

EFFECTS OF MALNUTRITION IN THE TESTIS

ELAINE C. MOTA, ALBA M. SANTOS, FABIANE P. TOSTE, FRANCISCO J.B. SAMPAIO,
CRISTIANE F. RAMOS

Laboratory of Molecular Biology, Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro
(UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Androgens are important to spermatogenesis in the testes, to sperm maturation in the epididymis and to development and function of male accessory glands. The goal of this study is to investigate the effect of mother's malnutrition in the androgen receptor expression of post-weaning rat testis.

Material and Methods: At delivery, Wistar rats were assigned to one of the following groups: control (C) = diet with 23% of protein; protein-restricted (PR) = diet with 8% of protein; energy-restricted (ER) = diet with 23% of protein in restricted quantities, according to the ingestion of PR group. At the end of lactation period, the animals were sacrificed, the testes excised, weighted and the androgen receptor determined by Western blotting technique.

Results: Testicular weight was significantly lower ($p < 0.001$) in both groups at the end of lactation, when compared to controls (64.7% in the PR and 60.1% in the ER group). Both PR and ER groups had a significant ($p < 0.001$) increase in the relative quantity of androgen receptor, but this increment was higher in the PR group.

Conclusion: The observed increase in the relative quantity of androgen receptor in response to the maternal malnutrition can be consequent to alterations in the serum concentrations of gonadotropins, estrogen and androgen, since the androgen receptors are regulated by these factors.

Key words: testis; malnutrition; rats; androgen receptor; Western blotting
Braz J Urol, 27: 500-506, 2001

INTRODUÇÃO

Os hormônios androgênicos são importantes para a manutenção da espermatogênese no testículo, para a maturação do espermatozóide no epidídimo e para o desenvolvimento e funções dos órgãos sexuais acessórios masculinos (1).

Através de técnicas de imunocitoquímica, o receptor de androgênio (AR) foi localizado em tecidos do sistema reprodutor de homens e ratos de ambos os sexos (2,3). O receptor de androgênio é uma proteína com peso molecular entre 100 e 110 kd (4), já tendo sido clonada (5,6).

Os níveis de AR são regulados por androgênio nas células de Sertoli de animais adultos (7,8), enquanto em animais imaturos o hormônio folículo estimulante (FSH) parece ser o principal regulador (9,10). Shan et al. (11) demonstraram ainda que nas células de Leydig ocorre o inverso, os níveis de AR são estimulados por androgênios nos animais imaturos, não tendo efeito nos animais adultos.

Cardone et al. (12) utilizando cultura de células testiculares demonstraram que tanto estrogênios como androgênios podem autoregular a expressão dos RNA mensageiros dos seus próprios receptores, e ainda que os estrogênios podem diminuir a expressão dos RNA mensageiros nos receptores de

androgênio. Foi demonstrado que o androgênio circulante, independente do conteúdo luminal, é responsável pela regulação da expressão dos receptores de androgênio (13).

A restrição alimentar pode inibir tanto a manutenção como o início da capacidade reprodutiva (14,15). Camundongos adultos submetidos à restrição alimentar de 30% por até 8 semanas apresentam redução de 42% na concentração de testosterona sérica, redução de 27% na massa testicular e um aumento na apoptose, que pode ser responsável pela regressão testicular que ocorre em resposta à restrição alimentar (16).

Não encontramos na literatura estudos sobre os efeitos da desnutrição materna no período de lactação sobre os tecidos do sistema urogenital de ratos. Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar a expressão dos receptores de androgênio nos testículos de filhotes de ratas lactantes desnutridas.

MATERIAL E MÉTODOS

Ratas Wistar fêmeas, nulíparas, foram mantidas em biotério com temperatura estável ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00h - 19:00h) controlados. Foram utilizados os princípios descritos em "The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" para os cuidados no uso e manuseio dos animais (17).

Aos 3 meses de idade estes animais foram acasalados na proporção de 2 fêmeas para 1 macho, recebendo ração comercial (23% de proteína) até o nascimento dos filhotes, quando então foram divididas em 3 grupos de tratamento:

- 1)- Controle (C): com livre acesso a água e a dieta normal (ração comercial com 23% de proteína).
- 2)- Restrição protéica (RP): com livre acesso a água e a dieta hipoprotéica (8% de proteína).
- 3)- Restrição calórica (RC): com livre acesso a água, porém submetido a dieta normal (ração comercial com 23% de proteína) restrita às mesmas quantidades ingeridas no dia anterior pelo grupo em dieta hipoprotéica.

O grupo de animais em restrição calórica, pareados pela quantidade de ração ingerida pelo grupo

em dieta hipoprotéica, foi estudado a fim de diferenciar os efeitos causados pela carência exclusiva de proteína daqueles causados pela restrição calórica, uma vez que já foi demonstrado que ratas lactantes submetidas à restrição protéica ingerem uma quantidade menor de ração em relação às ratas controles (18,19).

A dieta hipoprotéica foi preparada manualmente em nosso laboratório e sua composição é mostrada na Table. A fonte protéica (8%) desta dieta foi a ração comercial macerada (Labina - Purina Nutrientes Ltda.) e as calorias foram compensadas pelo acréscimo de amido de milho a fim de se obter uma dieta hipoprotéica e isocalórica. As vitaminas e os minerais foram suplementados de maneira a se obter a mesma composição da ração comercial que é baseada nas recomendações do National Research Council e do National Institute of Health, USA (20).

A dieta hipoprotéica foi administrada a partir do dia do nascimento dos filhotes quando a ninhada foi ajustada em número de 6. Este número de filhotes foi escolhido porque segundo Fishbeck & Rasmussen parece ser este o número de animais que confere o maior potencial lactotrófico (21). Provavelmente, o tamanho da ninhada influencia muito mais na quantidade de leite produzida do que em sua composição (22).

Aos 21 dias de lactação os animais foram anestesiados com tiopental (0.1 ml/100g peso corporal), os testículos foram excisados, pesados e armazenados a -70°C para posterior determinação dos receptores de androgênio pela técnica de Western blotting.

Os testículos foram homogeneizados em tampão de homogeneização (50mM TRIS pH 7.4, 1.5mM EDTA, 50mM NaCl, glicerol 10%, 5mM DTT, 10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina e 30 $\mu\text{l/g}$ tecido de PMSF) em um volume de 250 μl . O homogenato foi então centrifugado a 100.000 Xg, por 2h, a 4°C . O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C . A quantidade de proteína total do sobrenadante foi determinada utilizando-se o método de Bradford (23).

As proteínas foram separadas em gel de acrilamida 8% (SDS-PAGE). Foram adicionados cerca de 60 μg de proteína das amostras em cada slot do gel. Logo após, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada

EFFECT OF MALNUTRITION IN THE TESTIS

Table - Composition of the Control and Protein-Restricted diets

	Control §	Protein-Restricted*
Ingredients (g / Kg)		
Soybean + Wheat	230.0	80.0
Corn starch	676.0	826.0
Soybean oil	50.0	50.0
Vitamin mix †	4.0	4.0
Mineral mix †	40.0	40.0
Macronutrient composition (%)		
Protein	23.0	8.0
Carbohydrate	66.0	81.0
Fat	11.0	11.0
Total energy (KJ / Kg)	17038.7	17038.7

§ Standard diet for rats (Nuvilab-Nuvital Nutrients Ltd., Paraná, Brazil). * The low-protein diet was prepared in the laboratory using the control diet and replacing part of its protein content with corn starch. The amount of corn starch added was calculated to replace the energy content that was decreased by the protein reduction. † Vitamin and mineral mixtures were formulated to meet the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendation for rodent diets (ref. 20).

com tampão towbin (31mM TRIS pH 7.4, 3.4 mM KCl, 0.17M NaCl, 0.05mM vermelho de fenol, 0.1% tween 20) contendo 5% de leite desnatado, por 1h, com agitação. Posteriormente a membrana foi incubada com anticorpo específico (rabbit polyclonal 200 µg/ml, Santa Cruz proced) em tampão towbin contendo 0.25% de leite desnatado “overnight”, com agitação, lavada 3 vezes com tampão towbin, seguindo-se então uma incubação adicional com o segundo anticorpo (peroxidase-conjugated donkey IgG, 1:2000), por 1h, com agitação. Após lavagem

da membrana 3 vezes com tampão towbin, a membrana foi incubada com reagente de detecção ECL (Amersham) por 5 minutos e exposta num hiperfilme ECL para autoradiografia (Amersham). A densitometria foi feita utilizando o programa de computador Scion Image.

As diferenças entre os grupos foram determinadas através de análise de variância univariada associada a teste de comparação múltipla entre as médias, teste de Newman-Keuls (24).

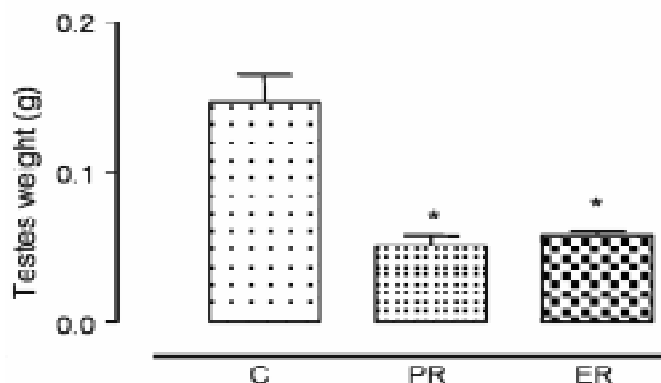


Figure 1 - Testicular weight of 21-day-old rats whose dams were fed a control diet with 23% of protein (Controls - C), a diet with 8% of protein (Protein Restricted - PR) or a diet with 23% of protein but in restricted quantities (Energy Restricted - ER) during the lactation period. Values are given as the mean ± standard error of the mean (six animals studied in each group). * p < 0.001 versus Controls.

RESULTADOS

O peso do testículo dos filhotes de ratas submetidas a restrição protéica ou calórica na lactação apresentou redução significativa ($p < 0.001$) e está representado na Figure-1. A redução observada no peso do testículo do grupo Restrição Protéica (RP) é de 64.7% e do Restrição Calórica (RC) é de 60.1%.

A concentração de proteína nos testículos dos

filhotes de ratas lactantes desnutridas diminuiu significativamente (Figure-2), porém quando analisamos por grama de tecido esta diferença desaparece.

Os animais cujas mães foram submetidas a ambos os tipos de desnutrição apresentaram uma quantidade de receptor significativamente maior que os animais controle, sendo que o aumento no grupo RP foi significativamente maior que no RC (Figure-3).

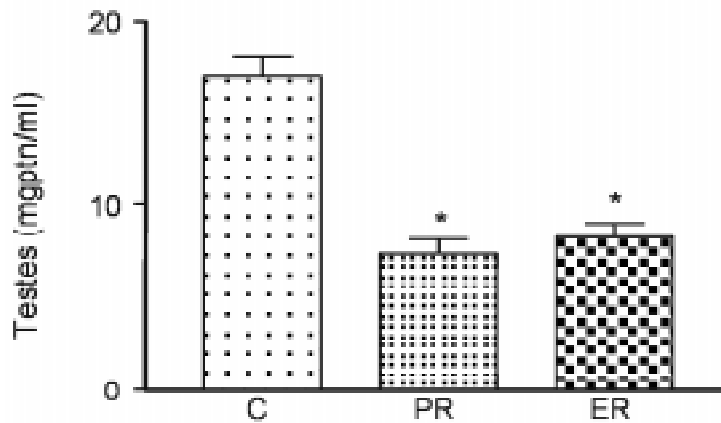


Figure 2 - Testicular protein concentration in micrograms per milliliter (mgptn/ml) of 21-day-old rats whose dams were fed a control diet with 23% of protein (Controls - C), a diet with 8% of protein (Protein Restricted - PR) or a diet with 23% of protein but in restricted quantities (Energy Restricted - ER) during the lactation period. Values are given as the mean \pm standard error of the mean (six animals studied in each group); * $p < 0.001$ versus Controls.

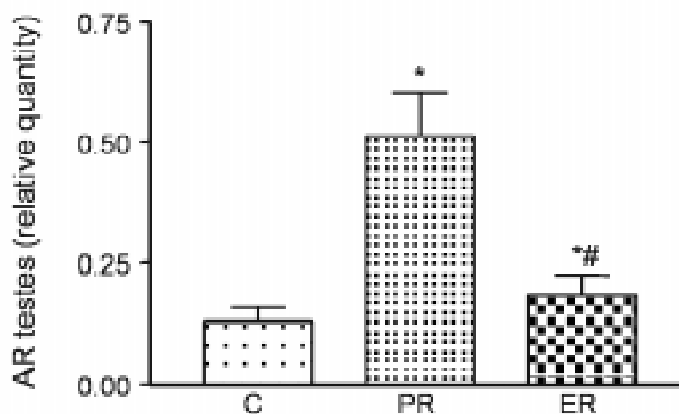


Figure 3 - Androgen receptor in the testes of 21-day-old rats whose dams were fed a control diet with 23% of protein (Controls - C), a diet with 8% of protein (Protein Restricted - PR) or a diet with 23% of protein but in restricted quantities (Energy Restricted - ER) during the lactation period. Values are given as the mean \pm standard error of the mean (five animals studied in each group). * $p < 0.001$ versus Controls; # $p < 0.001$ versus Protein Restricted - PR.

DISCUSSÃO

A desnutrição materna na lactação levou a uma redução significativa no peso do testículo, o que está de acordo com Young et al. (16) que relatou diminuição de 27% no testículo de camundongos adultos desnutridos.

Acreditamos que a concentração de proteínas totais no testículo foi reduzida pela desnutrição materna em decorrência da redução no peso do testículo, já que quando relacionamos a concentração protéica por grama de tecido esta alteração não foi mais observada.

A expressão de receptores de androgênio (AR) nos vários tecidos ou células varia em resposta ao androgênio. Os níveis de RNA mensageiro dos AR, em resposta ao androgênio, aumentam no rim de aves (25) e no músculo liso do pênis de rato (26), enquanto diminuem no fígado de aves (25) e na próstata ventral de ratos (7). Ao nível protéico, os AR parecem diminuir na próstata e vesículas seminais de rato em resposta ao androgênio.

Zhu et al. (8) demonstraram que os AR são regulados pelo androgênio circulante, de maneira diferente nas células de Sertoli, de Leydig e no epidídimo de ratos adultos. Além disto, alguns autores sugerem que o FSH e não o androgênio seja o regulador principal da expressão dos AR em testículos de animais imaturos (9,10).

Cardone et al. (12) utilizando cultura de células testiculares demonstraram ainda que o estrogênio pode diminuir a expressão dos RNA mensageiros dos receptores de androgênio.

Em macacos adultos, foi demonstrado por Console et al. (28) que a desnutrição protéica leva a mudanças morfológicas e ultra-estruturais nos gonadotrofos, com diminuição na densidade volumétrica e celular e sinais compensatórios de hiperfunção.

Com base nesses relatos podemos sugerir que a desnutrição materna pode acarretar alterações nas concentrações séricas de gonadotrofinas lipofisárias (LH, FSH), androgênios ou estrogênios na prole, justificando o aumento encontrado nos receptores. Outros estudos, com dosagem das

concentrações séricas de LH, FSH, androgênios e estrogênios, junto com a determinação dos AR no testículo estão sendo conduzidos para confirmar estes achados.

Pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil.

REFERÊNCIAS

1. Carson-Jurica MA, Scharader WT, O'Malley BW: Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev*, 11: 201-222, 1990.
2. Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H: Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem*, 41: 671-678, 1993.
3. Pelletier G, Labrie C, Labrie F: Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol*, 165: 359-370, 2000.
4. Liao S, Kokontis J, Sai T, Hiipakka RA: Androgen receptors: structures, mutations, antibodies and cellular dynamics. *J Steroid Biochem*, 34: 41-51, 1989.
5. Chang CS, Kokontis J, Liao ST: Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci*, 85: 7211-7215, 1988.
6. Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM: The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol*, 2: 1265-1275, 1988.
7. Shan LX, Rodriguez MC, Janne OA: Regulation of androgen receptor protein and mRNA

- concentrations by androgens in rat ventral prostate and seminal vesicles and in human hepatoma cells. *Mol Endocrinol*, 4: 1636-1646, 1990.
8. Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin W, Moo-Young AJ: Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod*, 63: 368-376, 2000.
 9. Sanborn BM, Caston LA, Chang C, Liao S, Speller R, Porter LD, Ku CY: Regulation of androgen receptor mRNA in rat Sertoli and peritubular cells. *Biol Reprod*, 45: 634-641, 1991.
 10. Blok LJ, Themmen APN, Peter AHFM, Trapman J, Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA: Transcriptional regulation of androgen receptor gene expression in Sertoli cells and other cells types. *Mol Cell Endocrinol*, 88: 153-164, 1992.
 11. Shan LX, Bardin CW, Ardí MP: Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology*, 138: 1259-1266, 1997.
 12. Cardone A, Angelini F, Varriale B: Autoregulation of estrogen and androgen receptor mRNAs and downregulation of androgen receptor mRNA by estrogen in primary cultures of lizard testis cells. *Gen Comp Endocrinol*, 110: 227-236, 1998.
 13. Goyal HO, Bartol FF, Wiley AA, Khalil MK, Williams CS, Vig MM: Regulation of androgen and estrogen receptors in male excurrent ducts of the goat: an immunohistochemical study. *Anat Rec*, 250: 164-171, 1998.
 14. Desjardins C, Lopez MJ: Environmental cues evoke differential responses in pituitary-testicular function in deer mice. *Endocrinol*, 112: 1398-1406, 1983.
 15. Nelson RJ, Kita M, Blom JMC, Rhyne-Grey J: Photoperiod influences the critical caloric intake necessary to maintain reproduction among male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Biol. Reprod*, 46: 226-232, 1992.
 16. Young KA, Zirkin BR, Nelson RJ: Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in White-Footed Mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. *Biol Reprod*, 62: 347-354, 2000.
 17. Bayne K: Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *Am Phys Soc Physiol*, 39: 208-211, 1996.
 18. Pine AP, Jessop NS, Oldham JD: Maternal protein reserves and their influence on lactational performance in rats: the effects of dietary protein restriction and stage of lactation on milk composition. *Br J Nutr*, 72: 815-830, 1994.
 19. Ramos CF, Teixeira CV, Passos MCF, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Curty FH, Moura EG: Low-protein diet changes thyroid function in lactating rats. *PSEBM*, 224: 256-263, 2000.
 20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC: AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nut*, 123: 1939-1951, 1993.
 21. Fischbeck KL, Rasmussen KM: Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr*, 117: 1967-1975, 1987.
 22. Yagil R, Etzion Z, Berlyne GM: Changes in rat milk quantity and quality due to variations in litter size and high ambient temperature. *Lab Natl Sci*, 26: 33-37, 1976.
 23. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254, 1976.
 24. Zar JH: *Bioestatistical Analysis*. New Jersey, Prentice-Hall, 1998.
 25. Nastiuk KL, Clayton DF: Seasonal and tissue-specific regulation of canary androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinol*, 134: 640-649, 1994.
 26. Gonzalez-Cadavid NF, Vernet D, Navarro AF, Rodriguez AJ, Swerdloff RS, Rajfer J: Up-

regulation of the levels of androgen receptor and its mRNA by androgens in smooth-muscle cells from rat penis. *Mol Cell Endocrinol*, 90: 219-229, 1993.

27. Console GM, Jurado SB, Oyhenart E, Ferese C, Pucciarelli H, Gomez Dumm CL: Morphometric and ultrastructural analysis of different pituitary cell populations in undernourished monkeys. *Braz J Med Biol Res*, 34: 65-74, 2001.

Received: August 16, 2001

Accepted after revision: October 6, 2001

Correspondence address:

Dra. Cristiane da Fonte Ramos
Unidade de Pesquisa Urogenital
Av. 28 de Setembro, No. 87, fundos
Prédio da FCM - térreo
Rio de Janeiro, RJ, 20551-030, Brazil
Fax: + + (55) (21) 2587-6121
E-mail: cramos@uerj.br