

1 **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**
2 **CENTRO DE BIOCÊNCIAS**
3 **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**
4

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16 **EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA NOS TESTÍCULOS**
17 **DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO DESMAME**
18 **PRECOCE**
19

20
21
22
23
24 **JOSÉ ANDERSON DA SILVA GOMES**
25

26
27
28
29 **ORIENTADORA: Dra. FERNANDA DAS CHAGAS ANGELO MENDES TENORIO**
30

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42 **RECIFE**
43 **2023**
44

JOSÉ ANDERSON DA SILVA GOMES

**EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA NOS TESTÍCULOS
DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO DESMAME
PRECOCE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia como um dos requisitos para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Dra. Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio

**RECIFE
2023**

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Gomes, José Anderson da Silva

Efeito da melatonina exógena no testículos de ratos Wistar submetidos ao desmame precoce. / José Anderson da Silva Gomes . – 2023.

70 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Desnutrição. 2. Melatonina. 3. Espermatogênese. 4. Reprodução. 5. Aleitamento. I. Tenorio, Fernanda das Chagas Angelo Mendes (Orient.). II. Título.

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-083

JOSÉ ANDERSON DA SILVA GOMES

EFEITO DA MELATONINA EXÓGENA NOS TESTÍCULOS DE RATOS
WISTAR SUBMETIDOS AO DESMAME PRECOCE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia como um dos requisitos para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora:

Dr. Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio
Universidade Federal de Pernambuco

Juliana Pinto de Medeiros
Universidade Federal de Pernambuco

Bruno Mendes Tenorio
Universidade Federal de Pernambuco

Leucio Duarte Vieira Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 10/09/2023

138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178

Dedico este trabalho a todos os amigos e familiares que de alguma forma auxiliaram na finalização dele.

AGRADECIMENTOS

179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226

À Profa. Dra. Fernanda Tenório, minha orientadora nesse projeto, por seu apoio, incentivo e por sua imensa contribuição sem a qual esse trabalho não teria saído do papel. Agradeço imensamente por esse anjo de luz ter entrado em minha vida.

Aos meus pais, Gilvania Carneiro e Carlos André, pessoas que me ensinaram e me motivam diariamente a sempre seguir em frente por maior que sejam as batalhas.

Aos meus amigos Thalia e Geovanna, pelo companheirismo e por me sustentar nas horas mais difíceis.

Aos meus companheiros Maria Luísa Figueira, Jennyfer Martins e Renan Gabriel, que teve essencial importância na parte experimental deste projeto.

Ao Prof. Dr. Bruno Tenório pela disponibilidade e atenção para comigo no ensino de algumas metodologias.

Ao Prof. Dr. Leucio Duarte e Juliana Medeiros pela disponibilidade e parceria no ensino de algumas metodologias.

A veterinária Raquel Feitosa por ter disponibilizado o biotério do Departamento de Farmacologia para manipulação dos animais.

À Pós-doutoranda Ismaela Maria Ferreira de Melo por sempre está à disposição para me receber no laboratório de Histologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia pela oportunidade e fornecer a estrutura para que essa dissertação viesse a se tornar realidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar esse trabalho e tornar ele possível.

A todos, que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268

“A ciência é muito mais que um corpo de conhecimentos. É uma maneira de pensar”
-Carl Sagan

RESUMO

269

270

271 A nutrição adequada no período crítico do desenvolvimento, exerce profundo impacto no
272 amadurecimento das estruturas e funções reprodutivas dos mamíferos. Alterações nesse
273 padrão leva a quadros de desequilíbrio nutricional. Dentre todos os sistemas afetados, o
274 sistema reprodutor pode ser acometido de forma aguda e crônica, levando inclusive a
275 problemas na fertilidade. Nesse contexto, a melatonina entra como um adjuvante da terapia
276 nutricional no tratamento e reversão das complicações decorrentes da desnutrição. Dessa
277 forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade da melatonina como
278 ferramenta na reversão dos danos causados à estrutura testicular. Para isso, foram utilizados
279 ratos Wistar, os quais foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo controle; grupo
280 desmame precoce; grupo desmame precoce tratados com melatonina aplicada na dose de
281 200µg por 100g de peso do animal; grupo desmame precoce tratados com o veículo, formado
282 por etanol e solução salina. A exceção do grupo controle, todos os demais foram desmamados
283 no 16º dia de nascimento. A aferição do peso corporal foi feita semanalmente e a ortotanásia
284 foi feita ao completar 51 dias de nascidos. Os testículos foram pesados e coletados para
285 análise histopatológica, morfométrica, imuno-histoquímica e estatística. Com a finalização do
286 estudo foi possível identificar um aumento na massa corpórea do grupo desmame precoce,
287 bem como alterações estruturais, onde esse grupo apresentou redução no diâmetro e na altura
288 do epitélio dos túbulos seminíferos, além de atrofia, vacuolizações e degeneração de células
289 germinativas; outra observação feita é que o grupo desmame precoce também apresentou uma
290 menor produção de espermatozoides na fase de paquíteno e de células de Sertoli. Em
291 contrapartida, o grupo tratado com melatonina apresentou uma melhora em todos esses
292 parâmetros analisados, isso quando comparado com o grupo controle e desmame precoce. Os
293 resultados da imuno-histoquímica demonstram também que o grupo tratado com a melatonina
294 obteve uma marcação para os receptores do PCNA semelhante ao grupo controle,
295 demonstrando uma maior proliferação celular nesse tecido, o que não foi observado nos
296 outros grupos desmame precoce e desmame precoce tratados com veículo. O que demonstra o
297 papel restaurador da melatonina no tecido testicular.

298

299 **Palavras-chave:** Desnutrição. Melatonina. Espermatogênese. Reprodução. Aleitamento.

300

ABSTRACT

Proper nutrition during the critical period of development has a profound impact on the maturation of the reproductive structures and functions of mammals. Changes in this pattern can lead to nutritional imbalance. Among all affected systems, the reproductive system can be acutely and chronically affected, potentially leading to fertility problems. In this context, melatonin serves as an adjunct to nutritional therapy in the treatment and reversal of complications arising from malnutrition. Therefore, the present study aimed to investigate the activity of melatonin as a tool in reversing testicular damage. For this purpose, Wistar rats were used, which were divided into 4 experimental groups: control group; early weaning group; early weaning group treated with melatonin applied at a dose of 200µg per 100g of the animal's weight; early weaning group treated with the vehicle, composed of ethanol and saline solution. Except for the control group, all others were weaned on the 16th day after birth. Body weight was measured weekly, and euthanasia was performed when the animals reached 51 days of age. The testicles were weighed and collected for histopathological, morphometric, immunohistochemical, and statistical analysis. At the end of the study, it was possible to identify an increase in body mass in the early weaning group, as well as structural alterations, where this group showed a reduction in the diameter and height of the seminiferous tubule epithelium, as well as atrophy, vacuolization, and degeneration of germ cells. Another observation is that the early weaning group also exhibited reduced production of pachytene spermatocytes and Sertoli cells. In contrast, the group treated with melatonin showed improvement in all these analyzed parameters when compared to the control and early weaning groups. The results of immunohistochemistry also demonstrate that the melatonin-treated group had PCNA receptor labeling similar to the control group, indicating greater cell proliferation in this tissue, which was not observed in the other early weaning groups, including those treated with the vehicle. This demonstrates the restorative role of melatonin in testicular tissue.

Key words: Malnutrition. Melatonin. Spermatogenesis. Reproduction. Breastfeeding.

LISTA DE FIGURAS

331

332

333 **Figura 1:** Fotomicrografia do testículo de ratos 51 dias pós-natal. A: controle- túbulos
334 seminíferos (TS), túnica albugínea (seta grossa), espermatogônia (seta longa), espaço
335 intersticial (EI), célula de leydig (estrela), espermatogônia em paquíteno (ponta de seta). B:
336 DP- epitélio germinativo com grande vacuolização (setas). C: DP+V- as setas mostram as
337 células de Leydig no tecido intersticial. D: DP+Mel- túbulos seminíferos com uma menor
338 vacuolização do epitélio seminífero. Aumento 400x. Coloração HE.....58

339

340 **Figura 2:** Imunohistoquímica para proliferação celular nos testículos dos grupos
341 experimentais. A) Quantificação em pixels de imunocoloração. *Médias seguidas de mesma
342 letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis seguido
343 do teste post-hoc de Dunn
344 ($P>0,05$).....59

345

LISTA DE TABELAS

346

347

348 **Tabela 1** – Média (\pm desvio padrão) do IGS dos testículos (g), dos animais dos grupos
349 experimentais e média (\pm desvio padrão) do peso dos animais (g), dos grupos
350 experimentais.....55

351 **Tabela 2** – Média (\pm desvio padrão) dos componentes testiculares dos animais dos grupos
352 experimentais.....55

353 **Tabela 3** – Avaliação histopatológica dos componentes testiculares dos animais dos grupos
354 experimentais.....56

355 LISTA DE ABREVIATURAS

356		
357	DP	Grupo Desmame Precoce
358	DP+MEL	Desmame Precoce Mais Melatonina
359	DP+V	Desmame Precoce Mais Veículo
360	EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
361	FSH	Hormônio Folículo Estimulante
362	GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
363	HHA	Hipotálamo - Hipófise - Adrenal
364	HHG	Hipotálamo - Hipófise - Gônada
365	HHT	Hipotálamo - Hipófise - Tireoide
366	HIOMT	Hidroxiindol-O-metil transferase
367	LH	Hormônio Luteinizante
368	LHRH	Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante
369	MEL	Melatonina
370	NAT	N-acetiltransferase
371	NO	Óxido Nítrico
372	PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
373	TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
374	TRH	Hormônio Liberador de Rotropina
375	SCN	Núcleo Supraquiasmático
376		

SUMÁRIO

377		
378		
379	1 INTRODUÇÃO.....	13
380	2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
381	2.1 ALEITAMENTO MATERNO E SUA IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DO NEONATO.....	15
382	2.2 RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA E PROGRAMAÇÃO FETAL.....	16
383	2.3 CONCEITOS GERAIS DA FISIOLOGIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR DE	
384	RATOS.....	18
385	2.4 RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA E SUA RELAÇÃO NA REPRODUÇÃO MASCULINA.....	21
386	2.5 DESMAME PRECOCE.....	22
387	2.6 DESMAME PRECOCE E SISTEMA REPRODUTOR	24
388	2.7 MELATONINA E GLÂNDULA PINEAL.....	25
389	2.8 MELATONINA E SISTEMA REPRODUTOR.....	29
390		
391	3 OBJETIVOS.....	32
392	3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
393	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
394		
395	4 REFERÊNCIAS.....	33
396		
397	5 ARTIGO 1: Melatonina como possível terapia para reverter danos testiculares causados	
398	pelo desmame precoce: revisão de literatura.....	49
399		
400	6 ARTIGO 2: Can treatment with exogenous melatonin prevent testicular changes caused by	
401	early weaning?	50
402		
403	7 CONCLUSÕES.....	68
404		
405	ANEXOS.....	69
406		
407	ANEXO A – Protocolo de Aprovação de Comitê/Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo	
408	Seres Humanos/ Animais.....	69

409 1. INTRODUÇÃO

410

411

412

413

414

415

416

417

418

A desnutrição infantil é um grave problema de saúde pública e de acordo com dados dos relatórios da UNICEF (United Nations Children's Fund) de 2019, a desnutrição ainda acomete 238,6 milhões de crianças menores de 5 anos no mundo. No Brasil, esses dados são mais significantes nas regiões Norte e Nordeste, tendo as maiores prevalências 18,7% e 13,6% respectivamente. De acordo com relatórios do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) do ministério da saúde, atualmente existem 253 municípios brasileiros com aproximadamente 10% das crianças menores de 5 anos com desnutrição aguda, o que representa um total de 69.267 crianças.

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

A carência nutricional, ou desnutrição, ainda é considerada um alarmante problema de saúde pública, pois os efeitos deletérios decorrentes desse quadro influenciam de forma negativa na dinâmica dos sistemas fisiológicos, principalmente em crianças (DOS SANTOS, 2017). A desnutrição é um distúrbio multifatorial que cursa com o desequilíbrio entre o suprimento de energia, os nutrientes obtidos da dieta e a sua demanda para o organismo, assim, quando um indivíduo apresenta uma deficiência no consumo de micro ou macronutrientes pode se instaurar um quadro de desnutrição. Vários modelos de desnutrição são propostos na literatura (BRONZINO, 1990; PALENCIA, 1996), entre os mais utilizados, encontra-se a restrição alimentar pelo afastamento da mãe durante o período de lactação, o desmame precoce (OLIVEIRA, 2011). A demanda nutricional do lactente é prontamente atendida pelo aleitamento materno exclusivo, e quando este é interrompido subitamente há, consecutivamente, a oferta inadequada de componentes essenciais para o desenvolvimento orgânico (ALVES, 2004).

432

433

434

435

436

437

438

439

Insultos nutricionais ocasionam a produção excessiva de radicais livres e a depleção acentuada de defesas antioxidantes (TOYOKUNI, 2006). Nessas situações, há agressão celular, tecidual e apoptose, que são decorrentes da atividade de compostos como o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), assim como outros radicais de oxigênio, além de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, interleucinas e prostaglandinas (TSANTES, 2006). Esse quadro α -dinâmico causa deficiências no sistema imunológico, aumenta os riscos de desenvolvimento de infecções e eleva a predisposição ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ALBERDA, 2006).

440

441

442

A maioria dos trabalhos que envolvem os efeitos da desnutrição fetal, relacionando o desenvolvimento da prole, é elaborado para a análise do sistema cardiovascular e suas complicações (LANGLEY & JACKSON, 1994; HOET & HANSON, 1999; TORRENS *et al.*,

443 2003; SHERMAN & LANGLEY-EVANS, 2000). No sistema reprodutor a desnutrição pode
444 ocasionar danos teciduais que quando não são solucionados podem cursar com a infertilidade.
445 Isso decorrente de alterações estruturais e funcionais, que levam a alterações hormonais e
446 comprometem todo o funcionamento do sistema (DUDAR & REIPS, 2023).

447 A suplementação com componentes com características antioxidantes, como a
448 melatonina (MEL), pode auxiliar na promoção da saúde e ter um efeito protetor contra os
449 processos oxidativos (BAGANHA, 2018). Isso se deve a atividade de atrasar ou inibir a
450 oxidação de um substrato oxidável, protegendo as células sadias do organismo contra a ação
451 oxidante dos radicais livres. Essa característica pode ser importante para amenizar os efeitos
452 desencadeados pela desnutrição, pois a manifestação destes está relacionada ao processo do
453 desequilíbrio redox.

454 A melatonina (MEL) é uma molécula anfifílica com capacidade de atravessar a
455 barreira hematotesticular e é sintetizada pela glândula pineal (REITER, 2001). Além de
456 modular os ritmos endógenos sincronizados, como o ciclo circadiano e sazonal, também atua
457 como agente antioxidante durante o período neonatal, interferindo nos processos da
458 histogênese (BAYDAS, 2007). A eficiência da função antioxidante da melatonina pode ser
459 devido a sua capacidade quelante de radicais livres e ao estímulo sobre a produção de enzimas
460 antioxidantes (REITER, 2007).

461 Mesmo que o organismo tenha defesa endógena efetiva no combate ao excesso de
462 radicais livres, os antioxidantes obtidos por meio de suplementação exógena são necessários
463 na manutenção da saúde. Sabendo-se que a MEL tem a capacidade de atravessar a barreira
464 hematotesticular, além de possuir influência antioxidante e no desenvolvimento testicular, o
465 presente estudo buscou analisar a hipótese de que a suplementação com melatonina pode ser
466 utilizada como ferramenta para reduzir possíveis danos causados pela desnutrição, decorrente
467 do desmame precoce, no desenvolvimento testicular.

468

469 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

470

471 2.1 ALEITAMENTO MATERNO E SUA IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DO NEONATO

472 O estado de saúde e a susceptibilidade de um indivíduo desenvolver doenças longevas,
473 é determinado logo nos primeiros anos de vida (BALE *et al.*, 2010). Logo após o nascimento,
474 a alimentação através do aleitamento materno é de extrema importância para o
475 desenvolvimento físico e psíquico do neonato (AGOSTI *et al.*, 2017). A dieta rica em
476 compostos nutritivos presente no leite, até os primeiros dois anos de vida, modulam processos
477 de adaptação do metabolismo, causando modificações fisiológicas no organismo, tendo papel
478 crucial na programação e desenvolvimento metabólico, endócrino, imunológico, neural e
479 psicológico (ESTEBAN-CORNEJO *et al.*, 2017; GARTNER *et al.*, 2005; KOLETZKO,
480 2005). Em decorrência de tantos benefícios, a Organização Mundial da Saúde (OMS)
481 recomenda que a alimentação do lactente seja feita exclusivamente pelo leite materno até os
482 seis meses de vida, a partir desse momento; pode-se introduzir alimentos sólidos que tem por
483 função complementar o aleitamento em decorrência da grande demanda energética da criança
484 (WHO, 2020).

485 No Brasil, cerca de 97% das crianças iniciam a amamentação nas primeiras horas de
486 vida (SILVA, R. A. *et al.*, 2015). Ela é uma prática que leva à prevenção de mais de seis
487 milhões de mortes de crianças a cada ano, em todo o mundo (MARINHO, M. S. *et al.*, 2015).
488 Como bem descrito na literatura, o leite materno é o melhor alimento que a mãe pode ofertar
489 para o lactente; tendo como base isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Ministério
490 da Saúde (MS) do Brasil e a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) recomendam a
491 amamentação exclusiva durante os primeiros seis meses de vida, devendo ser complementada
492 até os dois anos (OLIVEIRA, K. M. P. *et al.*, 2011).

493 O leite materno é uma substância ativa que serve não só para a nutrição como para a
494 proteção do recém-nascido, ele garante uma série de benefícios tanto para a mãe como para o
495 lactente. Para a mãe, ele proporciona o rápido emagrecimento pós-parto, reduz as chances do
496 desenvolvimento de câncer de útero e de mama, bem como atua sendo um contraceptivo
497 natural. Já para o neonato, o leite atua como proteção contra doenças infecciosas, alergias,
498 diarreias, redução significativa de morbidades e mortalidades, desnutrição e auxilia no
499 aumento do vínculo de mãe e filho (SILVA, L. M. L. *et al.*, 2018).

500 O leite é uma substância com compostos ativos imunomoduladores, antimicrobianos,
501 anti-inflamatórios e ricamente nutritivo, é constituído por mais de 160 substâncias; sendo as
502 principais: proteínas, lipídios, carboidratos e por células de defesas (macrófagos e linfócitos)

503 (SANTOS, A. A. *et al.* 2016). Ele também apresenta uma diversidade de hormônios como
504 prolactina, melatonina, eritropoetina, gonadotrofinas, tiroxinas e esteroides. Além de fatores
505 biológicos como IgA, Vitamina B12 e lactoferrina (OLIVEIRA, L. H. S. *et al.*, 2019).

506 Cada uma dessas substâncias desempenha um papel importante no desenvolvimento
507 do metabolismo do neonato, por isso, a amamentação se faz tão importante. As proteínas
508 presentes no leite, como a IgA e IgG, participam ativamente da imunidade passiva do recém-
509 nascido e possibilitam a maturação do epitélio gastrointestinal (Santos, M. P. C. *et al.*, 2020).
510 Os lipídios são as principais fontes de energia, participam no metabolismo cerebral e no
511 transporte de vitaminas e hormônios lipossolúveis. Os carboidratos, em especial a Lactose, é
512 responsável pela absorção de cálcio e ferro, colonização intestinal por *Lactobacillus bifidus* e
513 proteção intestinal (OLIVEIRA, L. H. S. *et al.*, 2019). As vitaminas fazem parte do processo
514 de defesa do neonato contra agentes infecciosos como vírus e bactérias e por fim, a
515 lactoferrina que atua no crescimento de vários tipos celulares do sistema imune, bem como
516 estimula a produção de anticorpos na resposta imune humoral (SILVA, D. I. S. *et al.*, 2020;
517 SILVA, D. *et al.*, 2017).

518

519 2.2 RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA E PROGRAMAÇÃO FETAL

520 As primeiras descrições que correlacionaram as condições do ambiente intrauterino e
521 às alterações no desenvolvimento da prole, foram estudos da “origem fetal das doenças da
522 idade adulta” (BARKER, 1995a). Nesses estudos, os autores propõem que alterações do
523 metabolismo, fisiologia e estrutura de um indivíduo em formação; são resultados do estado
524 nutricional e hormonal fetais, que por conseguinte são capazes de levar a doenças
525 metabólicas, cardiovasculares e endócrinas durante a vida adulta (BARKER, 1995b; 2007).

526 Essas alterações podem ocorrer de forma permanente, aplicando-se o conceito que os
527 cientistas denominam de “programação fetal”, esse termo é usado para indicar um processo
528 no qual um estímulo ou uma injúria aplicada em um processo crítico do desenvolvimento
529 intrauterino, pode ser capaz de levar a alterações perduráveis na função e estrutura de órgãos e
530 do metabolismo. (LUCAS, 1991). Consequentemente, o feto irá interagir com o ambiente
531 intrauterino e antevê o meio que irá nascer, estando apto para obter uma vantagem
532 competitiva (GLUCKMAN E HANSON, 2006). Dessa forma se os ambientes pré e pós-natais
533 forem compatíveis, o fenótipo será normal, entretanto, se esses meios forem incompatíveis, a
534 programação fetal irá tornar esse indivíduo inapto, aumentando as chances de que ele venha a
535 desenvolver doenças metabólicas (ARMITAGE *et al.*, 2005; MARTIN-GRONERT E
536 OZANNE, 2010; QASEM *et al.*, 2012).

537 “Hipótese das origens desenvolvimentistas da saúde e doença” é o termo usado
538 atualmente para descrever essa hipótese de que as alterações ambientais intrauterinas são
539 capazes de levar a doenças na idade adulta (JAZWIEC E SLOBODA, 2019)

540 Uma interessante característica da programação fetal é o fato de que as adaptações
541 que o feto sofreu durante o ambiente intrauterino podem ser passadas para suas futuras
542 gerações, mesmo que estas nunca tenham entrado em contato com o fator estressor, um
543 resultado decorrente do que os cientistas chamam de alterações epigenéticas (ZAMBRANO,
544 2009; SEBERT *et al.*, 2011). Os fatores epigenéticos estão correlacionados com a capacidade
545 que o organismo apresenta em si modular diante dos mais variados estímulos, sendo capazes
546 de modificar permanentemente a estrutura e função dos mais variados sistemas e órgãos,
547 apresentando, portanto, um papel significativo no desenvolvimento e sendo essenciais para a
548 programação e expressão dos genes (ROTHHAMMER E BOSSERHOFF, 2007). Os mais
549 diversos processos epigenéticos podem induzir mudanças hereditárias na expressão dos genes
550 sem que tenha havido alteração na sequência do DNA. Assim, o epigenoma pode ser
551 considerado um apontamento de eventos que se acumulam ao longo da vida de um organismo
552 (BIRD E MACLEOD, 2004; GODFREY *et al.*, 2015).

553 Durante a gravidez, o feto em desenvolvimento depende exclusivamente da mãe
554 para suprir suas necessidades nutricionais. Portanto, a nutrição materna e o ambiente
555 intrauterino que esse feto está inserido são capazes de influenciar a saúde fetal e o resultado
556 da gravidez (MCARDLE *et al.*, 2006; LINDSAY *et al.*, 2019). Diversos estudos
557 demonstraram que os componentes e a qualidade da dieta materna, durante períodos críticos
558 do desenvolvimento, podem afetar o desenvolvimento da prole no útero. E que alterações
559 epigenéticas incitadas no início da vida podem levar a alterações permanentemente no
560 fenótipo do organismo adulto, o que o torna suscetível a uma série de doenças como: diabetes,
561 obesidade, doenças renais etc. (MASUYAMA E HIRAMATSU, 2012; JIANG *et al.*, 2014;
562 FLEMING *et al.*, 2015).

563 A maioria dos estudos desenvolvidos acerca da programação fetal resultou de
564 modelos de desnutrição materna e sua atuação na saúde da prole. Os ensaios descritos a partir
565 dos anos 80, passaram a relacionar a restrição nutricional materna, bem como, a restrição
566 proteica, não só com o retardo no crescimento intrauterino, mas, principalmente, com a maior
567 propensão da prole em desenvolver patologias longevas, em particular o diabetes mellitus tipo
568 2, hipertensão e obesidade (IMDAD E BHUTTA, 2012; GRISSOM *et al.*, 2014).

569 No decorrer da gravidez, devido a maior demanda de fontes energéticas por parte do
570 embrião em formação é recomendado o aumento da ingestão de proteínas pela mãe para

571 suprir tanto sua demanda fisiológica, quanto a do feto (JOLLY *et al.*, 2004). O consumo
572 insuficiente de proteínas entre grande parte da população humana, pelos mais diversos
573 motivos, sejam estes culturais ou econômicos, é de preocupação mundial. O que torna o
574 modelo de restrição proteica um dos mais caracterizados e estudados atualmente (FLEMING
575 *et al.*, 2015; SEMBA, 2016; HERRING *et al.*, 2018).

576 Os principais estudos que se tem sobre os efeitos a longo prazo de dietas maternas
577 com baixa concentração de proteína, é sobre a função e estrutura de órgãos específicos, em
578 especial, os tecidos sensíveis à insulina, funções cardíacas, hipertensão, obesidade e funções
579 renais da prole (STOCKER *et al.*, 2005; LE CLAIR *et al.*, 2009; HALES E BARKER, 2013;
580 HERRING *et al.*, 2018).

581 Durante a gravidez a nutrição é um fator crucial capaz de ativar interações
582 fisiológicas entre a mãe e o feto, mediadas por de diversos mecanismos, incluindo a
583 sinalização hormonal, o que pode causar modificações epigenéticas em genes que vão regular
584 os tecidos-alvos desses hormônios. Essas modificações podem alterar a eficiência placentária,
585 o crescimento e o caráter metabólico do conceito, estabelecendo dessa forma as bases para
586 diversas patologias, quando há uma alteração nutricional entre os ambientes pré e pós-natal
587 (Fleming *et al.*, 2015).

588

589 2.3 CONCEITOS GERAIS DA FISIOLOGIA E MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR

590 O sistema reprodutor masculino dos mamíferos, é constituído por testículos,
591 epidídimos, ductos deferentes, uretra, glândulas sexuais acessórias e o órgão copulador (DA
592 SILVA, 2020).

593 Os testículos são divididos em duas partes: tecido intersticial, sendo este responsável
594 pela esteroidogênese, e os túbulos seminíferos, que são responsáveis pela espermatogênese
595 (RODRIGUES & FAVARETTO, 1999). Os túbulos seminíferos, por sua vez, são
596 constituídos pelo tecido peritubular e pelo epitélio seminífero, sendo este formado pelas
597 células germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) e pelas células de
598 Sertoli. A espermatogênese é um processo altamente especializado no qual as células-tronco
599 espermatogoniais irão se diferenciar em células haploides altamente diferenciadas, os
600 espermatozoides (CLERMONT, 1972). O tecido intersticial é a camada de tecido conjuntivo
601 que compõe os espaços entre os túbulos seminíferos; é um tecido altamente vascularizado
602 (com vasos sanguíneos e linfáticos), bem como nervos e células intersticiais ou de Leydig que
603 tem por função a produção de andrógenos, em especial a testosterona, a qual posteriormente
604 pode ser convertida em outros hormônios esteroides (RUSSELL *et al.*, 1990). A função

605 testicular vai ser regulada por uma complexa série de relações entre o eixo hipotálamo, a
606 hipófise e as gônadas, tendo os hormônios testiculares um papel central no controle desse eixo
607 (SOKOL, 1997).

608 São esses hormônios androgênicos que vão manter a constância da espermatogênese
609 no testículo, bem como na maturação dos espermatozoides no epidídimo, além de apresentar
610 influência no desenvolvimento e funções dos órgãos sexuais acessórios masculinos. Estudos
611 comprovaram a presença de receptores androgênicos (RA) nos tecidos do sistema reprodutor
612 masculino e feminino, tanto na espécie humana como em ratos. Através de procedimentos de
613 imunohistoquímica (KIMURA *et al.*, 1993; PELLETIER *et al.*, 2000).

614 Em animais adultos a regulação dos níveis de RA vai ser feitas por hormônios
615 androgênicos nas células de Sertoli (SHAN *et al.*, 1990; ZHU *et al.*, 2000), enquanto nos
616 animais jovens esse papel é desempenhado pelo hormônio folículo estimulante (FSH)
617 (SANBORN *et al.*, 1991; BLOK *et al.*, 1992). (SHAN *et al.*, 1997) Estudos demonstraram
618 que nas células de Leydig ocorre o inverso, os androgênios estimulam os níveis de RA nos
619 animais jovens, e não apresentam efeito nos animais adultos. Através de estudos empregando
620 cultura de células testiculares houve a demonstração de que tanto estrogênios como
621 androgênios podem mediar a expressão dos RNA mensageiros dos seus próprios receptores,
622 além de que os estrogênios podem diminuir a expressão dos RNA mensageiros nos receptores
623 de androgênio (CARDONE *et al.*, 1998; MOTA *et al.*, 2001).

624 Como bem estudado, a restrição alimentar tem o poder de inibir a conservação, bem
625 como o início da capacidade reprodutiva (DESJARDINS *et al.*, 1983; NELSON *et al.*, 1992).
626 Camundongos adultos que foram submetidos à restrição alimentar de 30% durante um
627 período de 8 semanas tiveram uma redução de 42% na concentração de testosterona sérica,
628 além da diminuição de 27% na massa testicular e um aumento expressivo do apoptose, que se
629 julga ser o responsável pela regressão testicular que ocorre em resposta à restrição alimentar
630 (YOUNG *et al.*, 2000).

631 Nos mamíferos em geral, os epidídimos vão ser divididos anatomicamente em três
632 regiões distintas como cabeça (no segmento proximal), o corpo e cauda (REID & CLELAND,
633 1957). Estes três segmentos são subdivididos histologicamente em áreas que são
634 caracterizadas de acordo com a altura do epitélio, bem como, a distribuição e quantidade dos
635 tipos celulares. Seu epitélio pseudoestratificado ciliado possui seis tipos celulares: apicais,
636 claras, halos, estreitas e principais (HERMO & ROBAIRE, 2002). Em estudos já bem
637 embasados, se sabe que é necessário os espermatozoides passar pela região proximal do
638 epidídimo para que ocorra sua maturação espermática (na qual o espermatozoide desenvolve a

639 capacidade de motilidade, reconhecimento e penetração pela zona pelúcida do oócito)
640 (JONES, 1999). Outros estudos já demonstraram que este processo de maturação ocorre pela
641 ação conjunta de proteínas do epidídimo, que vão ser produzidas e secretadas diante do
642 controle dos hormônios andrógenos (ORGEBIN-CRIST & JAHAD, 1978).

643 A vesícula seminal, uma das glândulas sexuais acessórias, é formada por um ducto
644 enovelado muito dilatado. Ela é revestida por um epitélio pseudoestratificado, constituído por
645 dois tipos de células epiteliais: as secretoras e as células basais. A glândula é revestida
646 externamente por uma camada muscular lisa sendo esta constituída por duas lâminas: uma
647 externa, de fibras longitudinais e uma interna, de fibras circulares (HAYWARD *et al.*, 1996a;
648 1996b).

649 A próstata é outra glândula acessória, formada por um conjunto de glândulas
650 tubuloalveolares ramificadas, os quais seus ductos irão desembocar na parte prostática da
651 uretra. O epitélio que reveste este órgão é do tipo colunar simples, sendo formado por células
652 secretoras, neuroendócrinas e basais. A glândula é envolta por uma cápsula de fibras elásticas,
653 que envia septos para o interior do órgão. No rato, a próstata é dividida em quatro pares de
654 lóbulos bem definidos como próstata anterior, ventral, dorsal e lateral (ROY-BURMAN *et al.*,
655 2004).

656 A secreção produzida pelos produtos das glândulas (vesícula seminal e próstata) irá
657 servir tanto para a nutrição, como para o transporte e suporte dos espermatozoides fora do
658 trato genital masculino. As funções destas glândulas são dependentes de estímulos hormonais,
659 como a testosterona, que vai atuar especificamente nos órgãos sexuais acessórios do macho
660 (MANN, 1974).

661 Os hormônios são de fundamental importância na iniciação e manutenção da função
662 reprodutiva (MEEKER *et al.*, 2007). O hipotálamo irá liberar o GnRH que irá atuar na
663 hipófise estimulando a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio
664 luteinizante (LH). O FSH, por sua vez, tem a função de estimular e controlar a
665 espermatogênese nos túbulos seminíferos, bem como a formação dos receptores de
666 gonadotrofinas no testículo, enquanto o LH estimula as células intersticiais a produzirem e
667 secretar testosterona; esta que é necessária para o início, manutenção e restauração da
668 espermatogênese na puberdade (SHARPE, 1994). Após o nascimento, o sistema reprodutor
669 necessita constantemente dos estímulos hormonais do eixo HHG, para manter suas funções, e
670 ele responde na forma de feedback modulando a liberação de gonadotrofina (MARTY *et al.*,
671 2003).

672 Os testículos, epidídimos, as glândulas sexuais acessórias e demais órgãos do sistema

673 reprodutor masculino são estritamente dependentes dos hormônios andrógenos e qualquer
674 agente que interfira na ordem e interação do eixo HHG pode levar como consequências a
675 anormalidades reprodutivas (SOKOL, 1997).

676

677 2.4 RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA E SUA RELAÇÃO NA REPRODUÇÃO MASCULINA

678 Apesar de alguns efeitos da restrição proteica estarem relacionados diretamente com
679 alterações na disponibilidade do substrato, vários outros são mediados por efeitos hormonais,
680 podendo estes, modificar o desenvolvimento de tecidos fetais específicos durante as fases
681 mais críticas da gestação, levando a mudanças prolongadas na síntese hormonal ou ainda na
682 sensibilidade do organismo aos hormônios (GODFREY E BARKER, 2000; CONSOLE *et al.*,
683 2001; PEIXOTO-SILVA *et al.*, 2011; RINALDI *et al.*, 2018).

684 Estudos demonstraram que ratos submetidos a condições adversas em sua dieta, como
685 a exemplo da restrição proteica materna durante o decorrer da gestação e lactação,
686 apresentaram significativo aumento ou diminuição da secreção dos hormônios luteinizante
687 (LH), folículo estimulante (FSH), testosterona, aldosterona e estradiol, o que pode repercutir
688 significativamente sobre órgãos e funções do sistema reprodutor (ZAMBRANO *et al.*, 2005;
689 GUZMAN *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2012; OTANI *et al.*, 2012; SATHISHKUMAR *et al.*,
690 2012).

691 Dados da literatura demonstram que este modelo experimental levou não só a
692 alterações testiculares, prostáticas e espermáticas; bem como a problemas no desenvolvimento
693 da puberdade em animais adultos, os quais suas mães sofreram restrição proteica
694 (ZAMBRANO *et al.*, 2005; TOLEDO *et al.*, 2011; RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2012;
695 RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2014; COLOMBELLI *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019).
696 Nos estudos sobre as alterações espermáticas, observou que a restrição proteica materna
697 provocou modificações associadas especialmente às funções do epidídimo, como a
698 viabilidade, concentrações espermáticas e motilidade, além de aumentar a quantidade de
699 espermatozoides com alterações morfológicas (em especial, na cauda e peça intermediária)
700 bem como a presença de gota citoplasmática (Toledo *et al.*, 2011; Rodriguez-Gonzalez *et al.*,
701 2014). Dessa maneira, apesar dos trabalhos mostrarem que a restrição proteica exerce efeitos
702 adversos em relação às funções epididimárias, muito pouco se sabe em relação aos efeitos a
703 nível testicular (CAVARIANI, 2019).

704

705 2.5 DESMAME PRECOCE

706 A definição de desmame precoce se dá como a inserção de qualquer outro tipo de
707 alimento na dieta de uma criança a qual estava em um regime de aleitamento materno
708 exclusivo (RODRIGUES, N. A. *et al.*, 2014). O período de desmame é considerado desde a
709 introdução de outro alimento até a supressão completa do leite materno (ARAÚJO, O. D. *et*
710 *al.*, 2008). Independente do motivo que levaram a essa mudança na dieta do lactente, tem-se
711 um caso de desmame precoce (PARIZOTTO, J.; ZORZI, N. T. 2008).

712 A interrupção completa da amamentação e a introdução precoce de outros alimentos
713 na dieta da criança está correlacionado a consequências danosas à saúde do neonato, como o
714 contato com proteínas estranhas provenientes da exposição precoce a agentes infecciosos e
715 danos no processo de digestão (VICTORIA, C. G. *et al.*, 2016). O prejuízo do desmame
716 precoce também se estende à mãe que perde a contracepção natural, bem como fica mais
717 predisposta a desenvolver câncer de mama e de ovário (MEDEIROS, V. P. B. *et al.*, 2018).
718 Outro problema que decorre da inserção de uma dieta complementar, se deve ao aumento de
719 morbidades e mortalidade decorrentes da baixa ingestão de anticorpos e imunoglobulinas
720 presentes no leite materno; além do alto risco de oferecer alimentos contaminados ao neonato
721 (SILVA, W. F.; GUEDES, Z. C. 2013).

722 Dentre as causas mais comuns que levam ao desmame precoce, os fatores sociais são
723 os que mais se destacam: o trabalho materno, a renda familiar, nível de escolaridade da mãe,
724 influências culturais da família, presença do pai, experiências anteriores, entre outros
725 (CAPUCHO. L. B. *et al.*, 2017).

726 As mudanças no processo de amamentação sofreram fortes alterações devido a
727 participação da mulher no mercado de trabalho, sendo este um grande agravante no desmame
728 precoce, principalmente em virtude do trabalho extradomiciliar e isso faz com que as mães
729 passem a pensar em alternativas que substituam o aleitamento. Mesmo tendo leis e políticas
730 públicas que garantam os direitos das mães nesse caso, muitas ainda optam por voltar ao
731 trabalho, pois é a única fonte de renda da residência (BASILEIRO, A. A. *et al.*, 2012). Após
732 o período de licença maternidade, o trabalho em tempo integral diminui de forma significativa
733 a duração da amamentação. A jornada de trabalho, o estresse e o desequilíbrio psicológico
734 causado por toda essa situação alteram a fisiologia da lactação, levando a baixa e até mesmo a
735 supressão na produção de leite, conseqüentemente promovem também o desmame precoce
736 (BECHE, N. *et al.*, 2009).

737 A formação acadêmica das mães que estão amamentando também é um fator
738 importante, pois no meio que estão inseridas é mais provável que elas recebam informações
739 que garantam a continuidade da lactação, por saber os riscos e as vantagens da mesma; dessa

740 forma elas rejeitam práticas que prejudicam o processo de amamentação, ao contrário das
741 mães com menor grau de escolaridade, que por diversas vezes não recebem essas
742 informações, ou recebem de forma distorcida (MOURA, E. R. B. B. *et al.*, 2015).

743 O meio social em que a lactante está inserida também é um fator crucial no ato de
744 amamentar, estando entrelaçado com estímulos culturais, costumes, crenças e tabus. A mulher
745 está mais propícia a receber intervenções familiares e de amigos, bem como tomar decisões
746 acerca da amamentação com base nessas relações pessoais (OLIVEIRA, C. S. *et al.*, 2015). O
747 suporte que os pais fornecem as mulheres que estão em uma união estável também é decisivo
748 na continuação da amamentação; pois além de fornecer um apoio psicológico, também muitas
749 vezes divide as responsabilidades com a criança (ROCCI, F. R. A. Q. 2014).

750 Quando a mulher realiza o desmame, há uma agressão do metabolismo do lactente,
751 pois desvincula-se a fonte nutricional e comportamental do neonato (PATEL *et al.*, 2011).
752 Dessa forma é imprescindível que se tenha estudos que possam correlacionar as
753 consequências que se tem do DP e o desenvolvimento saudável do neonato. Tanto estudos
754 experimentais, quanto epidemiológicos vêm demonstrando que situações nutricionais e de
755 estresse durante os primeiros 2 anos de vida da criança, podem levar a alterações prejudiciais
756 a longo prazo na saúde, que podem seguir até a vida adulta (PENTECOST; ROSS, 2019).
757 Essas alterações participam na progressão de diversas doenças, podendo-se citar a diabetes,
758 obesidade, doenças cardiovasculares e ansiedade (ILCHMANN-DIOUNOU *et al.*, 2019;
759 MURPHY *et al.*, 2017; SYED; NEMEROFF, 2017).

760 Nos estudos em que animais foram submetidos ao modelo de DP (OLIVEIRA, *et al.*,
761 2011); foi relatado que os animais desmamados no dia pós-natal 15 por separação física das
762 mães estavam mais propícios a optarem por dietas ricas em gorduras quando comparados aos
763 animais desmamados no dia pós-natal 30. Outras observações feitas, foram que, os animais
764 submetidos ao DP tiveram aumento da agressividade, aumento da ansiedade e uma queda
765 drástica no desempenho cognitivo (AHOLA *et al.*, 2017; ISHIKAWA *et al.*, 2015). Também
766 é bem descrito na literatura que o DP é capaz de alterar padrões fisiológicos como o
767 comprimento, peso, gordura, glicemia, níveis de insulina bem como o índice de resistência à
768 insulina em ratos (LIMA *et al.*, 2011). Esses achados apresentam extrema relevância, pois
769 demonstra como o organismo está sujeito a complicações fisiológicas que podem levar a
770 patologias em decorrência do desmame precoce.

771

772 2.6 DESMAME PRECOCE E SISTEMA REPRODUTOR

773 A compreensão das implicações da alimentação sobre os períodos da gestação é
774 essencial para os estudos na área de toxicologia da reprodução e da embriologia
775 (ANDERSEN *et al.*, 2004). Pesquisas mais recentes na área de embriologia, já consideram a
776 restrição alimentar, como sendo uma distorção nos resultados obtidos com drogas que
777 modificam o apetite dos animais (TERRY *et al.*, 2005).

778 Já são numerosos os estudos que demonstram a restrição alimentar como um
779 interferente na longevidade, muito embora, poucos sejam as pesquisas sobre o efeito da
780 restrição quantitativa na reprodução de ratas. O desenvolvimento folicular, a ovulação, a
781 fertilização, o desenvolvimento embrionário, desde a implantação até a lactação, são
782 estritamente controlados por hormônios e por conseguinte são necessários mais estudos sobre
783 os processos que os interferem (BOITI, 2004).

784 A maioria dos trabalhos que envolvem os efeitos da desnutrição fetal, relacionando o
785 desenvolvimento da prole, são elaborados para a análise do sistema cardiovascular e suas
786 complicações (LANGLEY & JACKSON, 1994; HOET & HANSON, 1999; TORRENS *et al.*,
787 2003; SHERMAN & LANGLEY-EVANS, 2000). Assim, os estudos que comparam os
788 efeitos da desnutrição com o desenvolvimento do sistema reprodutor são escassos e tendem a
789 ser trabalhados de forma pontual.

790 O reconhecimento das complicações causadas pelo estado nutricional sobre a
791 programação fetal, tanto na fase pré como pós-natal, só veio ser estudada nas últimas décadas
792 (GUNN *et al.*, 1972; GUNN, 1977; ALLDEN, 1979; ZAMBRANO *et al.*, 2005; GUZMÁN *et*
793 *al.*, 2006). Na literatura já se relata trabalhos que vem verificando os efeitos a longo prazo da
794 restrição nutricional durante a gravidez e lactação, sobre o desenvolvimento sexual e suas
795 funções reprodutivas da prole na vida adulta, em especial na morfologia do epidídimo e
796 qualidade espermática (RHIND *et al.*, 2001; RAE *et al.*, 2002; ZAMBRANO *et al.*, 2005).

797 Já é bem descrito na literatura, que o estado nutricional é um fator importante para o
798 desenvolvimento saudável do início da puberdade e conseqüentemente das funções
799 reprodutivas (RONNEKLEIV *et al.*, 1978; FRISCH, 1980; ENGELBREGT *et al.*, 2000,
800 LEONHARDT *et al.*, 2003). Estudos também têm evidenciado uma relação entre o atraso do
801 crescimento intrauterino ocasionado por restrição alimentar e o desenvolvimento da
802 puberdade de machos e fêmeas, o que evidencia mudanças no início e avanço da puberdade
803 (ENGELBREGT *et al.*, 2000; ZAMBRANO *et al.*, 2005; GUZMÁN *et al.*, 2006). Muito
804 embora, a relação entre o atraso do crescimento intrauterino e os mecanismos que controlam o
805 início da puberdade não tenha sido completamente elucidada. Sabe-se que uma restrição
806 nutricional severa, controlada por mecanismos placentários, pode modificar o

807 desenvolvimento do eixo HHG no feto, o que desfavorece e atrasa o início da puberdade (DA
808 SILVA *et al.*, 2001).

809 Outras pesquisas demonstraram que camundongos adultos que foram submetidos à
810 restrição alimentar de 30% durante um período de 8 semanas tiveram uma redução
811 significativa de 42% na concentração de testosterona sérica, também houve uma diminuição
812 de 27% na massa testicular e um aumento na taxa de apoptose que pode ser a responsável pela
813 diminuição testicular ocorrida em resposta a restrição alimentar (YOUN *et al.*, 2000;
814 TOLÊDO *et al.*, 2010).

815 O sistema endócrino é um dos mais afetados quando se fala dos efeitos da nutrição no
816 organismo (MOURA *et al.*, 1997; ROCHA DE MELO & GUEDES 1997; PASSOS *et al.*,
817 2000, TEIXEIRA *et al.*, 2002). Alterações nos níveis de testosterona, corticosterona, LH, FSH
818 e estradiol foram relatadas tanto nas mães quanto na prole submetidas a restrição alimentar
819 (ZAMBRANO *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Também há estudos relatando a redução
820 no peso testicular do feto de ratas submetidas à restrição alimentar ou proteica durante a
821 prenhez e aumento na expressão de RA no órgão (MOTA *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*,
822 2007). Houve ainda estudos que demonstraram uma diminuição no número de células de
823 Sertoli em animais adultos que sofreram desnutrição alimentar durante a vida fetal
824 (GENOVESE *et al.*, 2009; TOLÊDO *et al.*, 2010).

825

826 2.7 MELATONINA E GLÂNDULA PINEAL

827 O desenvolvimento embrionário da glândula pineal se dá a partir do teto do diencéfalo,
828 logo atrás do terceiro ventrículo, suas medidas têm aproximadamente 8x4mm em adultos e
829 pode pesar aproximadamente 0,18g. Sua origem se dá pela evaginação do telhado do
830 diencéfalo, na qual ela adquire o formato de um cone, se localizando na região epitalâmica
831 entre as comissuras habenuar e posterior. O recesso endimensional do terceiro ventrículo vai se
832 estender por toda a haste curta, o que permitirá a conexão da pineal ao teto do diencéfalo, que
833 é quase completamente cercado pela pia-máter (BRZEZINSKI *et al.*, 1997; KASECKER &
834 NUNES, 2017).

835 Existem três fases distintas no processo de formação da glândula pineal (QUAY,
836 1974). A primeira fase, também denominada de fase morfogenética, se inicia no 30º dia do
837 desenvolvimento intrauterino nos ratos, podendo durar cerca de três dias. Nessa fase se
838 observa uma estrutura que vai se desenvolver na região da linha média do teto do diencéfalo.
839 Ela é recoberta por um epitélio pseudoestratificado, que tem sua origem nas células
840 endimárias e difere de todo o restante do cérebro devido à ausência da barreira

841 hematoencefálica (ROA, 2014). Na segunda fase, também chamada de fase proliferativa, vai
842 ocorrer a migração dos precursores celulares da glândula, onde vai se constatar, os
843 pinealoblastos e espongioblastos, que são células que darão origem aos pinealócitos e aos
844 astrócitos. É durante essa fase que também se observará, através da crista neural, as células de
845 Schwann e os melanócitos. Logo após a migração celular, a glândula começa a alterar a sua
846 morfologia e torna-se uma estrutura compacta, que em seguida vai levar à redução da luz do
847 recesso pineal, devido à falta de espaço (ROA, 2014). Por fim, na terceira e última fase, a
848 glândula vai hipertrofiar e vai ocorrer a maturação da pineal, completando seu processo de
849 desenvolvimento, agora sendo bem característica a diferenciação de suas zonas, cortical e
850 medular (QUAY, 1974; ROA, 2014; MASCARENHAS *et al.*, 2021).

851 A glândula pineal é ricamente vascularizada, tendo um amplo aporte sanguíneo, ela é
852 o segundo órgão (atrás apenas do rim) com o maior fluxo sanguíneo levando em consideração
853 a massa do tecido. A intensa atividade metabólica do órgão é suprida pela vasta rede de
854 capilares que percorre todo o parênquima. Durante a noite, ocorre aumento do metabolismo
855 do indol, e por conseguinte, há também um aumento no suprimento sanguíneo desse órgão, ou
856 seja, o aumento do metabolismo do indol leva ao aumento da produção do hormônio
857 melatonina que é uma indolamina. Estudos mostraram que a extração do gânglio cervical
858 superior reduz a atividade metabólica da pineal, bem como diminui 2/3 do seu fluxo
859 sanguíneo normal. O máximo deste suprimento sanguíneo é abastecido por ramos
860 provenientes das artérias coróides posteriores (REITER, 1991; HISSA *et al.*, 2008;
861 KASECKER & NUNES, 2017).

862 Histologicamente, o parênquima da glândula é composto de dois tipos celulares:
863 pinealócitos e neuroglia. Os pinealócitos são mais prevalentes e tem sua estrutura organizada
864 em cordas repousadas numa membrana basal, onde mantém uma ligação com o espaço
865 intersticial. Os hormônios mais produzidos pelos pinealócitos são: as indolaminas (em
866 especial a melatonina - MLT) e peptídeos (como vasotocina e arginina). A inervação
867 simpática tem fundamental importância para a regulação da função pineal, uma vez que é
868 composta por fibras noradrenérgicas, originadas no gânglio cervical simpático e que termina
869 no espaço intersticial da glândula, ou nas membranas plasmáticas dos pinealócitos
870 (FRANKLIN *et al.*, 1997; TENORIO *et al.*, 2015).

871 A regulação do fluxo nervoso simpático que vai até a pineal é controlada por impulsos
872 originados do núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo. Este núcleo vai receber
873 estimulação nervosa enviada diretamente da retina (trato retino-hipotalâmico), o que vai
874 permitir a transferência de informações sobre a luz e a escuridão, independente se o

875 organismo estiver consciente desta percepção. Axônios originados do SCN vão fazer sinapses
876 com neurônios autônomos da coluna intermediolateral e da coluna torácica superior e então os
877 axônios pré-ganglionares vão deixar a medula espinhal, mantendo sinapses com os neurônios
878 do gânglio cervical superior, onde finalmente os neurônios pós-ganglionares finalizam e a
879 pineal emerge (HISSA *et al.*, 2008; TENORIO *et al.*, 2015).

880 É através dessa complexa via neural que a luz vai regular a atividade da glândula.
881 Durante o dia, a luz vai inibir a produção do principal hormônio produzido pela pineal, a
882 melatonina. Em contrapartida, a produção de melatonina vai ser intensamente estimulada à
883 noite. O uso de bloqueadores α -adrenérgicos ou a secção da inervação simpática levam ao
884 bloqueio da atividade metabólica das células pineais (BRUCE *et al.*, 1991; TENORIO *et al.*,
885 2015).

886 A glândula pineal também participa na síntese e armazenamento de uma série de
887 outras substâncias biologicamente ativas, e que exercerá sua função primária em órgãos alvos
888 específicos, após sua secreção. Estas incluem aminas biogênicas (epinefrina, serotonina,
889 histamina, dopamina e octopamina), peptídeos (hormônio liberador de rotropina -TRH,
890 hormônio liberador de hormônio luteinizante - LHRH, sotocinava e somatostatina) além do
891 ácido gama-aminobutírico (GABA) (SERAPHIM *et al.*, 2000).

892 Através das terminações nervosas simpáticas no gânglio cervical superior, vai haver a
893 liberação de norepinefrina, seguindo o ritmo circadiano, que está associado ao ciclo claro-
894 escuro no meio ambiente, esse processo levará ao aumento na fase escura da secreção de
895 neurotransmissores. Na biossíntese de melatonina, o triptofano vai ser primariamente
896 convertido em 5-hidroxitriptofano, pela triptofano hidroxilase, em seguida é descarboxilado
897 em serotonina. A serotonina, por sua vez, vai ser acetilada em N-acetilserotonina, que na
898 etapa seguinte é O-metilada, resultando em melatonina. As enzimas responsáveis por essas
899 duas fases são arilalquilamina, N-acetiltransferase (NAT) (que tem seu maior pico durante o
900 dia, atingindo a concentração cerca de 100 vezes maiores que na fase escura) e hidroxindol-
901 O-metil transferase (HIOMT) (DEBRECENI *et al.*, 1997; TENORIO *et al.*, 2015).

902 Além disso a noradrenalina atua nos receptores Alfa1 e Beta1 na pineal, causando a
903 ativação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (ou serotonina N-acetiltransferase),
904 que controla a produção circadiana de melatonina (KARBOWNIK & REITER, 2000). As
905 duas principais vias metabólicas da melatonina ocorrem no fígado e no cérebro. A
906 hidroxilação da melatonina no fígado forma a 6-hidroxi melatonina, que por conseguinte irá se
907 conjugar com o sulfato ou glucuronato, sendo posteriormente excretado na urina. No tecido
908 cerebral, a melatonina vai ser convertida em N gama-acetil-N-2-formil-5-

909 metoxicinurenamina, sendo degradada imediatamente em N-acetil-5-metoxitriptamina. Outro
910 metabolismo menor da melatonina, incluem a formação de N-acetilserotonina e 2-
911 hidroximelatonina cíclica, que pode ocorrer em várias células. Embora a síntese de
912 melatonina tenha sido relatada em outros locais, como intestinos, útero, ovário, cérebro e
913 células sanguíneas, o estudo principal da síntese em diferentes espécies foi realizada na retina
914 e na pineal (NETO & SCALDAFERRI, 2005).

915 Os níveis de melatonina plasmática é um espelho da melatonina produzida na pineal,
916 uma vez que a melatonina sintetizada na retina tem sua ação a nível local. A síntese de
917 melatonina, seja ela oriunda da pineal quanto da retina, são controladas pela luz (MARKUS *et*
918 *al.*, 2003).

919 Em humanos, a secreção de melatonina aumenta logo após o anoitecer, porém os seus
920 picos ocorrem no meio da noite (entre duas e quatro da manhã), e vai caindo gradativamente
921 durante a segunda metade da noite. Existem controles diários e sazonais de vários processos
922 fisiológicos que remetem à melatonina. As concentrações séricas desse hormônio também
923 variam consideravelmente de acordo com a idade do indivíduo (FRANKLIN *et al.*, 1997). O
924 maior pico de produção da melatonina se dá nos primeiros anos de vida, posteriormente vai
925 caindo gradativamente, antes da puberdade e logo após vai se tornando mínimo com a idade.
926 Assim, conceitua-se que a melatonina também tem um papel especial na determinação das
927 mudanças fisiológicas, estando relacionadas ao ciclo de vida. (crescimento, maturação e
928 envelhecimento) (MARKUS *et al.*, 2003).

929 Estudos também demonstraram que além do ciclo de luz claro/escuro, os níveis de
930 melatonina também podem ser alterados pelo processo de pinealectomia, o qual modifica a
931 taxa de secreção pois irá suprimir abruptamente sua produção. Animais que foram expostos a
932 pinealectomia tiveram sua secreção de melatonina inibida, mas o processo pôde ser revertido
933 quando os animais foram tratados com melatonina exógena (MARKUS *et al.*, 2003).

934 Pesquisas revelaram que por meio de suas secreções, a glândula pineal pode interagir
935 com a hipófise, levando a liberação de seus hormônios. Alguns estudos iniciais também
936 demonstram que a estimulação da atividade da pineal *in situ* inibe a proliferação de células
937 hipofisárias (BRUCE, 1991). Em contrapartida, também foi demonstrado que a
938 hipofisectomia leva a atrofia na glândula pineal, sugerindo também um feedback regulatório
939 da hipófise no desenvolvimento e função da pineal (NETO & SCALDAFERRI, 2005).

940 Pesquisas também relacionaram que a pineal pode alterar a função, bem como os
941 efeitos sobre as gônadas, ela parece interferir na secreção do hormônio do crescimento e
942 funções da tireoide e adrenal através do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT)

943 (AGARWAL *et al.*, 2005).

944

945 2.8 MELATONINA E SISTEMA REPRODUTOR

946 A melatonina exerce fundamental importância em uma diversidade de funções no
947 organismo, a regulação dos ritmos circadianos associados às atividades visuais, reprodutivas,
948 neuroendócrinas, cerebrovasculares e ações neuroimunes. Esta indolamina desempenha um
949 papel crítico na atividade reprodutiva e implantação do blastocisto em uma variedade de
950 espécies de mamíferos (AREND, 1995; REITER, 2015). Além disso, estudos já indicaram
951 que há uma transferência, através da placenta e do leite, de melatonina da mãe para o feto
952 durante a gravidez e lactação (BISHNUPURI & HALDAR, 2000).

953 Estudos preliminares informaram que a melatonina pode ser considerada uma droga
954 antiestrogênica, uma vez que, pode interferir nos receptores de estrogênio. Além disso, atua
955 na síntese de estrogênio, através da inibição da enzima aromatase que controla sua
956 interconversão a partir de seus precursores androgênicos, alterando o processo de
957 desenvolvimento do folículo e implantação do blastocisto (OKATANI & SAGARA, 1995).

958 Outras pesquisas também indicaram que a melatonina bloqueia o crescimento e
959 progressão de tumores mamários espontâneos ou que foram induzidos quimicamente em
960 roedores. Este efeito também foi observado em culturas de células (*in vitro*). Este hormônio
961 também impossibilita a proliferação e invasão das células tumorais durante a implantação de
962 blastocisto (THOMAS *et al.*, 2002).

963 Em estudos experimentais com ratas, pesquisadores observaram que a remoção da
964 glândula pineal levou a conseqüente diminuição nos níveis de melatonina e o que ocasionou
965 hipertrofia ovariana, prematuridade na abertura vaginal, anovulação crônica e aumento da
966 cornificação das células vaginais, sendo esses efeitos revestidos após a administração de
967 melatonina exógena (THOMAS *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2006). Em contrapartida, o tratamento
968 com melatonina reduziu o peso dos ovários, bem como atrasou a maturação sexual em ratos
969 (Murcia-García *et al.*, 2002).

970 Trabalhos identificaram a expressão de receptores para melatonina MT1 e MT2 nos
971 tecidos reprodutivos humanos, incluindo o epitélio mamário, miométrio, ovário, células
972 granulo-lúteas, bem como testículo, hipotálamo e hipófise. (SINGH & JADHAV, 2014;
973 SLOMINSKI *et al.*, 2008; WOO *et al.*, 2001). Além disso, a melatonina causa mudanças
974 estacionais nas taxas de fertilização, concentração de esperma, condensação de cromatina no
975 esperma e qualidade do embrião (HENKEL *et al.*, 20001).

976 A atividade gonadal também vai sofrer modificações na sua regulação, uma vez que, a
977 melatonina causa alterações na secreção de FSH e LH. A exemplo de um estudo em que
978 ovelhas prenhas foram mantidas em constante luz por 138 dias, fazendo com que houvesse
979 uma diminuição nas concentrações de melatonina e um aumento expressivo da atividade
980 metabólica nos órgãos reprodutores. Além disso, ovelhas prenhas que sofreram pinealectomia
981 e foram tratadas com melatonina tiveram alteração no parâmetro diário de movimentos
982 respiratórios do feto, o que pode ser um indicativo de que informações fotoperiódicas podem
983 fornecer ao feto variações circadianas através da melatonina advinda da mãe (OKATANI &
984 SAGARA, 1995; TAMURA *et al.*, 2008).

985 A 125I-melatonina, um radioligante biologicamente ativo, propiciou estudos para
986 avaliar as ações diretas da melatonina no testículo. A presença de receptores de melatonina foi
987 documentada no testículo de rato, pato, codorna, galo e hamster dourado (AYRE *et al.*, 1995;
988 TIJMES *et al.*, 1996; VERA *et al.*, 1997; STEFULJ *et al.*, 2001; FRUNGIERI *et al.*, 2005a).
989 Também foi descrita a síntese testicular de melatonina, como resultado da presença e
990 atividade das enzimas responsáveis pela transformação de 5-HT na melatonina, em especial
991 no compartimento intersticial (TIJMES *et al.*, 1996; KATO *et al.*, 1999; FU *et al.*, 2001).

992 Estudos demonstraram que a atividade espermatogênica e androgênica, em ratos que
993 tiveram uma injeção diária de melatonina exógena foi alterada, demonstrando dessa forma
994 que a MEL interfere na atividade gonadal em espécies que dependem do fotoperíodo. Os
995 resultados deste estudo permitiram estabelecer que a MEL promove um desenvolvimento
996 anormal da espermatogênese, bem como a diminuição na produção de testosterona *in vivo* e *in*
997 *vitro*. As explicações se dariam pelo baixo número de locais de ligação de hCG / LH e
998 redução de LH sérico, que levaria a diferenciação testicular e a capacidade funcional das
999 Células de Leydig (OLIVARES *et al.*, 1989).

1000 Pesquisas realizadas *in vitro*, utilizando secções testiculares e células de Leydig
1001 purificadas, evidenciaram que a melatonina bloqueia a produção de testosterona, modulando
1002 localmente a função testicular independente da atividade hipofisária (ELLIS *et al.*, 1972;
1003 VALENTI e col., 1995; FRUNGIERI *et al.*, 2005). Esse efeito inibitório da melatonina estaria
1004 relacionado a um feedback negativo exercido sobre a expressão da proteína StAR e enzimas-
1005 chave na síntese de esteroides (P450_{scc}, 3 β -HSD e 17 β -HSD), levando ao bloqueio da
1006 produção de CAMP e testosterona (VALENTI *et al.*, 1995; MAITRA e RAY, 2000; WU *et*
1007 *al.*, 2001; FRUNGIERI *et al.*, 2005a).

1008 Trabalhos demonstraram que a exposição de animais, a curtos períodos de luz gerou
1009 uma maior produção de di-hidrotestosterona, que o detectado em células de Leydig de

1010 animais mantidos em fotoperíodo normal (FRUNGIERI *et al.*, 1999). Foi então determinado
1011 que a expressão da enzima 5 α redutase 1, responsável pela conversão da testosterona em di-
1012 hidrotosterona, teve significativo aumento em células de Leydig de hamsters com restrição
1013 de luz, mas que foram injetados melatonina (FRUNGIERI *et al.*, 2005). Por conseguinte, a
1014 melatonina teve papel essencial no auxílio da conversão de andrógenos 5 α -não-reduzidos em
1015 esteroides 5 α -reduzidos, em hamsters que foram expostos ao curto fotoperíodo,
1016 consequentemente, fez o controle na produção de di-hidrotosterona (FRUNGIERI *et al.*,
1017 2005).

1018 Estudos realizados em camundongos com hiperlipidemia, uma doença que altera a
1019 estrutura testicular, decorrente do espessamento nas paredes dos túbulos seminíferos; bem
1020 como da presença de células germinativas com citoplasma eletrodensos, indicou que a
1021 melatonina reduziria o dano local causado ao testículo, melhorando dessa forma a
1022 histopatologia e diminuindo os eventos apoptóticos em células germinativas (ZHANG *et al.*,
1023 2012).

1024 Em outro trabalho, foi observado que, camundongos que apresentavam lesão testicular
1025 induzida por ciclofosfamida, o tratamento com melatonina reduziu drasticamente a toxicidade
1026 estimulada por esta droga no processo de espermatogênese. Assim, a melatonina
1027 desempenharia um papel protetor ante a peroxidação lipídica, devido às suas propriedades
1028 antioxidantes (CHABRA *et al.*, 2013).

1029 Dito isso, o tema estudado tem uma importância significativa, pois a preocupação com
1030 os hábitos alimentares e a saúde reprodutiva, encarregada pela manutenção das espécies, é
1031 crescente. Desta forma, estudos sobre o desmame precoce e as suas consequências sobre a
1032 prole, são extremamente necessários, não somente em relação às doenças cardiovasculares e
1033 suas desordens, mas também nos possíveis efeitos sobre o desenvolvimento reprodutivo
1034 (TOLÊDO *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2019).

1035

1036 3. OBJETIVOS

1037

1038 3.1. Geral

1039 Avaliar a atividade da melatonina frente aos possíveis efeitos desencadeados pela
1040 desnutrição no desenvolvimento do testículo de ratos Wistar submetidos ao desmame precoce.

1041

1042 3.2. Específicos

1043

1044 • Analisar o peso dos animais, dos testículos e o índice gonadossomático;

1045

1046 •Descrever morfometricamente (a altura e diâmetro do epitélio, quantificação das células de
1047 Sertoli, dos espermatócitos na fase de paquíteno e das espermátides arredondadas) nos
1048 testículos;

1049

1050 •Realizar análise histopatológica do testículo;

1051

1052 •Analisar a detecção de receptores de PCNA para avaliação da proliferação celular.

1053

1054 4. REFERÊNCIAS

1055

1056 AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh K. Role of oxidative stress in female
1057 reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2005.

1058 AGOSTI, Massimo et al. Nutritional and metabolic programming during the first thousand
1059 days of life. **La Pediatria Medica e Chirurgica**, v. 39, n. 2, 2017.

1060 ALLDEN, W. G. Undernutrition of the Merino sheep and its sequelae. V.* The influence of
1061 severe growth restriction during early post-natal life on reproduction and growth in later life.
1062 **Australian journal of agricultural research**, v. 30, n. 5, p. 939-948, 1979.

1063 AMARAL, Keytiane de Jesus Viana et al. Efeitos metabólicos e reprodutivos da
1064 sobrenutrição pós-natal precoce em ratas Wistar provenientes da redução de ninhada durante a
1065 lactação: consequências na primeira e segunda geração. 2019.

1066 ANDERSEN, M.L; D'ALMEIDA; V.;KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.;
1067 MAGALHÃES.L.E; TUFIK, S. Princípios Éticos e Práticos do uso de animais de
1068 experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. 2004.

1069 ARAÚJO, Olívia Dias de et al. Aleitamento materno: fatores que levam ao desmame precoce.
1070 **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 488-492, 2008.

1071 AREND, J. Melatonin and the mammalian pineal gland. **London: Chap-Man & Hall**; 1995.

1072 ARMITAGE, James A.; TAYLOR, Paul D.; POSTON, Lucilla. Experimental models of
1073 developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during
1074 development. **The Journal of physiology**, v. 565, n. 1, p. 3-8, 2005.

1075 ATTIG L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A, et al. Early
1076 postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-
1077 induced obesity in rats. **Int J Obes**. 2008; 32(7):1153-60. doi:10.1038/ijo.2008.39.

1078 AYRE, Elizabeth A. et al. Localization and characterization of [125I] iodomelatonin binding
1079 sites in duck gonads. **Journal of pineal research**, v. 17, n. 1, p. 39-47, 1994.

1080 BALE, Tracy L. et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. **Biological**
1081 **psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 314-319, 2010.

- 1082 BARKER, David JP. The fetal and infant origins of disease. **European journal of clinical**
1083 **investigation**, v. 25, n. 7, p. 457-463, 1995.
- 1084 BARKER, David JP. The origins of the developmental origins theory. **Journal of internal**
1085 **medicine**, v. 261, n. 5, p. 412-417, 2007.
- 1086 BECHE, N.; HALPERN, R.; STEIN, A. T. Prevalência do aleitamento materno exclusivo em
1087 um município do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Associação Médica do Rio Grande**
1088 **do Sul**, v.53, n.4, p. 345-359, 2009.
- 1089 BIRD, A.; MACLEOD, D. Reading the DNA methylation signal. In: **Cold Spring Harbor**
1090 **symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. p. 113-118.
- 1091 BISHNUPURI, K. S.; HALDAR, C. Profile of organ weights and plasma concentrations of
1092 melatonin, estradiol and progesterone during gestation and post-parturition periods in female
1093 Indian palm squirrel *Funambulus pennanti*. 2000.
- 1094 BLOK, Leen J. et al. Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in
1095 Sertoli cells and other cell types. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 88, n. 1-3, p.
1096 153-164, 1992.
- 1097 BOITI, Cristiano et al. Underlying physiological mechanisms controlling the reproductive
1098 axis of rabbit does. In: Proc. 8th **World Rabbit Congr., Puebla, Mexico**. 2004. p. 186-206.
- 1099 BRASILEIRO AA, Ambrosano GMB, Marba STM, Possobon RF. A amamentação entre
1100 filhos de mulheres trabalhadoras. **Rev Saúde Pública**. 2012; 46(4):642-8.
- 1101 BRUCE, JEFFREY et al. Sequential cerebrospinal fluid and plasma sampling in humans: 24-
1102 hour melatonin measurements in normal subjects and after peripheral sympathectomy. **The**
1103 **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 72, n. 4, p. 819-823, 1991.
- 1104 BRZEZINSKI, Amnon. Melatonin in humans. *New England journal of medicine*, v. 336, n. 3,
1105 p. 186-195, 1997.
- 1106 CAPUCHO, Lorena Bassi et al. Fatores que interferem na amamentação exclusiva. **Revista**
1107 **Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v. 19, n. 1, p.
1108 108-113, 2017.

- 1109 CARDONE, Anna; ANGELINI, Francesco; VARRIALE, Bruno. Autoregulation of estrogen
1110 and androgen receptor mRNAs and downregulation of androgen receptor mRNA by estrogen
1111 in primary cultures of lizard testis cells. **General and comparative endocrinology**, v. 110, n.
1112 3, p. 227-236, 1998.
- 1113 CAVARIANI, Marilia Martins. Efeitos da restrição proteica materna sobre o padrão vascular
1114 e expressão de proteínas no epidídimo de ratos Wistar machos em diferentes fases do
1115 desenvolvimento pós-natal. 2019.
- 1116 CHABRA, A. et al. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced
1117 by cyclophosphamide in male mice. **Human & experimental toxicology**, v. 33, n. 2, p. 185-
1118 195, 2014.
- 1119 CLERMONT, Yves. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle
1120 and spermatogonial renewal. **Physiological reviews**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.
- 1121 COLOMBELLI, Ketlin T. et al. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with
1122 delay in prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. **General and**
1123 **comparative endocrinology**, v. 246, p. 258-269, 2017.
- 1124 CÓNSOLE, G. M. et al. Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell
1125 populations in undernourished monkeys. **Brazilian Journal of medical and Biological**
1126 **research**, v. 34, p. 65-74, 2001.
- 1127 CROWN, Angelena; CLIFTON, Donald K.; STEINER, Robert A. Neuropeptide signaling in
1128 the integration of metabolism and reproduction. **Neuroendocrinology**, v. 86, n. 3, p. 175-182,
1129 2007.
- 1130 DA CUNHA SANTOS, Maria Paula Medeiros; PEREIRA, Thony Guilherme; DE SOUZA
1131 FREITAS, Moisés Thiago. A influência do leite materno na microbiota intestinal do recém-
1132 nascido. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 93400-93411, 2020.
- 1133 DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutivo dos
1134 Animais Domésticos. Emanuel Isaque Cordeiro da Silva, 2020.

- 1135 DA SILVA LIMA, Natália et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and
1136 programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat
1137 offspring. **British journal of nutrition**, v. 105, n. 9, p. 1405-1413, 2011.
- 1138 DA SILVA, Patricia et al. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the
1139 onset of puberty in male and female lambs. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 375-383, 2001.
- 1140 DEBRECENI, K. et al. Mediator substances of the pineal neuronal network of mammals.
1141 **Neurobiology (Budapest, Hungary)**, v. 5, n. 4, p. 459-467, 1997.
- 1142 DE ABREU RODRIGUES, Nathália; DE GODOY GOMES, Ana Cecília. Aleitamento
1143 materno: fatores determinantes do desmame precoce. **Enfermagem Revista**, v. 17, n. 1, p.
1144 30-48, 2014.
- 1145 DE OLIVEIRA, Lázaro Heleno Santos et al. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO LEITE
1146 MATERNO. **Gep News**, v. 3, n. 3, p. 4-6, 2019.
- 1147 DESJARDINS, CLAUDE; LOPEZ, M. J. Environmental cues evoke differential responses in
1148 pituitary-testicular function in deer mice. **Endocrinology**, v. 112, n. 4, p. 1398-1406, 1983.
- 1149 DUDAR, Juliana Laís; REIPS, Cristiane Tarine Müller Giroto. IMPACTOS DA
1150 NUTRIÇÃO NA FERTILIDADE HUMANA: UMA REVISÃO DA LITERATURA.
1151 In: **Congresso Internacional em Saúde**. 2023.
- 1152 ELLIS, LeGRANDE C. et al. Correlation of age changes in monoamine oxidase activity and
1153 androgen synthesis by rat testicular minced and teased-tubular preparation in vitro.
1154 **Endocrinology**, v. 90, n. 6, p. 1610-1618, 1972.
- 1155 ENGELBREGT, Mia JT et al. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal
1156 undernutrition on onset of puberty in male and female rats. **Pediatric research**, v. 48, n. 6, p.
1157 803-807, 2000.
- 1158 ESTEBAN-CORNEJO, Irene et al. A whole brain volumetric approach in overweight/obese
1159 children: Examining the association with different physical fitness components and academic
1160 performance. The ActiveBrains project. **Neuroimage**, v. 159, p. 346-354, 2017.

- 1161 FLEMING, Tom P. et al. Do little embryos make big decisions? How maternal dietary protein
1162 restriction can permanently change an embryo's potential, affecting adult health.
1163 **Reproduction, fertility and development**, v. 27, n. 4, p. 684-692, 2015.
- 1164 FRANKLIN H, Epstein MD, Amnon Brzezinski MD. Mechanisms of disease. **N Engl J Med.**
1165 1997;336:186-95.
- 1166 FRISCH, Rose E. Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation?
1167 Evidence from the rat and human female. In: **Federation proceedings**. 1980. p. 2395-2400.
- 1168 FRUNGIERI, MónicaB et al. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels,
1169 immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-
1170 recrudescence transition. **Neuroendocrinology**, v. 69, n. 4, p. 299-308, 1999a.
- 1171 FRUNGIERI, Mónica B. et al. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin
1172 subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local
1173 corticotropin-releasing hormone system. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1541-1552, 2005.
- 1174 FU, Zhengwei et al. Regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression in
1175 Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**,
1176 v. 65, n. 11, p. 2504-2511, 2001.
- 1177 GAO, Haijun; YALLAMPALLI, Uma; YALLAMPALLI, Chandra. Gestational protein
1178 restriction reduces expression of Hsd17b2 in rat placental labyrinth. **Biology of**
1179 **reproduction**, v. 87, n. 3, p. 68, 1-7, 2012.
- 1180 GARTNER, Hermann et al. The imputation of wages above the contribution limit with the
1181 German IAB employment sample. **FDZ Methodenreport**, v. 2, n. 2005, p. 2005, 2005.
- 1182 GLUCKMAN, Peter D.; HANSON, Mark A. The consequences of being born small—an
1183 adaptive perspective. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 65, n. Suppl. 3, p. 5-14, 2006.
- 1184 GODFREY, Keith M.; BARKER, David JP. Fetal nutrition and adult disease. **The American**
1185 **journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1344S-1352S, 2000.
- 1186 GODFREY, Keith M.; COSTELLO, Paula M.; LILLYCROP, Karen A. The developmental
1187 environment, epigenetic biomarkers and long-term health. **Journal of developmental origins**
1188 **of health and disease**, v. 6, n. 5, p. 399-406, 2015.

- 1189 GRISSOM, Nicola; BOWMAN, Nicole; REYES, Teresa M. Epigenetic programming of
1190 reward function in offspring: a role for maternal diet. **Mammalian genome**, v. 25, n. 1, p. 41-
1191 48, 2014.
- 1192 GUNN, R. G.; DONEY, J. M.; RUSSEL, A. J. F. Embryo mortality in Scottish Blackface
1193 ewes as influenced by body condition at mating and by post-mating nutrition. **The Journal of**
1194 **Agricultural Science**, v. 79, n. 1, p. 19-25, 1972.
- 1195 GUNN, R. G. The effects of two nutritional environments from 6 weeks pre partum to 12
1196 months of age on lifetime performance and reproductive potential of Scottish Blackface ewes
1197 in two adult environments. **Animal Science**, v. 25, n. 2, p. 155-164, 1977.
- 1198 HALES, C. N[†]; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the
1199 thrifty phenotype hypothesis. **International journal of epidemiology**, v. 42, n. 5, p. 1215-
1200 1222, 2013.
- 1201 HAYWARD, S. W. et al. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and
1202 seminal vesicle of the rat. **Cells Tissues Organs**, v. 155, n. 2, p. 94-103, 1996.
- 1203 HENKEL, Ralf et al. Andrology: Seasonal changes in human sperm chromatin condensation.
1204 **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 18, n. 7, p. 371-377, 2001.
- 1205 HERMO, Louis; ROBAIRE, Bernard. Epididymal cell types and their functions. In: **The**
1206 **epididymis: from molecules to clinical practice**. Springer, Boston, MA, 2002. p. 81-102.
- 1207 HERRING, Cassandra M. et al. Impacts of maternal dietary protein intake on fetal survival,
1208 growth, and development. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 6, p. 525-533,
1209 2018.
- 1210 HISSA M.N., Lima GG, Simões JC, Nunes RTL. Melatonin and pineal gland. **Rev Elect Pesq**
1211 **Méd.** 2008;2:1-10.
- 1212 HUSSEIN, Mahmoud R. et al. Avaliação morfológica dos efeitos radioprotetores da
1213 melatonina contra dano de testis precoce e agudo induzido por raios-X em ratos albinos: um
1214 modelo animal. **Revista internacional de patologia experimental**, v. 87, n. 3, p. 237-250,
1215 2006.

- 1216 IMDAD, Aamer; BHUTTA, Zulfiqar A. Maternal nutrition and birth outcomes: Effect of
1217 balanced protein-energy supplementation. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 26, p.
1218 178-190, 2012.
- 1219 ILCHMANN-DIOUNOU, Hanna et al. Early life stress induces type 2 diabetes-like features
1220 in ageing mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 80, p. 452-463, 2019.
- 1221 JAZWIEC, Patrycja A.; SLOBODA, Deborah M. Nutritional adversity, sex and reproduction:
1222 30 years of DOHaD and what have we learned?. **Journal of Endocrinology**, v. 242, n. 1, p.
1223 T51-T68, 2019.
- 1224 JIANG, Xinyin; WEST, Allyson A.; CAUDILL, Marie A. Maternal choline supplementation:
1225 a nutritional approach for improving offspring health?. Trends in **Endocrinology &**
1226 **Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 263-273, 2014.
- 1227 JOLLY, M. et al. Increased leucine turnover in women during the third trimester of
1228 uncomplicated pregnancy. **Metabolism**, v. 53, n. 5, p. 545-549, 2004.
- 1229 JONES, R. C. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis.
1230 **International journal of andrology**, v. 22, n. 2, p. 57-67, 1999.
- 1231 KARBOWNIK, Małgorzata; REITER, Russel J. Antioxidative effects of melatonin in
1232 protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proceedings of the Society**
1233 **for Experimental Biology and Medicine: Minireviews**, v. 225, n. 1, p. 9-22, 2000.
- 1234 KASECKER, Fernanda Gugelmin; NUNES, Carlos Pereira. Melatonina e glândula pineal.
1235 **Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis**, v. 1, n. 01, 2017.
- 1236 KATO, Hisanori et al. Regulation of the expression of serotonin N-acetyltransferase gene in
1237 Japanese quail (*Coturnix japonica*): I. Rhythmic pattern and effect of light. **Journal of pineal**
1238 **research**, v. 27, n. 1, p. 24-33, 1999.
- 1239 KIMURA, NORIKO et al. Immunocytochemical localization of androgen receptor with
1240 polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. **Journal of Histochemistry &**
1241 **Cytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 671-678, 1993.
- 1242 KOLETZKO, Berthold et al. 1. Guidelines on paediatric parenteral nutrition of the European
1243 Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the

- 1244 European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), supported by the European
1245 Society of Paediatric Research (ESPR). **Journal of pediatric gastroenterology and**
1246 **nutrition**, v. 41, p. S1-S4, 2005.
- 1247 LE CLAIR, Caroline et al. Impact of maternal undernutrition on diabetes and cardiovascular
1248 disease risk in adult offspring. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 87, n.
1249 3, p. 161-179, 2009.
- 1250 LINDSAY, Karen L. et al. The interplay between nutrition and stress in pregnancy:
1251 implications for fetal programming of brain development. **Biological psychiatry**, v. 85, n. 2,
1252 p. 135-149, 2019.
- 1253 LUCAS, Alan. Programming by early nutrition in man. **The childhood environment and**
1254 **adult disease**, v. 156, p. 38-55, 1991.
- 1255 MAITRA, Saumen K.; RAY, Arun K. Role of light in the mediation of acute effects of a
1256 single afternoon melatonin injection on steroidogenic activity of testis in the rat. **Journal of**
1257 **biosciences**, v. 25, n. 3, p. 253-256, 2000.
- 1258 MANN, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory
1259 organs of reproduction. *Reproduction*, v. 37, n. 1, p. 179-188, 1974.
- 1260 MARINHO, M. S. et al. A atuação do(a) enfermeiro(a) na promoção, incentivo e apoio ao
1261 aleitamento materno. **Revista Enfermagem Contemporânea**, v.4, n. 2, p. 189-198, 2015.
1262 Disponível em: <<https://www5.bahiana.edu.br/index.php/enfermagem/article/view/598>>.
1263 Acesso em: 14 jan. 2021.
- 1264 MARKUS, Regina Pekelman et al. Glândula pineal e melatonina. **Cronobiologia: princípios**
1265 **e aplicações**, v. 3, p. 191-222, 2003.
- 1266 MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, Susan E. Experimental IUGR and later diabetes.
1267 **Journal of internal medicine**, v. 261, n. 5, p. 437-452, 2007.
- 1268 MARTY, M. Sue et al. Development and maturation of the male reproductive system. *Birth*
1269 *Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, v. 68, n. 2, p. 125-
1270 136, 2003.

- 1271 MASCARENHAS, Lucas José Santos et al. Descrição morfológica da glândula pineal de
1272 *Alouatta belzebul*. 2021.
- 1273 MASUYAMA, Hisashi; HIRAMATSU, Yuji. Effects of a high-fat diet exposure in utero on
1274 the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in
1275 adipocytokine gene expression. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2823-2830, 2012.
- 1276 MCARDLE, H. J. et al. Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies
1277 of dietary manipulation in rats—a review. **Placenta**, v. 27, p. 56-60, 2006.
- 1278 MEDEIROS, V. P. B. et al. Benefícios da Amamentação para a Mãe E para a Criança.
1279 **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab202, 2018.
- 1280 MEEKER, John D.; GODFREY-BAILEY, Linda; HAUSER, Russ. Relationships between
1281 serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. **Journal of**
1282 **andrology**, v. 28, n. 3, p. 397-406, 2007.
- 1283 MOTA, ELAINE C. et al. Effects of Malnutrition in the Testis. **Braz J Urol**, v. 27, p. 500-
1284 506, 2001.
- 1285 MOURA, A. S. et al. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in
1286 adult rats undernourished during early lactation. **Research communications in molecular**
1287 **pathology and pharmacology**, v. 96, n. 2, p. 179-192, 1997.
- 1288 MOURA, E. R. B. B. et al. Investigação dos fatores sociais que interferem na duração do
1289 aleitamento materno exclusivo. **Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco**
1290 **Ambiental e Sociedade**, v.8, n.2, p. 94-116, 2015.
- 1291 MURCIA GARCÍA, J. et al. Pubertad y melatonina. In: **Anales de Pediatría**. 2002. p. 121-
1292 126.
- 1293 MURPHY, Margaret O.; COHN, Dianne M.; LORIA, Analia S. Developmental origins of
1294 cardiovascular disease: Impact of early life stress in humans and rodents. **Neuroscience &**
1295 **Biobehavioral Reviews**, v. 74, p. 453-465, 2017.
- 1296 NELSON, Randy J. et al. Photoperiod influences the critical caloric intake necessary to
1297 maintain reproduction among male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). **Biology of**
1298 **Reproduction**, v. 46, n. 2, p. 226-232, 1992.

- 1299 NETO, Júlio Anselmo Sousa; SCALDAFERRI, Paulo Mallard. Melatonina e câncer-revisão
1300 da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n. 1, p. 49-58, 2005.
- 1301 OKATANI, Yuji; SAGARA, Yusuke. Enhanced nocturnal melatonin secretion in women
1302 with functional secondary amenorrhea: relationship to opioid system and endogenous
1303 estrogen levels. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 43, n. 5, p. 194-199, 1995.
- 1304 OLIVARES, A. N. et al. Testicular function of sexually immature rats chronically treated
1305 with melatonin. **Archivos de biologia y medicina experimentales**, v. 22, n. 4, p. 387-393,
1306 1989.
- 1307 OLIVEIRA, C.S.; Iocca F.A.; Carrijo M.L.R.; Garcia R.A.T.M.; Amamentação e as
1308 intercorrências que contribuem para o desmame precoce. **Rev Gaúcha Enferm.** 2015; 36(n.
1309 esp.):16-23.
- 1310 OLIVEIRA, L. S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral
1311 satiety sequence in rats. **Behavioural processes**, 86, 1, 119-124, 2011 “A”.
- 1312 OLIVEIRA, K.M.P.; MARQUES, I.R. Situação do aleitamento materno no Brasil: uma
1313 revisão. **Revista de Enfermagem Unisa**, v.12, n. 1, p.73-78, 2011. Disponível em:
1314 <<http://www.unisa.br/graduacao/biologicas/enfer/revista/arquivos/2011-1-13.pdf>>. Acesso
1315 em: 14 jan. 2021.
- 1316 ORGEBIN-CRIST, M.C & Jahad, N. 1978. The maturation of rabbit epididymal spermatozoa
1317 in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein
1318 synthesis. **Endocrinology**, 103: 46-53
- 1319 OTANI, Lila et al. Role of the renin–angiotensin–aldosterone system in the enhancement of
1320 salt sensitivity caused by prenatal protein restriction in stroke-prone spontaneously
1321 hypertensive rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 892-899, 2012.
- 1322 PARLAKTAS, Bekir S. et al. Os efeitos bioquímicos da lesão isquemia-reperfusão nos
1323 testículos ipsilaterais e contralaterais dos ratos e o papel protetor da melatonina. **Asian**
1324 **Journal of Andrology**, v. 16, n. 2, p. 314, 2014.

- 1325 PASSOS, M. C. F.; RAMOS, C. F.; MOURA, E. G. Short and long term effects of
1326 malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. **Nutrition Research**, v.
1327 20, n. 11, p. 1603-1612, 2000.
- 1328 PATEL, Mulchand S.; SRINIVASAN, Malathi. Metabolic programming in the immediate
1329 postnatal life. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 58, n. Suppl. 2, p. 18-28, 2011.
- 1330 PARIZOTTO, Janaína; ZORZI, Nelci Terezinha. Aleitamento Materno: fatores que levam ao
1331 desmame precoce no município de Passo Fundo, RS. **O mundo da Saúde**, v. 32, n. 4, p. 466-
1332 74, 2008.
- 1333 PEIXOTO-SILVA, Nayara et al. Maternal protein restriction in mice causes adverse
1334 metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. **British journal of**
1335 **nutrition**, v. 106, n. 9, p. 1364-1373, 2011.
- 1336 PELLETIER, G. et al. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and
1337 androgen receptors in the rat reproductive organs. **Journal of Endocrinology**, v. 165, n. 2, p.
1338 359-370, 2000.
- 1339 PENTECOST, Michelle; ROSS, Fiona. The first thousand days: Motherhood, scientific
1340 knowledge, and local histories. **Medical anthropology**, v. 38, n. 8, p. 747-761, 2019.
- 1341 QASEM, Rani J. et al. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein
1342 restriction during gestation and lactation. **Physiology & behavior**, v. 105, n. 5, p. 1182-1193,
1343 2012.
- 1344 QUAY, W. B. Pineal canaliculi: Demonstration, twenty-four-hour rhythmicity and
1345 experimental modification. **American Journal of Anatomy**, v. 139, n. 1, p. 81-93, 1974.
- 1346 RAE, M. T. et al. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult
1347 male and female sheep. **Animal reproduction science**, v. 72, n. 1-2, p. 63-71, 2002.
- 1348 REID, B. L.; CLELAND, K. W. The fine structure and function of the epididymis. I. The
1349 histology of the rat epididymis. **Awt. J. Zool**, v. 5, p. 223-246, 1957.
- 1350 REITER, Russel J. Melatonin and human reproduction. **J Pineal Res.** 2005;38:217-22.

- 1351 REITER, Russel J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological
1352 interactions. **Endocrine reviews**, v. 12, n. 2, p. 151-180, 1991.
- 1353 RHIND, Stewart M.; RAE, Michael T.; BROOKS, A. Nigel. Effects of nutrition and
1354 environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. **Reproduction**, v.
1355 122, n. 2, p. 205-214, 2001.
- 1356 RINALDI, Jaqueline C. et al. Maternal protein malnutrition: effects on prostate development
1357 and adult disease. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 9, n. 4, p.
1358 361-372, 2018.
- 1359 ROA, Ignacio; DEL SOL, Mariano. Morfología de la glándula pineal: revisión de la literatura.
1360 **International Journal of Morphology**, v. 32, n. 2, p. 515-521, 2014.
- 1361 ROCCI E, Fernandes RAQ. Dificuldades no aleitamento materno e influência no desmame
1362 precoce. **Rev Bras Enferm**. 2014; 67(1):22-7.
- 1363 ROCHA-DE-MELO, A. P.; GUEDES, R. C. A. Spreading depression is facilitated in adult
1364 rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period.
1365 **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 663-669, 1997.
- 1366 RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Guadalupe L. et al. Accelerated aging of reproductive capacity
1367 in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and
1368 sperm oxidative stress. **Age**, v. 36, n. 6, p. 1-12, 2014.
- 1369 RODRIGUEZ, J. A.; Favaretto, A. L. V. 1999. Sistema reprodutor. In: **Fisiologia (ed. M. M.**
1370 **Aires)**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 877-917.
- 1371 RONNEKLEIV, Oline K.; OJEDA, Sergio R.; MCCANN, Samuel M. Undernutrition,
1372 puberty and the development of estrogen positive feedback in the female rat. **Biology of**
1373 **Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 414-424, 1978.
- 1374 ROSA, Josiane de Lima. Correlações espermáticas e caracterização de um potencial
1375 biomarcador de fertilidade em seres humanos: proteína espermática SP22. 2019.
- 1376 ROTHHAMMER, Tanja; BOSSERHOFF, Anja-Katrin. Epigenetic events in malignant
1377 melanoma. **Pigment cell research**, v. 20, n. 2, p. 92-111, 2007.

- 1378 ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of
1379 human prostate cancer development. *Endocrine-related cancer*, v. 11, n. 2, p. 225-254, 2004.
- 1380 RUSSELL, L.D.; Ettlín, R.A.; Sinháikin, A.T.; Clegg, E.D. 1990. Histological and
1381 histopathological evaluation of the testis. **Cache River Press**, Clearwater.
- 1382 SANBORN, B. M. et al. Regulation of androgen receptor mRNA in rat Sertoli and peritubular
1383 cells. *Biology of reproduction*, v. 45, n. 4, p. 634-641, 1991.
- 1384 SANTOS, Amanda Alves dos, et al. Aleitamento materno X aleitamento artificial. **Semana**
1385 **de Pesquisa da Universidade Tiradentes**, v. 18, p. 1-4, 2016.
- 1386 SANTOS, Sergio AA et al. Maternal low-protein diet impairs prostate growth in young rat
1387 offspring and induces prostate carcinogenesis with aging. **The Journals of Gerontology:**
1388 **Series A**, v. 74, n. 6, p. 751-759, 2019.
- 1389 SATHISHKUMAR, K. et al. Protein restriction during pregnancy induces hypertension in
1390 adult female rat offspring—influence of oestradiol. **British journal of nutrition**, v. 107, n. 5,
1391 p. 665-673, 2012.
- 1392 SEBERT, Sylvain et al. The early programming of metabolic health: is epigenetic setting the
1393 missing link?. **The American journal of clinical nutrition**, v. 94, n. suppl_6, p. 1953S-
1394 1958S, 2011.
- 1395 SEMBA, Richard D. The rise and fall of protein malnutrition in global health. **Annals of**
1396 **Nutrition and Metabolism**, v. 69, n. 2, p. 79-88, 2016.
- 1397 SERAPHIM, Patrícia Monteiro et al. A glândula pineal e o metabolismo de carboidratos.
1398 **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, p. 331-338, 2000.
- 1399 SHAN, Li-Xin; BARDIN, C. Wayne; HARDY, Matthew P. Immunohistochemical analysis of
1400 androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells.
1401 **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1259-1266, 1997.
- 1402 SHAN, Li-Xin; RODRIGUEZ, Marina C.; JÄNNE, Olli A. Regulation of androgen receptor
1403 protein and mRNA concentrations by androgens in rat ventral prostate and seminal vesicles
1404 and in human hepatoma cells. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 11, p. 1636-1646, 1990.

- 1405 SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. **The physiology of reproduction**, v. 1, p.
1406 1363-1434, 1994.
- 1407 SILVA, Dayane; SOARES, Pablo; MACEDO, Marcos Vinicius. Aleitamento materno: causas
1408 e consequências do desmame precoce. **Unimontes Científica**, v. 19, n. 2, p. 146-157, 2017.
- 1409 SILVA, Denysario Itamyra Soares et al. A importância do aleitamento materno na imunidade
1410 do recém-nascido. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e664974629-
1411 e664974629, 2020.
- 1412 SILVA, Leila Maria Lopes da et al. Determinantes maternos associados à composição
1413 nutricional do leite materno. 2018. **Tese de Doutorado**.
- 1414 SILVA, R. A. et al. Aleitamento materno: fatores que influenciam o desmame precoce.
1415 **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v.5, n.3, p. 01-07, 2015. Disponível em:
1416 <<http://www.gvaa.org.br/revista/index.php/REBES/article/view/3582>>. Acesso em: 19 set.
1417 2021.
- 1418 SILVA, Waléria Ferreira da; GUEDES, Zelita Caldeira Ferreira. Tempo de aleitamento
1419 materno exclusivo em recém-nascidos prematuros e a termo. **Revista CEFAC**, v. 15, p. 160-
1420 171, 2013.
- 1421 SINGH, Mahaveer; JADHAV, Hemant R. Melatonina: funções e ligantes. **Descoberta de**
1422 **drogas hoje**, v. 19, n. 9, p. 1410-1418, 2014.
- 1423 SLOMINSKI, Andrzej et al. Melatonina na pele: síntese, metabolismo e funções. **Tendências**
1424 **em Endocrinologia & Metabolismo**, v. 19, n. 1, p. 17-24, 2008.
- 1425 SOKOL, R. Z. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis as a target for toxicants.
1426 **Comprehensive toxicology**, v. 10, p. 87-98, 1997.
- 1427 STEFULJ, Jasminka et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in
1428 extrapineal tissues of the rat. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 4, p. 243-247, 2001.
- 1429 STOCKER, Claire J.; ARCH, Jonathan RS; CAWTHORNE, Michael A. Fetal origins of
1430 insulin resistance and obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 2, p. 143-151,
1431 2005.

- 1432 SYED, Shariful A.; NEMEROFF, Charles B. Early life stress, mood, and anxiety disorders.
1433 **Chronic Stress**, v. 1, p. 2470547017694461, 2017.
- 1434 TAMURA, Hiroshi et al. Melatonin and pregnancy in the human. **Reproductive Toxicology**,
1435 v. 25, n. 3, p. 291-303, 2008.
- 1436 TEIXEIRA, C.T. et al., 2007. Effects of maternal undernutrition during lactation on
1437 aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. **J**
1438 **Endocrinol**, 192: 301-311.
- 1439 TENORIO, Fernanda das Chagas Angelo Mendes et al. Effects of melatonin and prolactin in
1440 reproduction: review of literature. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, p. 269-
1441 274, 2015.
- 1442 TERRY, K. K. et al. Effects of feed restriction on fertility in female rats. Birth Defects
1443 Research Part B: **Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 74, n. 5, p. 431-441,
1444 2005.
- 1445 THOMAS, Louise et al. Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[125I] iodomelatonin
1446 binding and MT1 gene expression. **Journal of pineal research**, v. 33, n. 4, p. 218-224, 2002.
- 1447 TIJMES, Matias; PEDRAZA, Rodrigo; VALLADARES, Luis. Melatonin in the rat testis:
1448 evidence for local synthesis. **Steroids**, v. 61, n. 2, p. 65-68, 1996.
- 1449 TOLEDO, Fabiola C. et al. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm
1450 parameters in adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 1-9,
1451 2011.
- 1452 TOLEDO, Fabiola C. et al. Restrição protéica in utero= desenvolvimento sexual e
1453 histofisiologia do sistema reprodutivo de ratos machos. 2010.
- 1454 VALENTI, SANDRA et al. In vitro acute and prolonged effects of melatonin on purified rat
1455 Leydig cell steroidogenesis and adenosine 3', 5'-monophosphate production. **Endocrinology**,
1456 v. 136, n. 12, p. 5357-5362, 1995.
- 1457 VERA, H.; TIJMES, Matías; VALLADARES, L. E. Melatonin and testicular function:
1458 characterization of binding sites for 2-[125I]-iodomelatonin in immature rat testes. **Steroids**,
1459 v. 62, n. 2, p. 226-229, 1997.

- 1460 VICTORA, Cesar G. et al. Amamentação no século 21: epidemiologia, mecanismos, e efeitos
1461 ao longo da vida. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 2016.
- 1462 WHO. **Marketing of breast-milk substitutes: national implementation of the**
1463 **international code, status report 2020**. Disponível em:
1464 <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332183/9789240006010-](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332183/9789240006010-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
1465 [eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332183/9789240006010-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 21 jan. 2021.
- 1466 WOO, Michelle MM et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **The**
1467 **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4789-4797, 2001.
- 1468 WU, CHING-SHYI et al. Melatonin inhibits the expression of steroidogenic acute regulatory
1469 protein and steroidogenesis in MA-10 cells. **Journal of andrology**, v. 22, n. 2, p. 245-254,
1470 2001.
- 1471 WU YH, Zhou JN, Balesar R, Unmehopa U, Bao A, Jockers R. Distribution of MT1
1472 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland:
1473 colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. **J**
1474 **Comp Neurol**. 2006;499:897-10.
- 1475 YOUNG, Kelly A.; ZIRKIN, Barry R.; NELSON, Randy J. Testicular regression in response
1476 to food restriction and short photoperiod in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) is
1477 mediated by apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 347-354, 2000.
- 1478 ZAMBRANO, E. et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat
1479 impairs male reproductive development. **The Journal of physiology**, v. 563, n. 1, p. 275-284,
1480 2005.
- 1481 ZAMBRANO, Elena. The transgenerational mechanisms in developmental programming of
1482 metabolic diseases. **Revista de investigacion clinica**, v. 61, n. 1, p. 41-52, 2009.
- 1483 ZHANG, Yue et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to CRH-induced hippocampal
1484 neuron apoptosis. **Experimental cell research**, v. 318, n. 6, p. 732-740, 2012.
- 1485 ZHU, Li-Ji et al. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and
1486 epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. **Biology of reproduction**, v. 63,
1487 n. 2, p. 368-376, 2000.

1489 5. ARTIGO 1
 1490
 1491



CARTA DE ACEITE DE MANUSCRITO
REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde (ISSN 2178-2091)

Informamos que o artigo abaixo foi considerado para publicação na revista.

Título do artigo:

Melatonina como possível terapia para reverter danos testiculares causados pelo desmame precoce: revisão de literatura

Autor/Coautores:

Jose Anderson da Silva Gomes Gomes Renan Gabriel da Silva Ferreira
 Maria Luísa Figueira de Oliveira
 Jennyfer Martins de Carvalho
 João Vitor da Silva
 Aline Maria Rodrigues dos Santos
 Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho Carina Scanoni Maia
 Bruno Mendes Tenorio
 Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio .

WWW.ACERVOMAIS.COM Base presente em todo o Brasil.

sexta-feira, outubro 20, 2023

Dr. Andreazzi Duarte
 Editor-líder da Revista

NOTA:

* O aceite do artigo está sujeito a confirmação do pagamento e documentação conforme as normas da revista.

** O aceite não extingue a possibilidade de correções ou adequações no conteúdo do trabalho.

1492
 1493

1494 6. ARTIGO 2

1495

1496 **Can treatment with exogenous melatonin prevent testicular changes caused by early**
1497 **weaning?**

1498 Short title: Melatonin as a treatment for early weaning

1499

1500 José Anderson da Silva Gomes^{1*}, Renan Gabriel da Silva Ferreira¹, Maria Luísa Figueira de
1501 Oliveira², Jennyfer Martins de Carvalho², Bruno José do Nascimento⁴, Ismaela Maria Ferreira
1502 de Melo⁴, Juliana Pinto de Medeiros¹, Leucio Duarte Vieira Filho², Bruno Mendes Tenorio¹,
1503 Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio¹

1504

1505 ¹ Department of Histology and Embryology, Bioscience Center, Federal University of
1506 Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.1507 ² Department of Physiology and Pharmacology, Bioscience Center, Federal University of
1508 Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.1509 ³ Department of Biochemistry, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Recife,
1510 Pernambuco, Brazil.1511 ⁴ Department of Morphology and Animal Physiology, Rural Federal University of
1512 Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

1513

1514 * Corresponding author: Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenorio. Departamento de
1515 Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco -
1516 UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. Recife, Pernambuco, Brasil, CEP:
1517 50.760-420. Phone: +5581999267009. Email: fernanda.angelo@ufpe.br.

1518

1519 **Keywords:** Malnutrition. Melatonin. Spermatogenesis. Reproduction. Breastfeeding.

1520

Abstract1521 Proper nutrition during the critical period of development has a profound impact on the
1522 maturation of the reproductive structures and functions of mammals. Changes in this pattern
1523 can lead to nutritional imbalance. Among all affected systems, the reproductive system can be
1524 acutely and chronically affected, potentially leading to fertility problems. In this context,
1525 melatonin serves as an adjunct to nutritional therapy in the treatment and reversal of
1526 complications arising from malnutrition. Therefore, the present study aimed to investigate the
1527 activity of melatonin as a tool in reversing testicular damage. For this purpose, Wistar rats

1528 were used, which were divided into 4 experimental groups: control group; early weaning
1529 group; early weaning group treated with melatonin applied at a dose of 200µg per 100g of the
1530 animal's weight; early weaning group treated with the vehicle, composed of ethanol and saline
1531 solution. Except for the control group, all others were weaned on the 16th day after birth.
1532 Body weight was measured weekly, and euthanasia was performed when the animals reached
1533 51 days of age. The testicles were weighed and collected for histopathological, morphometric,
1534 immunohistochemical, and statistical analysis. At the end of the study, it was possible to
1535 identify an increase in body mass in the early weaning group, as well as structural alterations,
1536 where this group showed a reduction in the diameter and height of the seminiferous tubule
1537 epithelium, as well as atrophy, vacuolization, and degeneration of germ cells. Another
1538 observation is that the early weaning group also exhibited reduced production of pachytene
1539 spermatocytes and Sertoli cells. In contrast, the group treated with melatonin showed
1540 improvement in all these analyzed parameters when compared to the control and early
1541 weaning groups. The results of immunohistochemistry also demonstrate that the melatonin-
1542 treated group had PCNA receptor labeling similar to the control group, indicating greater cell
1543 proliferation in this tissue, which was not observed in the other early weaning groups,
1544 including those treated with the vehicle. This demonstrates the restorative role of melatonin in
1545 testicular tissue.

1546

1547 **1. INTRODUCTION**

1548 Child malnutrition is a serious public health problem, and according to data from
1549 UNICEF (United Nations Children's Fund) reports from 2019, malnutrition still affects 238.6
1550 million children under 5 years old worldwide. In Brazil, these numbers are more significant in
1551 the North and Northeast regions, with the highest prevalences being 18.7% and 13.6%,
1552 respectively. According to reports from the Food and Nutrition Surveillance System
1553 (SISVAN) of the Ministry of Health, there are currently 253 Brazilian municipalities with
1554 approximately 10% of children under 5 years old suffering from acute malnutrition, which
1555 represents a total of 69,267 children.

1556 Nutritional deficiency or malnutrition is still considered an alarming public health
1557 issue because the deleterious effects resulting from this condition negatively impact the
1558 dynamics of physiological systems, especially in children (DOS SANTOS, 2017).
1559 Malnutrition is a multifactorial disorder that results in an imbalance between the supply of
1560 energy, nutrients obtained from the diet, and their demand for the body. Therefore, when an
1561 individual experiences a deficiency in the consumption of micro or macronutrients,

1562 malnutrition can develop. Several models of malnutrition are proposed in the literature
1563 (BRONZINO, 1990; PALENCIA, 1996), and among the most used, there is the restriction of
1564 food due to separation from the mother during the lactation period and early weaning
1565 (OLIVEIRA, 2011). The nutritional needs of infants are readily met through exclusive
1566 breastfeeding, and when this is abruptly discontinued, there is subsequently an inadequate
1567 supply of essential components for organic development (ALVES, 2004).

1568 Nutritional insults lead to the excessive production of free radicals and a significant
1569 depletion of antioxidant defenses (TOYOKUNI, 2006). In these situations, there is cellular
1570 and tissue damage and apoptosis, resulting from the activity of compounds such as nitric
1571 oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂), as well as other oxygen radicals, in addition to
1572 pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha, interleukins, and prostaglandins (TSANTES,
1573 2006). This dynamic state causes deficiencies in the immune system, increases the risk of
1574 infection development, and raises the susceptibility to neuropsychomotor development delay
1575 (ALBERDA, 2006).

1576 Most studies that involve the effects of fetal malnutrition, related to offspring
1577 development, are designed for the analysis of the cardiovascular system and its complications
1578 (LANGLEY & JACKSON, 1994; HOET & HANSON, 1999; TORRENS et al., 2003;
1579 SHERMAN & LANGLEY-EVANS, 2000). In the reproductive system, malnutrition can
1580 cause tissue damage, which, if left unresolved, can lead to infertility. This is due to structural
1581 and functional changes that lead to hormonal alterations and compromise the entire system's
1582 functioning (DUDAR & REIPS, 2023).

1583 Supplementation with antioxidant-like compounds, such as melatonin (MEL), can help
1584 promote health and have a protective effect against oxidative processes (BAGANHA, 2018).
1585 This is due to its ability to delay or inhibit the oxidation of an oxidizable substrate, protecting
1586 healthy cells in the body from the oxidative action of free radicals. This characteristic can be
1587 important in mitigating the effects triggered by malnutrition, as these effects are related to the
1588 redox imbalance process.

1589 Melatonin (MEL) is an amphiphilic molecule with the ability to cross the blood-testis
1590 barrier and is synthesized by the pineal gland (REITER, 2001). In addition to modulating
1591 synchronized endogenous rhythms such as the circadian and seasonal cycles, it also acts as an
1592 antioxidant agent during the neonatal period, influencing histogenesis processes (BAYDAS,
1593 2007). The efficiency of melatonin's antioxidant function may be due to its ability to chelate
1594 free radicals and stimulate the production of antioxidant enzymes (REITER, 2007).

1595 Even though the body has effective endogenous defense mechanisms against excessive
1596 free radicals, exogenous antioxidant supplementation is necessary for maintaining health.
1597 Considering that MEL has the ability to cross the blood-testis barrier, in addition to its
1598 antioxidant influence and its role in testicular development, this study aimed to analyze the
1599 hypothesis that melatonin supplementation can be used as a tool to reduce potential damage
1600 caused by malnutrition resulting from early weaning in testicular development.

1601

1602 **2. MATERIALS AND METHODS**

1603 **2.1 EXPERIMENTAL ANIMALS**

1604 This study was approved by the animal experimentation ethics committee of the
1605 Center for Biological Sciences at UFPE under the number 0052/2022, and 35 Wistar rats from
1606 the Department of Pharmacy at the Federal University of Pernambuco were used. Adult
1607 animals were housed in an experimental laboratory with a 12/12-hour inverted light-dark
1608 cycle and a temperature of $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, with access to water and food ad libitum. Mating
1609 occurred after 16 days of adaptation, with animals in cages containing one male for every two
1610 females (MATTARAIA; V. MOURA; A. 2012). Pregnancy was detected through vaginal
1611 smears on the morning following mating, associated with the observation of the presence of
1612 sperm with an increase in the female's body weight (BARRIL et al., 2016).

1613 The day of birth of the pups was considered day zero of the experiment. After birth,
1614 the pups were separated into 8 male neonates based on sex determination performed on the
1615 first day after birth. The pups remained with their mothers until the 16th day when weaning
1616 was performed, and they were separated with an average weight of 15 grams. The
1617 experimental groups were organized according to the treatment method, each containing 8
1618 animals: control group; early weaning group; early weaning group treated with melatonin;
1619 early weaning group treated with vehicle (composed of absolute ethanol and saline solution).

1620 Treatment with Melatonin, powder, $\geq 98\%$ (TLC) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was
1621 carried out according to the methodology proposed by Prata Lima, Baracat, and Simões
1622 (2004). It was administered at a dose of $200\mu\text{g}$ of melatonin for every 100g of body weight of
1623 the animal, through subcutaneous injections in the early evening (18:00). Melatonin was
1624 dissolved in a volume of ethanol (0.02 mL) and diluted in saline solution (0.9% NaCl saline
1625 solution volume). Animals in the vehicle group received 0.9% NaCl solution and 0.02 mL of
1626 ethanol, respectively. The treatment period was 35 days after early weaning.

1627

1628 **2.2 HISTOLOGICAL PROCESSING**

1629 After the treatment period 35 days after weaning, the animals were anesthetized and
1630 euthanized, using a mixture of ketamine hydrochloride (180-270mg/kg) and xylazine (18-
1631 30mg/kg), intraperitoneally. Next, the tissues were collected for fixation with formaldehyde
1632 solution (10% buffered formaldehyde). After this, the testicles were cleaved and subjected to
1633 the histological paraffin embedding technique. The organ fragments were dehydrated in ethyl
1634 alcohol (increasing concentrations of 70%, 80%, 90% and 100%), cleared in xylene,
1635 impregnated, and embedded in paraffin. Subsequently, the sections were subjected to the
1636 Hematoxylin-Eosin (H.E) staining technique, analyzed using a light microscope, brand
1637 OLYMPUS BX-49, and photographed using an OLYMPUS BX-50 photomicroscope.

1638

1639 **2.3 IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS**

1640 Testis sections obtained from paraffin material (5 μ m) from all groups were used for
1641 immunohistochemical detection for PCNA receptor. Initially, the organ sections were
1642 dewaxed with xylene and hydrated with ethanol. The sections were incubated with the
1643 respective antibodies overnight, and were subsequently incubated with PCNA antibody, and
1644 then developed with chromogen substrate 3, 3'diaminobenzidine (DAB) in brown.

1645

1646 **2.4 MORPHOMETRIC ASSESSMENT**

1647 The testes were analyzed morphometrically at 400X magnification using IMAGE G
1648 Imaging software. The height and diameter of the epithelium, area and diameter of the tubule
1649 and lumen; as well as the estimation of the different cell types (Sertoli cell nuclei,
1650 Spermatocyte in the pachytene phase and spermatids) that make up the seminiferous
1651 epithelium at stage 7 of the cycle were measured according to the method described by
1652 Tenorio *et al.*, 2014.

1653

1654 **2.5 STATISTICAL ANALYSIS**

1655 Thus, Kruskal – Wallis was performed followed by the Dunn test. Differences were
1656 considered statistically significant at a probability level of 5% ($P < 0.05$). The analyzes were
1657 carried out using the GraphPad Prism8® computational software.

1658

1659 **3. RESULTS**

1660 **3.1 ANIMALS WEIGHT, ORGAN WEIGHT AND GONADOSOMATIC INDEX**

1661 Statistical analysis of the weight testicles revealed that animals treated with melatonin
1662 and the vehicle, as well as the early weaning group, had no significant difference when

1663 compared to the results of the control group. On the other hand, in relation to the body mass
 1664 of the animals, there was a significant increase in the weight of the animals in the early
 1665 weaning and the vehicle group when compared with the control. The early weaning group
 1666 treated with melatonin presented like the control (Table 1).

1667

1668 **Table 1.** Mean (\pm standard deviation) GSI of the testicles (g) of animals in the experimental groups and Mean (\pm
 1669 standard deviation) animal weight (g) of the experimental groups.

PARAMETERS/GROUPS	CONTROL	DP+VEHICLE	DP	DP+MEL	P
Right Testicle	0,81 \pm 0,19a	0,97 \pm 0,11a	0,75 \pm 0,28a	0,93 \pm 0,11a	0,058
Left Testicle	0,77 \pm 0,19a	1,11 \pm 0,23a	0,89 \pm 0,24a	0,85 \pm 0,12a	0,051
Weight Animals	165,25 \pm 25,01 a	189,75 \pm 26,25 b	193,75 \pm 26, 70b	153,5 \pm 16,31 a	0,016

1670 *Means followed by the same letter in the lines do not differ significantly from each other using the Kruskal-
 1671 Wallis test followed by Dunn's post-hoc test ($P > 0.05$).

1672

1673 3.2 MORPHOMETRIC ASSESSMENT OF THE TESTICLES

1674 Table 2 shows the morphometric parameters of the testes of the Control, DP+V, DP
 1675 and DP+MEL groups. Statistical analysis demonstrated that the diameter of the seminiferous
 1676 tubules was significantly reduced in animals subjected to early weaning and the vehicle when
 1677 compared to the control group. The early weaning group treated with melatonin presented like
 1678 the control.

1679 Regarding the height of the epithelium, it was also possible to observe a significant
 1680 reduction in the DP group and the vehicle, when compared to the DP+MEL group. It can also
 1681 be noted that the DP group and the vehicle had a reduction in spermatocyte count I, in the
 1682 pachytene phase, when compared to the control and DP+MEL groups, which in both
 1683 parameters presented like the control. There was also a significant reduction in Sertoli cell
 1684 counts in the DP group and the vehicle when compared to the control and DP+MEL groups
 1685 (Table 2).

1686

1687 **Table 2.** Mean (\pm standard deviation) of testicular components of animals in experimental groups.

PARAMETERS/GROUPS	CONTROL	DP+VEHICLE	DP	DP+MEL	P
Diameter	257.89±21,73a	219.50±30,74b	220.01±11,72b	245.32±17,58a	0.006*
Epithelium Height	51.99±12,34a	30.45±10,67b	30.18±11,13b	63.82±7,19a	0.000*
Spermatocyte in the pachytene phase	73.67±9,58a	58.99±12,23b	52.94±6,07b	77.45±8,24a	0.000*
Rounded spermatids	219.20±44,96a	198.69±40,33ab	150.50±22,34b	240.70±28,9a	0.002*
Sertoli	16.975±3,45a	13.6375±5,42b	12.7175±1,16b	21.85±1,65a	0.001*

1688 *Means followed by the same letter in the lines do not differ significantly from each other using the Kruskal-
 1689 Wallis test followed by Dunn's post-hoc test (P>0.05).

1690

1691 3.3 MORPHOLOGICAL ANALYSIS AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION: 1692 OF THE TESTICLES

1693 The testicles of the animals belonging to the control group were well preserved,
 1694 surrounded by a dense capsule of connective tissue and the tunica albuginea. It presented
 1695 numerous seminiferous tubules, which were lodged coiled within the loose connective
 1696 tissue, formed by a germinal epithelium sitting on the basal lamina and connective tissue
 1697 formed by flattened myoid cells and fibroblasts. In the seminiferous epithelium, abundant
 1698 spermatocytes and spermatids were observed. In the interstitial space, Leydig cells and
 1699 blood vessels were observed (Figure 4C). In the tubules of animals in the DP group,
 1700 seminiferous tubules with intense vacuolization in the seminiferous epithelium were noted,
 1701 demonstrating a possible increase in the induction of cells undergoing apoptosis (Table 3,
 1702 Figure 4B). In relation to the DP+MEL group, it was possible to observe a decrease in the
 1703 vacuolation of germinal epithelium cells (Table 4, Figure 4D). All groups were positive for
 1704 the presence of spermiation and sperm in the tubular lumen (Table 3).

1705

1706 **Table 3.** Histopathological evaluation of the testicular components of animals in the experimental groups.

PARAMETERS/GROUPS	CONTROL	DP+VEHICLE	DP	DP+MEL
Atrophy of the seminiferous tubules	-	+	+	-
Reduction of the seminiferous epithelium	-	-	-	-
Thickening of the tunic proper	-	-	-	-
Desquamation of the seminiferous epithelium	-	-	-	-
Vacuolation in germ cells	-	+	+	+
Edema of elongated spermatids	-	-	-	-
Vacuolation in Sertoli cells	-	-	-	-
Giant Syncytial Cells	-	-	-	-
Germ cell degeneration	-	+	-	+
Sertoli cell degeneration	-	-	-	-
Leydig cell degeneration	-	-	-	-
Increase in the size of Leydig cells	-	-	-	-
Reduction in the size of Leydig cells	-	-	-	-
Increased intertubular tissue	-	-	-	-

Presence of cellular debris	-	-	-	-
-----------------------------	---	---	---	---

Fibrosis	-	-	-	-
----------	---	---	---	---

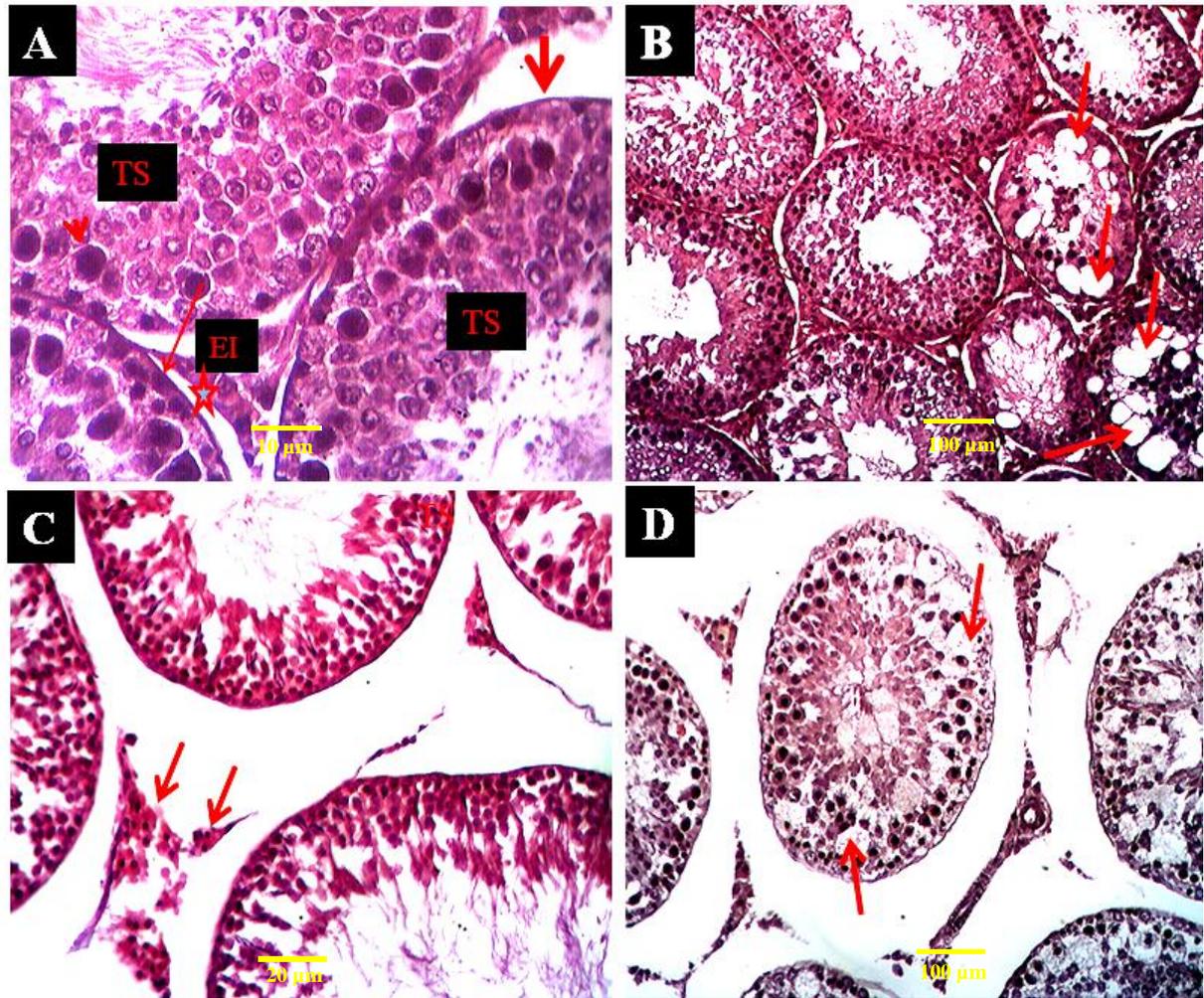
Congestion	-	-	-	-
------------	---	---	---	---

Inflammation	-	-	-	-
--------------	---	---	---	---

Leukocyte infiltrate	-	-	-	-
----------------------	---	---	---	---

Presence of Spermiation	+	+	+	+
-------------------------	---	---	---	---

Sperm in the tubular lumen	+	+	+	+
----------------------------	---	---	---	---



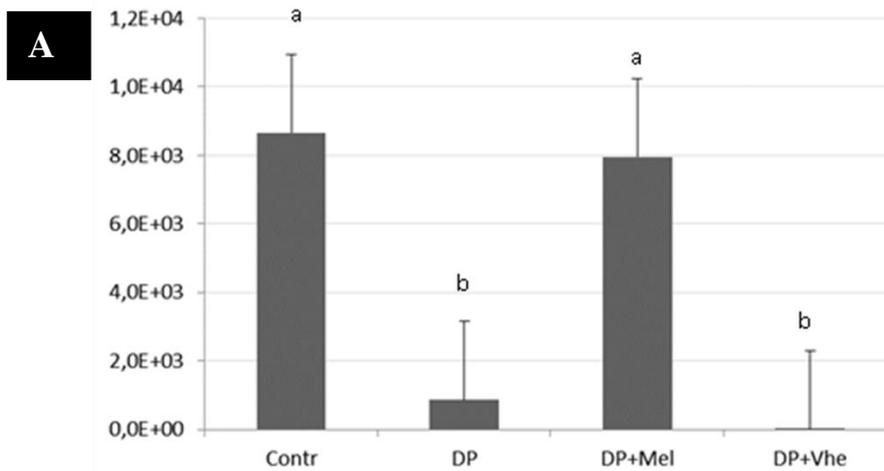
1708
1709

1710 **Fig 1** Photomicrograph of the testis of rats 51 postnatal days. A: control - seminiferous tubules (TS), tunica
1711 albuginea (thick arrow), spermatogonia (long arrow), interstitial space (IS), leydig cell (star), spermatogonia
1712 in pachytene (arrowhead). B: DP- germinal epithelium with great tubular vacuolization (arrows). C: DP+V-
1713 arrows show Leydig cells in the interstitial tissue. D: DP+Mel- seminiferous tubules with less vacuolation of
1714 the seminiferous epithelium. H-E staining.

1715

1716 3.3 IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS

1717 Regarding immunohistochemistry to evaluate PCNA, the results showed that
1718 animals in the DP+MEL group showed similar staining to the control group. It was also
1719 demonstrated that animals in the DP and DP+Vhe groups showed low PCNA labeling in
1720 relation to the control (figure 2).



1721

1722

1723 **Fig 2** Immunohistochemistry for cell proliferation in the testicles of the experimental groups. A)
 1724 Quantification in pixels of immunostaining. *Means followed by the same letter in the lines do not differ
 1725 significantly from each other using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test ($P>0.05$).

1726

1727 4. DISCUSSION

1728 The maintenance of endocrine homeostasis is essential in male sexual
 1729 development, including the maturation and maintenance of the testicular structure
 1730 (FERNANDEZ-FERNANDEZ et al., 2006). However, early weaning can lead to several
 1731 changes in the most varied organic systems, including the reproductive system (GUZMAN
 1732 et al., 2006).

1733 The antioxidant actions of melatonin are well established, determining a testicular
 1734 protective role in reducing damage caused by free radicals. Thus, the present study showed
 1735 a significant decrease in tubular diameter, as well as spermatocyte and spermatid count in
 1736 early weaned animals, which confirms previous studies (PARLAKTAS et al., 2014.), in
 1737 which they used albino rats and subjected the testicles to ischemia reperfusion (I/R) injury
 1738 and then treated with melatonin. The administration of melatonin caused a significant
 1739 decrease in lipid peroxidation activities, as well as the enzyme in the ipsilateral testicle, in
 1740 addition to reducing the deleterious effects of I/R injury in the ipsilateral testicles of rats. In
 1741 another study working in vitro, researchers were able to measure the antioxidant potential of
 1742 melatonin in fluorimetry microplates, when compared with other antioxidant agents such as
 1743 vitamin E, with melatonin showing much higher efficiency, even with a greater decay in the
 1744 ORAC curve., which calculated the concentrations of the antioxidant agent over time
 1745 (PIERI et al., 1994).

1746 In the present work on early weaning in rats, it has been demonstrated that,
1747 although the administration of melatonin does not change testicular weight, it can promote a
1748 significant increase in the diameter of the seminiferous tubules, approaching control values.
1749 It was also found that the animals in the early weaning group had an increase in body
1750 weight when compared to the group treated with melatonin, as well as the control group, a
1751 finding that corroborates previous studies (FERREIRA, 2014), in which used albino rats
1752 from Wistar lineage, divided into 2 groups: control and pinealectomized. The results found
1753 by the researchers indicated that the removal of the pineal caused an increase in food
1754 consumption, associated with weight gain. It was also demonstrated that the therapeutic
1755 replacement of melatonin in control animals led to the regularization of body weight,
1756 preventing the normal increase in aging. Thus, demonstrating that melatonin may have acted
1757 as an important agent in reducing body fat, resulting from the reduction of fat in the
1758 periepididymal and retroperitoneal adipose tissues.

1759 Furthermore, one of the possible explanations is that the observed difference in
1760 body mass may be attributed to the presence of non-nutritional factors in breast milk, such
1761 as EGF and leptin, as well as differences in postprandial hormonal feedback (LUCAS et al.,
1762 1980; PICÓ et al., 2008). In this context, studies have shown that the use of a leptin
1763 antagonist as a treatment between the 2nd and 13th day of life led to a significant increase
1764 in weight and body fat in adult rats. Additionally, there was evidence that physiological
1765 doses of orally administered leptin during lactation prevented weight gain and obesity in
1766 adult rats, even when these animals were subjected to a high-fat diet. This is precisely due
1767 to the reduction in leptin levels that regulate appetite control mechanisms, leading to a
1768 decrease in appetite (KUNZ et al., 2008).

1769 According to Rogero et. al. (2010), breast milk contains hormones and growth
1770 factors that can influence adiposity by reducing food intake and increasing energy
1771 expenditure and by inhibiting adipocyte differentiation and reducing the accumulation of
1772 lipids in cells, corroborating our findings. results.

1773 Changes in the height of the seminiferous epithelium were also evident in animals
1774 weaned early in relation to animals that were treated with melatonin. These data corroborate
1775 the study by Vargas et al, (2011.) in which a decrease in the height of the epithelium was
1776 demonstrated. tubular in animals, in this case subjected to chronic hypoxia.

1777 The present study demonstrated that despite the injuries caused by early weaning,
1778 a significant reduction in the gonadosomatic index was not found; which would be one of
1779 the main findings that we could notice, since it reflects the relationship of the gonads with

1780 the animal's body mass, providing changes in energy metabolism, as well as nutritional
1781 status (MAXWELL; DUTTA, 2005). Despite this, he observed histopathological changes in
1782 the testicles of the experimental groups studied.

1783 Although the literature reports the most varied harmful effects resulting from early
1784 weaning at the reproductive level (LÉONHARDT et al., 2003), such as the drastic
1785 retardation of testicular growth, as well as reduction in the cross-sectional area of the
1786 intratubular lumen of the seminiferous tubules, it was A reduction in circulating levels of
1787 FSH in male puppies was also noted, without affecting the concentrations of LH and
1788 testosterone. In this study it was demonstrated that these changes were accentuated mainly
1789 at the level of epithelium and germ cells, when compared to the control group. Another
1790 interesting piece of information is that there was a reduction in the number of Sertoli cells,
1791 which corroborates studies carried out by Genovese et al., (2010), demonstrating that
1792 malnutrition has a detrimental role in the maintenance and quantity of Sertoli cells, even
1793 than in the postnatal period.

1794 On the other hand, melatonin acted to maintain the number of Sertoli cells, as well
1795 as their integrity, when compared to the control group. To test whether malnutrition during
1796 prepubertal life would have lasting effects on testicular histology in adult male offspring,
1797 the researchers separated rat pups and observed that in the weaning group, at 100 days of
1798 age, body weight, testicular weight, The number of Sertoli cells per cross-section of the
1799 seminiferous tubule and per testis were significantly significant in weaned animals when
1800 compared to the control group. Thus, it can be inferred that pre-pubertal malnutrition is
1801 accompanied by changes in testicular structure and lower numbers of Sertoli cells in
1802 adulthood, strongly suggesting lower daily sperm production.

1803 Histopathological analysis of the experimental groups demonstrated vacuolation in
1804 germ cells, with a higher proportion in the early weaning group. This can be explained by a
1805 possible presence of cell death, which is expected with the increase in adverse effects
1806 resulting from malnutrition (FUCHS et al., 2010).

1807 According to Batissaco (2018), treatment with melatonin did not show any
1808 influence on the clinical characteristics of the testicle, however, it showed an improvement
1809 in vigor, total motility, and mitochondrial potential 15 days after its application.
1810 Furthermore, melatonin reduced HDL and cholesterol values. The treatment of testicular
1811 degeneration in bulls using exogenous melatonin in a slow-release vehicle, at a dose of 18
1812 mg/kg, was efficient in improving sperm vigor, motility, and mitochondrial potential
1813 characteristics.

1814 In addition, according to Karabulut et al., (2020), melatonin has protective and
1815 therapeutic effects on testicular tissue, as according to their results, this hormone contributes
1816 to the recovery of testicular tissue, reducing the expressions of HSP 70 and HSP 90
1817 increased both in the spermatogenic cell line and in the connective tissue between the
1818 seminiferous tubules.

1819 Regarding immunohistochemical analyzes to evaluate the expression of
1820 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in testicular tissue, the present work demonstrated
1821 that melatonin led to an increase in cell proliferation when compared to the control group,
1822 which corroborates the work by (D'Andrea 2008), in which researchers assessed that PCNA
1823 is elevated in testicular tissue, demonstrating a high rate of cell proliferation, but the
1824 toxicity model was used in the work. In another research carried out by (Kanter 2010), it
1825 was demonstrated that reperfusion ischemia injuries, which also lead to an increase in
1826 reactive oxygen species, that were treated with melatonin showed an increase in PCNA in
1827 the testicles treated with this hormone. Another study that evaluated the effects of
1828 melatonin, through its antioxidant and cytoprotective activity, was in relation to the damage
1829 caused by arsenic. This study once again proved that melatonin had antiapoptotic and
1830 antioxidant effects and led to increased expression of PCNA (UYGUR *et al.*, 2016).

1831 It can be concluded that the malnutrition process alters the weight of the animals, as
1832 well as testicular morphology, such as the production of free radicals leading to oxidative
1833 stress and an increase in the number of tubular vacuolizations, thus resulting in a higher
1834 quantity of cells undergoing apoptosis. Melatonin may be capable of promoting reversible
1835 and protective effects against the damage in this organ, maintaining the germinal
1836 epithelium, as well as the proliferation of germ cells (spermatocytes in the pachytene phase
1837 and round spermatids).

1838

1839 **5. DECLARATION OF INTEREST**

1840 The authors report no declarations of interest.

1841

1842 **6. FUNDING**

1843 This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
1844 (CAPES) under the process number 88887.678859/2022-00; and Federal University of
1845 Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

1846

1847 **7. AUTHOR CONTRIBUTIONS**

1848 Performed the pregnancy induction and detection: Silva JV; Performed the early weaning:
 1849 Santos AMR; Performed the animal's treatment with melatonin: Gomes, Ferreira RGS;
 1850 Prepared the histological processing: Gomes JAS, Ferreira RGS; Performed the biochemical
 1851 assay: Gomes JAS, Carvalho EMMM; Performed the hormone assay: Gomes JAS, Oliveira
 1852 MLF; Performed the assessment of oxidative stress: Carvalho JM, Filho LDV; Performed
 1853 the immunohistochemical analysis: Gomes JAS, Ferreira RGS; Performed the
 1854 histopathological analysis: Tenorio FCAM, Tenorio BM; Performed the analysis of animal
 1855 weight, testis and gonadosomatic index: Gomes JAS, Tenorio FCAM; Performed
 1856 histomorphometric analysis: Gomes JAS, Tenorio BM; Performed the computer analysis:
 1857 Tenorio BM, Tenorio FCAM; Wrote this manuscript: Gomes JAS, Tenorio FCAM.

1858

1859 **8. REFERENCES**

- 1860 [1] dos Santos, C. A., Firmino, H. H., Esmeraldo, M. L. F., Alfenas, R. D. C. G., Barbosa, C.
 1861 O., & Ribeiro, A. Q. (2017). Perfil nutricional e fatores associados à desnutrição e ao óbito
 1862 em pacientes com indicação de terapia nutricional. *Braspen J*, 32(1), 30-5.
- 1863 [2] Bronzino, J. D., Austin-LaFrance, R. J., & Morgane, P. J. (1990). Effects of prenatal
 1864 protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. *Brain Research*, 515(1-2), 45-50.
- 1865 [3] Palencia, G., Calvillo, M., & Sotelo, J. (1996). Chronic malnutrition caused by a
 1866 corn-based diet lowers the threshold for pentylentetrazol-induced seizures in rats.
 1867 *Epilepsia*, 37(6), 583-586.
- 1868 [4] dos Santos Oliveira, L., da Silva, L. P., da Silva, A. I., Magalhães, C. P., de Souza, S. L.,
 1869 & de Castro, R. M. (2011). Effects of early weaning on the circadian rhythm and
 1870 behavioral satiety sequence in rats. *Behavioural processes*, 86(1), 119-124.
- 1871 [5] Alves, J. G. B. (2004). Baixo peso ao nascer e desmame precoce: novos fatores de risco
 1872 para aterosclerose. *Jornal de Pediatria*, 80, 339-340.
- 1873 [6] Toyokuni, S. (2006). Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis.
 1874 *Antioxidants & redox signaling*, 8(7-8), 1373-1377.
- 1875 [7] Tsantes, A. E., Bonovas, S., Travlou, A., & Sitaras, N. M. (2006). Redox imbalance,
 1876 macrocytosis, and RBC homeostasis. *Antioxidants & redox signaling*, 8(7-8), 1205-1216.
- 1877 [8] Alberda, C., Graf, A., & McCargar, L. (2006). Malnutrition: etiology, consequences, and
 1878 assessment of a patient at risk. *Best practice & research clinical gastroenterology*, 20(3),
 1879 419-439.
- 1880 [9] Langley, S. C., & Jackson, A. A. (1994). Increased systolic blood pressure in adult rats
 1881 induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clinical science*, 86(2), 217-222.

- 1882 [10] Hoet, J. J., & Hanson, M. A. (1999). Intrauterine nutrition: its importance during critical
1883 periods for cardiovascular and endocrine development. *The Journal of physiology*, 514(3),
1884 617-627.
- 1885 [11] Torrens, C., Brawley, L., Barker, A. C., Itoh, S., Poston, L., & Hanson, M. A. (2003).
1886 Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery
1887 function in pregnant offspring. *The Journal of Physiology*, 547(1), 77-84.
- 1888 [12] SHERMAN, R. C., & LANGLEY-EVANS, S. C. (2000). Antihypertensive treatment in
1889 early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat.
1890 *Clinical Science*, 98(3), 269-275.
- 1891 [13] Baganha, S. C., & Pereira, É. A. A. (2018). AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E O
1892 CONSUMO DE ANTIOXIDANTES DURANTE TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.
- 1893 [14] Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., & Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of
1894 melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell*
1895 *biochemistry and biophysics*, 34, 237-256.
- 1896 [15] Baydas, G., Koz, S. T., Tuzcu, M., Etem, E., & Nedzvetsky, V. S. (2007). Melatonin
1897 inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams.
1898 *Journal of pineal research*, 43(3), 225-231.
- 1899 [16] Reiter, R., Tan, D. X., Terron, M., Flores, L., & Czarnocki, Z. (2007). Melatonin and its
1900 metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions.
1901 *Acta Biochimica Polonica*, 54(1), 1-9.
- 1902 [18] Mattaraia, V. G. D. M., & Moura, A. S. A. M. T. (2012). Productivity of Wistar rats in
1903 different mating systems. *Ciência Rural*, 42, 1490-1496.
- 1904 [19] Barril, N., Grisotto, A. C. D., Coelho, A. C. T. E. R., Pereira, G. H., & Garcia, J. C.
1905 (2016). Implantação da técnica de citologia vaginal para a identificação e monitorização
1906 das fases do ciclo estral em ratas wistar. *CuidArte, Enferm*, 162-164.
- 1907 [20] de Araújo Silva, E. F., da Silva Gomes, J. A., de Oliveira, M. L. F., de Carvalho, A. G.
1908 A. F., Magalhães, C. P., da Silva, J. V., ... & Tenorio, F. D. C. A. M. (2023). Protective
1909 effect of exogenous melatonin on testicular histopathology and histomorphometry of adult
1910 rats with domperidone-induced hyperprolactinemia. *Reproductive Biology*, 23(3), 100791.
- 1911 [21] Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues
1912 by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- 1913 [22] Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein
1914 sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.

- 1915 [23] Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of
1916 epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*,
1917 247(10), 3170-3175.
- 1918 [24] Aebi, H. (1974). Catalase. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 673-684). Academic
1919 press.
- 1920 [25] Tenorio, B. M., Ferreira Filho, M. B. A., Jimenez, G. C., Morais, R. N. D., Peixoto, C.
1921 A., Nogueira, R. D. A., & Silva Junior, V. A. D. (2014). Extremely low-frequency
1922 magnetic fields can impair spermatogenesis recovery after reversible testicular damage
1923 induced by heat. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 33(2), 139-146.
- 1924 [26] RUSSELL, Lonnie D.; DE FRANÇA, Luiz Renato. Building a testis. *Tissue and Cell*, v.
1925 27, n. 2, p. 129-147, 1995.
- 1926 [27] Fernandez-Fernandez, R., Martini, A. C., Navarro, V. M., Castellano, J. M., Dieguez, C.,
1927 Aguilar, E., ... & Tena-Sempere, M. (2006). Novel signals for the integration of energy
1928 balance and reproduction. *Molecular and cellular endocrinology*, 254, 127-132.
- 1929 [28] Guzman, C., Cabrera, R., Cardenas, M., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E.
1930 (2006). Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters
1931 reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *The Journal*
1932 *of physiology*, 572(1), 97-108.
- 1933 [29] Parlaktas, B. S., Atilgan, D., Ozyurt, H., Gencten, Y., Akbas, A., Erdemir, F., &
1934 Uluocak, N. (2014). The biochemical effects of ischemia-reperfusion injury in the
1935 ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. *Asian*
1936 *Journal of Andrology*, 16(2), 314.
- 1937 [30] Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., & Marcheselli, F. (1994). Melatonin: a
1938 peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life sciences*, 55(15), PL271-
1939 PL276.
- 1940 [31] Ferreira, R. F. D. (2014). Efeitos da reposição terapêutica central de melatonina em
1941 animais pinealectomizados-implicações no comportamento alimentar e peso corporal
1942 (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- 1943 [31] Lucas, A., Blackburn, A. M., Aynsley-Green, A., Sarson, D. L., Adrian, T. E., & Bloom,
1944 S. R. (1980). Breast vs bottle: endocrine responses are different with formula feeding. *The*
1945 *Lancet*, 315(8181), 1267-1269.
- 1946 [32] Pico, C., Oliver, P., Sanchez, J., Miralles, O., Caimari, A., Priego, T., & Palou, A.
1947 (2007). The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity
1948 in later life. *International journal of obesity*, 31(8), 1199-1209.

- 1949 [33] Kunz, I., Meier, M. K., Bourson, A., Fisseha, M., & Schilling, W. (2008). Effects of
1950 rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor ligand, on energy expenditure in lean rats.
1951 *International journal of obesity*, 32(5), 863-870.
- 1952 [34] Rogero, M. M., Borges, M. C., Pires, I. S. D. O., & Tirapegui, J. (2010). O desmame
1953 precoce afeta o ganho de peso e a composição corporal em camundongos adultos?. *Revista*
1954 *de Nutrição*, 23, 85-93.
- 1955
- 1956 [35] Vargas, Á., Bustos-Obregón, E., & Hartley, R. (2011). Effects of hypoxia on epididymal
1957 sperm parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. *Biological research*,
1958 44(2), 161-167.
- 1959 [36] Maxwell, L. B., & Dutta, H. M. (2005). Diazinon-induced endocrine disruption in
1960 bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(1), 21-
1961 27.
- 1962 [37] LÉONHARDT, Marion et al. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-
1963 gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of
1964 puberty. *Biology of reproduction*, v. 68, n. 2, p. 390-400, 2003.
- 1965 [38] Genovese, P., Núñez, M. E., Pombo, C., & Bielli, A. (2010). Undernutrition during foetal
1966 and post-natal life affects testicular structure and reduces the number of Sertoli cells in the
1967 adult rat. *Reproduction in domestic animals*, 45(2), 233-236.
- 1968 [39] Fuchs, L. F. P., Guimarães, C. R., Maganhin, C. C., Simões, R. S., Baracat, M. C. P.,
1969 Soares Júnior, J. M., & Baracat, E. C. (2010). Melatonin action in apoptosis and vascular
1970 endothelial growth factor in adrenal cortex of pinealectomized female rats. *Revista*
1971 *Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 32, 374-380.
- 1972 [40] Batissaco, L. (2018). Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e
1973 seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e
1974 hemodinâmica testicular e características espermáticas (Doctoral dissertation, Universidade
1975 de São Paulo).
- 1976 [41] Karabulut, D., Akın, A. T., Sayan, M., Kaymak, E., Ozturk, E., & Yakan, B. (2020).
1977 Efectos de la Melatonina Contra la Toxicidad Testicular Inducida por Tioacetamida en
1978 Ratas. *International Journal of Morphology*, 38(5), 1455-1462.
- 1979 [42] D'Andrea, M., Lawrence, D., Nagele, R. G., Wang, C. Y., & Damiano, B. P. (2008).
1980 PCNA indexing as a preclinical immunohistochemical biomarker for testicular toxicity.
1981 *Biotechnic & Histochemistry*, 83(5), 211-220.
- 1982

- 1983 [43] Kanter, M. (2010). Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced
1984 ischemia–reperfusion injury in rats. *Experimental and molecular pathology*, 89(3), 314-320.
1985
1986 [44] Uygur, R., Aktas, C., Caglar, V., Uygur, E., Erdogan, H., & Ozen, O. A. (2016).
1987 Protective effects of melatonin against arsenic-induced apoptosis and oxidative stress in rat
1988 testes. *Toxicology and Industrial Health*, 32(5), 848-859.
1989
1990
1991

1992 7. CONCLUSÕES

1993 Conclui-se que o processo de desnutrição altera o peso dos animais, bem como a
1994 morfologia testicular, a exemplo da produção de radicais livres que cursam com estresse
1995 oxidativo e aumento do número de vacuolizações tubulares, cursando dessa forma com um
1996 maior quantitativo de células em apoptose. Podendo a melatonina ser capaz de promover
1997 efeitos reversíveis e protetores contra os danos neste órgão, mantendo o epitélio germinativo,
1998 bem como a proliferação das células germinativas (espermatócitos na fase de paquíteno e
1999 espermátides arredondadas).

2000

2001

2002

2003

2004

2005

2006

2007

2008

2009

2010

2011

2012

2013

2014

2015

2016

2017

2018

2019

2020

2021

2022

2023

2024

2025

2026

2027

2028

2029

2030

2031

2032

2033

2034

2035

2036
2037
2038
2039
2040

ANEXOS
ANEXO A – Protocolo de Aprovação de Comitê/Comissão de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos/ Animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brazil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 25 de agosto de 2023

Ofício nº 62/23

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenorio
Departamento de Histologia e Farmacologia/CB
Processo nº0052/2022

Certificamos que a proposta intitulada “**Melatonina exógena como ferramenta para o tratamento dos efeitos do desmame precoce nos testículos de ratos wistar**”, Registrado como nº0052/2022 sob a Responsabilidade do **Prof. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenorio** Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 25/07/2023

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/10/2023 a 28/02/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	35 animais
Peso/Idade	45g/ 35 dias macho/360g/ 90 dias Femea
Sexo	Macho (33) e Femea (02)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 -Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

2041