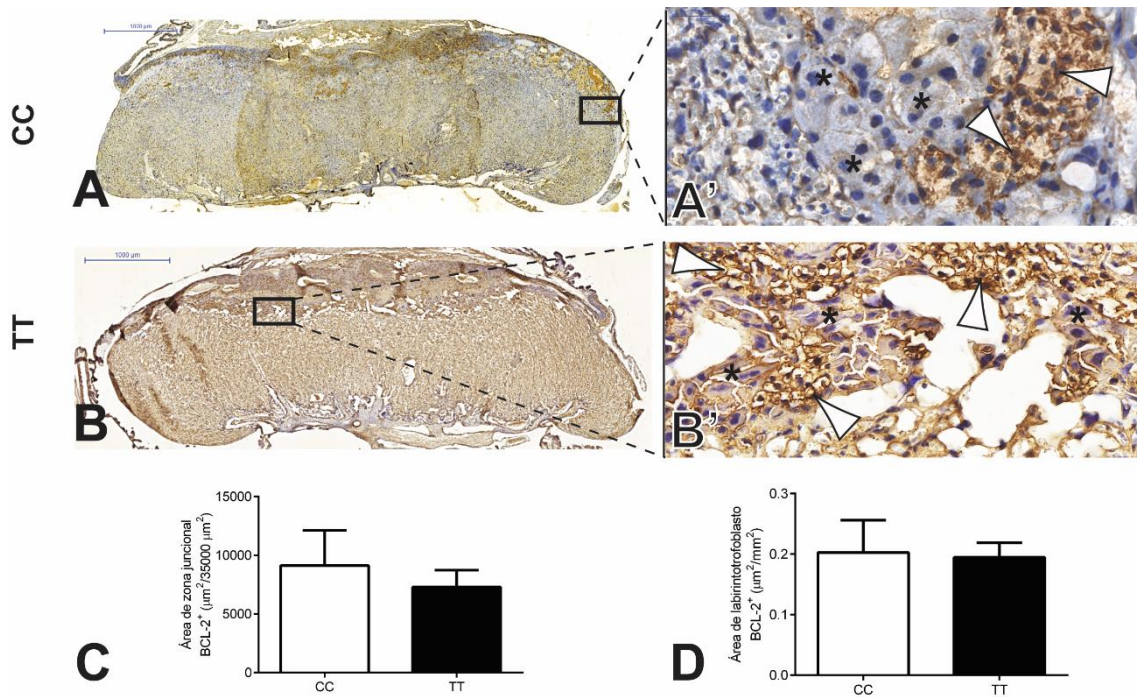


Figura 13: Avaliação da regulação da autofagia e morte celular pela proteína Bcl-2 em placentas cujas fêmeas foram submetidas (TT) ou não (CC) ao consumo crônico de dieta hipoproteica. (A-B): visão panorâmica da placenta demonstrando responsividade imunohistoquímica à proteína Bcl-2 nas camadas placentárias de zona juncional e labirintotrofoblasto; (A'-B'): caracterização dos tipos celulares positivos (células de glicogênio – cabeça de seta) ou negativos (células endócrinas – asterisco) para a proteína Bcl-2 na zona juncional; (C e D): avaliação da área Bcl-2 positiva nas camadas de zona juncional (C) e labirintotrofoblasto (D). Análise estatística: teste t de Student.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, a fertilidade e os aspectos morfológicos placentários relacionados à nutrição embrionária e fetal foram avaliados em fêmeas de camundongos heterogênicos submetidas à má nutrição proteica crônica. Foi demonstrado que, embora a má nutrição proteica não tenha alterado a duração do ciclo estral das fêmeas, o desenvolvimento de folículos secundários foi afetado. Adicionalmente, a má nutrição proteica crônica causou prejuízos ao crescimento placentário e fetal. Vale salientar que mesmo havendo comprometimento no crescimento, a histologia placentária, suas taxas de proliferação e morte celular bem como os processos de autofagia intracelular foram preservados, assegurando um adequado peso da prole ao nascimento.

Durante a indução da má nutrição proteica crônica em camundongos heterogênicos, não houve alteração no padrão de consumo de ração ou peso corporal em fêmeas não-gestantes, nem prejuízos para a taxa de prenhez. Contudo, a foliculogênese foi alterada de acordo com o período de gestação, de tal forma que no período embrionário (DG7.5), oócitos secundário e terciário em ovários de fêmeas TT foram maiores, e no período fetal (DG17.5) folículos secundários e seus oócitos apresentaram tamanho reduzido. Diante disso, é plausível interpretar que em função de maior exigência nutricional os nutrientes seriam direcionados aos fetos, preferencialmente.

Para explicar estas alterações de crescimento dos oócitos e folículos, os receptores dos fatores de crescimento IGF1 e VEGF2 foram avaliados. Embora não tenha havido alteração na área positiva para o receptor de VEGF2 na teca, as tendências estatísticas observadas para aumento de IGF1R em folículos primário e secundário no grupo TT no DG7.5 são coerentes com o maior diâmetro dos oócitos no mesmo período. Além disso, o menor diâmetro de oócitos e folículos secundários no DG17.5 pode ser explicado por sua menor área positiva para IGF1R. Estas alterações na área de expressão de IGF1R podem explicar as alterações de crescimento sofridas pelos oócitos e folículos ovarianos, pois segundo Baumgarten et al. (2017) o receptor de IGF1 nas células

da granulosa é essencial para a sobrevivência folicular e fertilidade em camundongos.

Estes achados sustentam que folículos ovarianos de camundongos heterogênicos são capazes de manter seu crescimento, mesmo quando a fêmea é submetida à má nutrição proteica crônica, caso não haja uma competição mais intensificada por nutrientes como imposto pelo feto durante o período tardio da gestação. Além disso, este trabalho mostra aspectos histomorfométricos da foliculogênese consistentes com trabalhos demonstrando que alterações do gameta feminino oriundas da má nutrição materna (Banik et al., 2017) ocasionam alterações epigenéticas na prole, pois é compreensível que o tamanho do oócito e do folículo que os nutre são fatores associados à qualidade do oócito e seu material genético (Ashworth et al., 2009).

Em se tratando do período gestacional, as consequências maternas da má nutrição proteica permaneceram indetectáveis quando a interface materno-fetal foi avaliada no período embrionário, devido à baixa demanda proteica exercida pelo embrião. Contudo, torna-se uma condição agressiva ao longo do percurso gestacional, uma vez que camundongos gestantes sob restrição de proteínas não assimilaram quantidade adequada de proteína no período fetal tardio. Isto refletiu em menor ganho de peso materno durante a gestação e incapacidade de ganho de peso fetal demonstrada através da avaliação dos percentis de peso, embora tenha havido maior ingestão de ração durante o mesmo período gestacional.

Esta inabilidade em ganhar peso durante a gestação é um cenário nutricional perigoso que nos direcionou a confirmar um ambiente intrauterino desfavorável para o desenvolvimento fetal. De fato, como proposto por Díaz et al. (2014), a placenta reconhece o estado nutricional materno, e este foi evidenciado pelas respostas placentárias no grupo tratado devido à redução no tamanho e peso placentários e preservação das proporções das camadas placentárias, dos índices de proliferação e morte celular na zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica. Além disso, uma vez que a proporção de sinusoides maternos, membrana interheme e vasos fetais no labirinto, assim

como a espessura da membrana interheme não foram afetadas pela má nutrição proteica materna, conclui-se que as placentas de gestantes sob má nutrição proteica são capazes de preservar aspectos morfológicos chave relacionados à nutrição fetal, pelo menos em camundongos heterogênicos.

Embora a morfologia das principais estruturas histológicas placentárias relacionadas à eficiência do transporte de nutrientes tenha sido preservada em gestações cuja dieta materna continha baixo teor proteico, no DG17.5 foram observadas evidências de deficiências na nutrição fetal, já que fetos oriundos destas gestações não atingiram seu pleno potencial de crescimento. Ao se comparar o peso médio dos fetos entre os grupos experimentais, não foram observadas diferenças. Isto é compreensível pois cada animal em uma população heterogênicamente genética é geneticamente único (Gatti et al., 2014) apresentando diferentes capacidades genéticas intrínsecas. Contudo, a prevalência de peso fetal entre os percentis 10 e 25 e a redução simultânea da proporção de fetos acima do percentil 75 no grupo TT demonstrou a inabilidade fetal em atingir seu potencial de ganho de peso durante a má nutrição proteica crônica.

De forma interessante, peso e tamanho dos fetos no grupo TT foram recuperados entre o período fetal tardio e o nascimento. Tal recuperação poderia ser explicada por duas estratégias: a placenta promoveu um incremento nos transportadores de nutrientes placentários e/ou houve incremento das reservas corporais do feto. No entanto, mesmo havendo recuperação do crescimento fetal, o peso relativo do fígado permaneceu menor. Portanto, distúrbios na organogênese podem ser resultantes da desnutrição proteica crônica gestacional e futuras perdas podem ter origem nesse momento.

Neste trabalho, embora manifestações de prejuízos corporais discutidas previamente tenham sido observadas durante a avaliação fetal, seria equivocado diagnosticar o indivíduo como pequeno para a idade gestacional (PIG) ou ainda com restrição intrauterina de crescimento (RIUC). Enquanto ambos os diagnósticos exigem peso inferior ao percentil 10, o diagnóstico de que o indivíduo foi acometido pela RIUC é dado apenas ao recém-nascido e, em caso

de confirmação, ela impactará gravemente na saúde do indivíduo ao longo de toda sua vida pós-natal (Sharma et al., 2016).

Acerca da recuperação do peso observada em animais recém-nascidos, recentemente Appel et al. (2018) sugeriram uma recuperação de crescimento intrauterina dirigida pela glicose em um modelo de camundongos obesos, que foi semelhante aos resultados obtidos neste estudo. Nesse sentido, a avaliação da autofagia na placenta demonstrou que, na zona juncional, a célula de glicogênio (um reservatório de glicose) assume uma resposta celular específica para Lc3 e Bcl2 simultaneamente, contudo seu padrão de expressão não foi afetado pela má nutrição proteica materna.

É interessante ressaltar que uma redução nas células de glicogênio associada a um aumento na camada de labirintotrofoblasto foi reportado em placentas de ratas nos DG 17 e 19 após exposição à restrição proteica (Rebelato et al., 2016). Estes achados foram obtidos após o consumo de uma dieta contendo 6% de proteína (uma restrição proteica severa) durante a gestação (do DG 1 até o DG 19) em ratas. É importante enfatizar que a biologia das células de glicogênio, incluindo sua origem e características funcionais na placenta necessita de melhor compreensão (Coan et al., 2006). Nesse sentido, é plausível interpretar que este tipo celular pode participar ativamente durante a recuperação de crescimento intrauterino proposta por Appel e colaboradores (2018).

No presente estudo, a má nutrição proteica crônica foi estabelecida antes da gestação (duas semanas consumindo dieta com 8% de proteína) e continuou ao longo da gestação em camundongos. Portanto, camundongos de linhagem heterogênea conseguiram desenvolver estratégias de adaptação morfológica placentárias (preservação da proporção das camadas placentárias e equilíbrio entre proliferação e morte celular assim como a autofagia), objetivando o nascimento de indivíduos com peso normal.

A respeito do recém-nascido, embora peso e tamanho no grupo tratado foram recuperados, o peso do fígado foi comprometido. Assim, embora o modelo de camundongo aqui utilizado seja uma linhagem heterogênea e carregue o

vigor híbrido, tal genética não foi resistente a esta deficiência nutricional durante a gestação. Portanto, trabalhos futuros são necessários para avaliar as consequências deste prejuízo de crescimento sobre o estabelecimento de doenças crônicas do adulto relacionadas a este órgão. Além disso, pode-se inferir que o peso ao nascimento não seria um parâmetro adequado para prever a saúde do indivíduo, em se considerando que foi ou não exposto a insultos durante a gestação.

7. CONCLUSÃO

O consumo crônico de dieta hipoproteica por camundongos fêmeas de linhagem heterogênica não prejudica sua fertilidade, mas compromete a foliculogênese perceptível pela alteração do tamanho folicular e do oócito. Tais achados reforçam a avaliação histomorfométrica como um viés de investigação científica que precisa ser parte integrante da avaliação reprodutiva no campo da DOHaD.

Quando gestante, embora a carência crônica de proteínas não afete as características histomorfométricas de sítios de desenvolvimento embrionário dada a menor exigência nutricional do embrião, no período fetal tardio onde a demanda nutricional do feto é maior, tal carência de proteínas impossibilita o pleno crescimento da placenta que, mesmo promovendo estratégias de manutenção do seu desenvolvimento e morfologia, culmina no comprometimento do crescimento fetal.

Este trabalho demonstra, portanto, que embora a placenta de camundongos heterogênicos apresente redução em tamanho e peso devido à má nutrição proteica materna, ela preserva seus aspectos morfológicos e aloca os recursos nutricionais preferencialmente ao feto, assegurando adequados peso e tamanho ao recém-nascido. No entanto, tal recuperação não ocorre no fígado fetal, o que poderia predispor o indivíduo a complicações metabólicas futuras.

REFERÊNCIAS

ACHEN, M. G. et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. **Growth Factors**. v. 15, 69-80, 1997.

ALEXANDER, C. M. et al. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. **Development**. v. 122, 1723-1736, 1996.

ALMEIDA, F. R. C. L. et al. Gestational and postnatal protein deficiency affects postnatal development and histomorphometry of liver, kidneys, and ovaries of female rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** v. 37, 293-300, 2012.

APPEL, S. et al. Potential Role for GSK3 β in Glucose-Driven Intrauterine Catch-Up Growth in Maternal Obesity. **Endocrinology**. v. 160, 377-386, 2018.

ARMITAGE, J. A.; et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? **J. Physiol.** v. 561.2. 355-377, 2004.

ARROYO, J. A.; et al. Increased placental XIAP and caspase 3 is associated with increased placental apoptosis in a baboon model of maternal nutrient reduction (MNR). **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 203 (4), 364e13-364e18, 2010.

ASHKAR, A. A. et al. Interferon γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.** v. 192, 259-269, 2000.

ASHKAR, A. A.; et al. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **The Journal of Immunology**. v. 171, 2937-2944, 2003.

ASHKAR, A. A., CROY, B. A. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol. Reprod.** 61, 493. 1999.

ASHWAORTH, C. J. et al. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 364, 3351-3361, 2009.

BANIK, A. et al. Maternal factors that induce epigenetic changes contribute to neurological disorders in offspring. **Genes**. v. 8, 150, 2017.

BARKER, D. J. P. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **The Lancet**. v. 641, p. 938-941, 1993.

BARKER, D. J. P. et al. Mechanisms of Disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice: Nephrology**. v. 2, 700-707, 2006.

BAUMGARTEN, S. C. et al. IGF1R Expression in Ovarian Granulosa Cells Is Essential for Steroidogenesis, Follicle Survival, and Fertility in Female Mice. **Endocrinology**. v. 158 (7), 2309-2318, 2017.

BEVILACQUA E. M., ABRAHAMSOHN P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Arch. Biol. Med. Exp.** v. 22, p. 107-18, 1989.

CARMELIET, P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature**. v. 7, 575-583, 2001.

CHIARINI-GARCIA, H. et al. **Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model**. In: CHIARINI-GARCIA, H.; MELO, R. C. N. Light Microscopy: Methods and Protocols. Humana Press: Totowa, New Jersey. p. 3-18. 2011.

COAN, P. M. et al. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. **Biology of Reproduction**. v. 70, 1806-1813, 2004.

COAN, P. M. et al. Ultrastructural changes in the interhemal membrane and junctional zone of the murine chorioallantoic placenta across gestation. **J. Anat.** v. 207, 783-796, 2005.

Coan, P. M. et al. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. **Dev. Dyn.** v. 235, 3280-3294, 2006.

COAN, P. M. et al. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. **J. Physiol.** v. 588(3), p. 527-538, 2010.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

CROSS, J. C. et al. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**. v. 266, 1508-1518, 1994.

CROSS, J. C. et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 187, 207-212, 2002.

CROY, B. A. et al. Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 19, 149-166, 1991.

- CUYLEN, S. et al. Ki-67 acts as a biological surfactante to disperse mitotic chromosomes. **Nature**. v. 535, 308-312, 2016.
- DESAI, M.; ROSS, M. G. Fetal Programming of Adipose Tissue: Effects of IUGR and Maternal Obesity/High Fat Diet. **Semin. Reprod. Med.** v. 29(3), 237-245, 2011.
- DÍAZ, P. et al. The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation. **Biology of Reproduction**. v. 91(4), 1-10, 2014.
- ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **Am. J. Anat.** v. 116, p. 29-68, 1965.
- FAN, Y.-J. et al. The cellular decision between apoptosis and autophagy. **Chinese Journal of Cancer**. v. 32, 121-129, 2013.
- FOREMAN, B. P. D.; SCHMITT, M. The reproductive tract of the male spiny mouse (*Acomys cahirinus*) and coagulation studies with other species. **J. Reprod. Fert.** v. 57, 183-188, 1979.
- Gao, H. et al. Gestational protein restriction affects trophoblast differentiation. **Front. Biosci.** v. 5, 591-601, 2013.
- FLESHER, M. **Vitamin B12**. GI Society – Canadian Society of Intestinal Research. Jan/Fev 2004. Disponível em: <<https://badgut.org/information-centre/health-nutrition/vitamin-b12/>>. Acesso em: 22 fev. 2019.
- GATTI, D. M. et al. Quantitative Trait Locus Mapping Methods for Diversity Outbred Mice. **Multiparental Populations**. v. 4, 1623-1633, 2014.
- GEORGIADES, P. et al. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. **Placenta**. v. 23, 3-19, 2002.
- GEVA, E.; JAFFE, R. B. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. **Obstet. Gynecol. Surv.** v. 55 (8), 511-519, 2000.
- GHEORGHE, C. P. et al. Placental gene expression responses to maternal protein restriction in the mouse. **Placenta**. v. 30(5), 411-417, 2009.
- GONZALEZ, P. N. et al. Chronic protein restriction in mice impacts placental function and maternal body weight before fetal growth. **Plos One**. v. 11, 1-18, 2016.
- GOTTLIEB, M. G. V. et al. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Scientia Medica**. v. 18(1), p. 31-38, 2008.

- GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction & Fertility**. v. 81, 433-442, 1987.
- HALE, A. N. et al. Autophagy Regulation and role in development. **Autophagy**. v. 9(7), 951-972, 2013.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**. v. 35, p. 595-601, 1992.
- HARVER, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2012.
- HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. **Annu. Ver. Genet.** v. 43, 67-93, 2009.
- HOFFMAN, L. H.; WOODING, F. B. P. Giant and binucleate cells of mammals. **J. Exp. Zool.** v. 266, p. 559-577, 1993.
- HU, D; CROSS, J. C. Developmental and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. **Developmental Biology**. v. 54, 341-354, 2010.
- HUNG, T. H. et al. Increased Autophagy in Placentas of Intrauterine Growth-Restricted Pregnancies. **PLoS ONE**. v. 7, 1-15, 2012.
- HUNT, J. S. et al. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy. **Biology of Reproduction**. v. 57, p. 827-836, 1997.
- ITO, T. et al. Maternal undernutrition with vaginal inflammation impairs the neonatal oligodendrogenesis in mice. **Tohoku J. Exp. Med.** v. 223, p. 215-222, 2011.
- JACKSON, M. R. et al. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. **Placenta**. v. 15, 341-353, 1994.
- KAMESHIMA, S. et al. Eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) kinase/eEF2 plays protective roles against glucose deprivation-induced cell death in H9c2 cardiomyoblasts. **Apoptosis**. v. 24, 359-368, 2019.
- KANAI-AZUMA, M.; et al. Giant-cell transformation of trophoblast cells in mice. **Endocrine Journal**. v. 41, 33-41, 1994.
- KASSAN, A. et al. Caveolin-3 plays a critical role in autophagy after ischemia-reperfusion. **Cell Physiology**. v. 311(6), C854-C865, 2016.

KISERUD, T. et al. The World Health Organization Fetal Growth Charts: A Multinational Longitudinal Study of Ultrasound Biometric Measurements and Estimated Fetal Weight. **PLoS Medicine**. v. 14(1), 1-36, 2017.

KLIONSKY, D. J. et al. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. **Autophagy**. v. 10(4), 549-551, 2014.

KURJAK, A. et al. Ultrasonic recognition of two types of growth retardation by measurement of four fetal dimensions. **J. Perinat. Med.** v. 6, p. 102-108, 1978.

LASH, G. E. et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **Journal of Leukocyte Biology**. v.80, 572-580, 2006.

LEHNINGER, T. M. et al. **Princípios de Bioquímica**. 6ª ed. Artmed, 2014.

LIU, X. et al. Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.** v. 7(6), 3101-3111, 2014.

LOPES, G. P. et al. Population estimate and morphometry of ovarian preantral follicles from three recently recognized squirrel monkey species: a comparative study. **Zygote**. v. 25, 279-287, 2017.

LUTTUN, A. et al. Placental Growth Factor (PlGF) and Its Receptor Flt-1 (VEGFR-1). **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 979, 80-93, 2002.

MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. **Biochem. Soc. Trans.** v. 34, 779-782, 2006.

MATSUDA, F. et al. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. **Journal of Reproduction and Development**. v. 58, 44-50, 2012.

MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sflt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J. Clin. Invest.**, v.111, 649-658, 2003.

MCVEY, A. W. **Reproductive Parameters of Common, Commercially Available Mouse Strains**. In: CROY, B. A. et al. The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. Elsevier. 2014.

CARVALHO, H. F. et al. **A célula**. 2ª ed. Barueri: Manole, 2007.

MELO, R. C. N. **Células e Microscopia: princípios e práticas**. 2ª ed. Barueri, SP: Minha Editora, 2018.

MODI, D. N. et al. Endometrial biology during trophoblast invasion. **Frontiers in Bioscience**. v. S4, 1151-1171, 2012.

MONTENEGRO, C. A. B.; FILHO, J. R. **Rezende obstetrícia fundamental**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

MOORE, K. L. et al. **Embriologia Clínica**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MUÑOS, G.; BONGIORNI-MALAVÉ, I. Influence of dietary protein restriction on ovulation, fertilization rates and pre-implantation embryonic development in mice. **J. Exp. Zool.** v. 210, 253-257, 1979.

MÜNTENER, M.; HSU, Y. C. Development of trophoblast and placenta in the mouse. **Acta Anat.** v. 98, 241-252, 1977.

OH, A.-Y.; ROH, C.-R. Autophagy in the placenta. **Obstet. Gynecol. Sci.** v. 60(3), 241-259, 2017.

PAFFARO-JR, V. A.; et al. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**. v. 24, 479-488, 2003.

Pang, S. C. et al. **The Cycling and pregnant mouse: gross anatomy**. In: Croy BA, Yamada AT, DeMayo FJ et al (ed) *The guide to investigation of mouse pregnancy*, Elsevier, San Diego, 3-19, 2014.

PAWLAK, R. To vegan or not to vegan when pregnant, lactating or feeding young children. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 71, 1259-1262, 2017.

PENNISI, D. J. et al. Crim1 has an essential role in glycogen trophoblast cell and sinusoidal-trophoblast giant cell development in the placenta. **Placenta**. v. 33, 175-182, 2012.

PÉREZ-PÉREZ, A. et al. Leptin protects placental cells from apoptosis induced by acidic stress. **Cell and Tissue Research**. v. 375, 733-742, 2019.

PLAISIER, M. et al. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. **Fertility and Sterility**. v. 88, 176-187, 2007.

Prata, L. O. et al. ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. **Exp. Biol. Med.** v. 242, 8-21, 2017.

REBELATO, H. J. et al. Gestational protein restriction alters cell proliferation in rat placenta. **J. Mol. Hist.** v. 47, 203-211, 2016.

REEVES, P. G. et al. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition.** v. 123, 1939-1951, 1993.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. **Journal of Animal Science.** v. 76, 1671-1681, 1998.

REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the placenta. **Biology of Reproduction.** v. 64, 1033-1040, 2001.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Ross Histologia: texto e atlas.** 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

RUTLAND, C. S. et al. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. **Placenta.** v. 28, 734-742, 2007.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System User's guide: Statistics.** SAS for Windows, Version 8.2. SAS Institute, Inc., Cary, NC. 2001.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the Known and the Unknown. **Journal of Cellular Physiology.** v. 182, 311-322, 2000.

SEAWARD, A. V. C. et al. Interferon gamma contributes to preimplantation embryonic development and to implantation site structure in NOD mice. **Human Reproduction.** v. 25, 2829-2839, 2010.

Sharma, D. et al. Intrauterine growth restriction - part 1. **J. Maternal Fetal Neonatal Medicine.** v. 24, 3977-3987, 2016.

SIMMONS, D. G. et al. Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. **Developmental Biology.** v. 304, 567-578, 2007.

SIMMONS, D. G.; CROSS, J. C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. **Developmental Biology.** v.284, 12-24, 2005.

STENHOUSE, C. et al. Associations between fetal size, sex and both proliferation and apoptosis at the porcine feto-maternal interface. **Placenta.** v. 70, 15-24, 2018.

STEWART, I.; PEEL, S. The differentiation of the decidua and the distribution of metrial gland cells in the pregnant mouse uterus. **Cell. Tiss. Res.** v. 187, 167-179, 1978.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma.** v. 127, 175-186, 2018.

SUTHERLAND, A. Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. **Dev. Biol.** v. 15, 241-251, 2003.

THORBURN, A. Autophagy and disease. **J. Biol. Chem.** v. 293(15), 5425-5430, 2018.

Tuttle, A. H. et al. Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. **Nature Methods.** v. 15, 994-996, 2018.

UNEK, G. et al. Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. **Acta Histochemica.** v. 114, 31-40, 2012.

USLU, B. et al. Quantifying growing versus non-growing ovarian follicles in the mouse. **Journal of Ovarian Research.** v. 10, 1-11, 2017.

VORONINA, E. et al. Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIID subunit TAF4b. **Developmental Biology.** v. 303, 715-726, 2007.

VUORELA, P. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. **Biology of Reproduction.** v. 56, 489-494, 1997.

WAINRIGHT, P.; STEFANESCU, R. Prenatal protein deprivation increases defects of the corpus callosum in BALB/c laboratory mice. **Experimental Neurology.** v. 81, 694-702, 1983.

WANG, H.; DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation clues from mouse models. **Nature.** v. 7, 185-199, 2006.

WANG, Y.; ZHAO, S. **Vascular Biology of the Placenta.** San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.

WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Developmental of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology.** v. 20, 180-193, 2005.

WHITE, E. et al. Autophagy, Metabolism, and Cancer. **Clinical Cancer Research**. v. 21(22), 5037-5046, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Protein and amino acid requirements in human nutrition**: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO technical report series: no. 935). 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience**. World Health Organization, 2016.

YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**. v.407, 242-248, 2000.

YU, D. et al. Gestational exposure to acrylamide inhibits mouse placental development in vivo. **Journal of Hazardous Materials**. v. 367, 160-170, 2019.

ZICHE, M. et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. **Lab. Invest**. v. 76, 517-531, 1997.

ZUCKERMANN, F. A.; HEAD, J. R. Isolation and characterization of trophoblast from murine placenta. **Placenta**. v. 7, 349-364, 1986.

ANEXO I



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 290 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Impacto da desnutrição proteica durante a gestação sobre o desenvolvimento placentário e da prole em camundongos", que tem como responsável Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 05/10/2015. Este certificado espira-se em 05/10/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 290 / 2015, related to the Project entitled "Impact of protein malnutrition during pregnancy on placental and offspring development in mice", under the supervision of Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 05/10/2015. This certificates expires in 05/10/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 05/10/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II

RHOSTER
INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.



DIETA PADRÃO AIN-93G para crescimento, prenhez e lactação

RH19520

INGREDIENTES

Amido de Milho, Caseína Láctea, Amido Dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos), Sacarose, Óleo de Soja, Celulose (Fibra), Mix Mineral AIN-93G (RH9501), Mix Vitamínico AIN-93 (RH9503), L-Cistina, Bitartarato de Colina (41,1% Colina), Tert-Butilidroquinona (TBHQ).

PERFIL NUTRICIONAL

Proteína	20,13%	20,56 kcal%
Carboidrato	60,43%	61,74 kcal%
Lipídios	7,7%	17,70 kcal%
Dieta	3,9 kcal/g	

Referência Bibliográfica: J. Nutr. 123: 1939-1951, 1993

Nível de Garantia por Quilograma do Produto

Umidade (Máx.)	71g	7,00%
Proteína Bruta (Min.)	200g	20,13%
Extrato Etéreo (Máx.)	77g	7,70%
Fibra Bruta (Máx.)	22g	2,18%
Matéria Mineral (Min.)	26g	2,56%
Cálcio (Min./Máx.)	5,8g	0,58%
Fósforo (Min.)	3,3g	0,33%
Sódio	1,8g	0,18%
Potássio	3,1g	0,31%



AMINOÁCIDOS

Proteína Bruta	20%
Alanina	g/kg 4,6
Arginina	g/kg 6,5
Ác. Aspártico	g/kg 12,6
Glicina	g/kg 3,3
Isoleucina	g/kg 8,8
Leucina	g/kg 15,7
Ác. Glutâmico	g/kg 37,0
Lisina	g/kg 13,2
Cistina	g/kg 3,8
Metionina	g/kg 4,5
Fenilalanina	g/kg 9,1
Tirosina	g/kg 9,8
Treonina	g/kg 6,7
Prolina	g/kg 21,0
Valina	g/kg 11,0
Triptofano	g/kg 2,3
Histidina	g/kg 4,3
Serina	g/kg 11,0

Produto sob encomenda

Pedido mínimo de 3kg em pacotes de 1kg

Manter em temperatura de 4°C ou inferior

Validade de 3 meses após data de fabricação ou 5 meses em freezer

Fórmulas especiais para autoclavagem e irradiação

Av. Ministro Antonino Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd. Salete

Araçoiaba da Serra - SP - CEP: 18190-000

(15) 3281.4748 / Fax (15) 3281.3037 / e-mail: rhoster@rhoster.com.br

ANEXO III



Cliente: RHOSTER INDUSTRIA E COMERCIO LTDA - EPP Endereço: AV MINISTRO ANTONINO 1.556 CEP: 18190-000 ARACOIABA DA SERRA SP Fax:15 32814748	Solicitante: SRA. TERESA BARRETTO
---	--

Amostra: Produto: Fornecedor: Data de Coleta: Data de Recebimento na Empresa: Data de Entrada no Empresa: Data de Saída do Laboratório: Data de Encerramento da Amostra:	ITA-4739/2016 DIETA AIN-93G PRÓPRIO 01/02/2016 01/02/2016 10/02/2016 10/02/2016																
Análises	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Resultado 100% Matéria Original</th> <th style="width: 50%;">Resultado 100% Matéria Seca</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">11,37</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1,95*</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,60</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0,21</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">8,40</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">6,82</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2,37</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Resultado 100% Matéria Original	Resultado 100% Matéria Seca	11,37		1,95*		0,60		0,21		8,40		6,82		2,37	
Resultado 100% Matéria Original	Resultado 100% Matéria Seca																
11,37																	
1,95*																	
0,60																	
0,21																	
8,40																	
6,82																	
2,37																	
UMIDADE (%) FIBRA BRUTA (%) CALCIO (%) FÓSFORO (%) PROTEINA BRUTA (%) EXTRATO ETHEREO (%) CINZAS (%)																	

Amostra ITA-4739/2016:	Comentários Obs. do Cliente: Lote: 4895/16 , Data de produção: 11/01/2016. AMOSTRA HIPOPROTEICA 8% RH19561 * ESPERADOS: PB: 8% * VALIDADE: 11/04/2016
---------------------------	--

1-O(s) resultado(s) de análise(s) referem-se exclusivamente à(s) amostra(s) analisada(s), não sendo extensivo(s) a outras amostras, mesmo que sejam semelhantes às descritas neste relatório.
 2-A reprodução deste documento é autorizada somente na íntegra, sendo proibida a reprodução parcial sem autorização formal deste laboratório.
 3-O Labtron é responsável pelo(s) resultado(s) de análise(s) somente sobre a(s) amostra(s) recebida(s); O procedimento de amostragem, coleta e identificação são de responsabilidade do Cliente.

TANIA MARA MACHADO
 SUPERVISORA DE LABORATÓRIO
 CRQ-D4460495

ANEXO IV

RHOSTER
INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.



DIETA HIPOPROTEICA 8% PB

RH19561

Perfil Calórico	%	% kcal
Proteína	8,4	9,05
Carboidrato	69,09	74,42
Gordura	6,82	16,53
kcal/g	3,7	

*Dieta Purificada para Indução de Desnutrição Proteica

*Produzida em Pellet - pacotes de 1kg

*Quantidade mínima 3kg

*Prazo de Entrega: 15 dias

Ingredientes

Caseína Láctea, Amido de Milho, Amido Dextrinizado, Óleo de Soja, Celulose Microcristalina, L-Cistina, Mix Mineral RH9501, Mix Vitamínico RH9503, Bitartrato de Colina, Tert-Butilhidroquinona Sigma-Aldrich.

Mais Informações

Umidade 11,37%; Proteína Bruta 8,40%; Extrato Etéreo 6,82%; Fibra Bruta 1,95%; Cinzas 2,37%; Cálcio 0,6%; Fósforo 0,21%

Modo de Usar: Fornecer com livre acesso.

Prazo de Validade: 3 meses após a data de fabricação

Modo de Conservação: Manter à temperatura de 4°C

RHOSTER INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.

Av. Ministro Antônio Vieira do Amaral, 1556 - Cx.P.46 - Jd. Saleté - Araçolaba da Serra/SP - CEP: 18190-000

Fones: (15) 3281-3037 / (15) 3281-4748 - CNPJ 00.984.204/0001-04 - Inscr. Estadual 178.070.220.114