



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Flávia Fernandes de Lima

**Efeitos da dieta restrita em vitamina D administrada durante os períodos
perinatal e pós-natal no pênis de ratos *Wistar***

Rio de Janeiro

2018

Flávia Fernandes de Lima

Efeitos da dieta restrita em vitamina D administrada durante os períodos perinatal e pós-natal no pênis de ratos *Wistar*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientadora: Dra. Carla Braga Mano Gallo

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L732 Lima, Flávia Fernandes de.

Efeitos da dieta restritiva em vitamina D administrada durante os períodos perinatal e pós-natal no pênis de ratos *Wistar* / Flávia Fernandes de Lima. – 2018.

180 f.

Orientador: Francisco José Barcellos Sampaio.

Coorientadora: Carla Braga Mano Gallo.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Vitamina D – Teses. 2. Deficiência de Vitamina D. 3. Morfologia. 4. Pênis - Teses. I. Sampaio, Francisco José Barcellos. II. Gallo, Carla Braga Mano. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.39

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Flávia Fernandes de Lima

Efeitos da dieta restrita em vitamina D administrada durante os períodos perinatal e pós-natal no pênis de ratos *Wistar*.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital.

Aprovada em 24 de outubro de 2018.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora: Dra. Carla Braga Mano Gallo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dr. Marco Aurélio Rodrigues da Fonseca Passos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Mariana Catta Preta Caiado Pereira
Centro Universitário Augusto Motta

Prof. Dr. Maurício Alves Chagas
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Leilane Maria Barcellos Nepomuceno
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico à minha querida família, minha base, meu porto seguro, pelo amor, carinho, apoio e incentivo para prosseguir em busca do conhecimento e da realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza, que me ampara, fortalece e ilumina. Se não fosse essa força divina, certamente não teria concretizado esse trabalho.

A minha família por todo amor, paciência, compreensão e incentivo indispensáveis na minha formação e na minha vida. Sem o apoio de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus amigos que me apoiaram e sofreram comigo ao longo dessa difícil jornada. Especialmente, ao meu melhor amigo Jorge Matos, que acompanhou todos os detalhes dessa trajetória, e muitas vezes me orientou e apoiou nos momentos de dificuldades. Agradeço especialmente a família do meu amigo Jorge Matos, que são pessoas amorosas, generosas, incríveis que me acolheram como uma filha.

Ao Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio pela oportunidade de realização deste trabalho e por ter contribuído para o meu aprendizado e crescimento profissional.

A Dra. Carla Braga Mano Gallo pelo seu apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Aos meus colegas da Unidade de Pesquisa Urogenital pela força, apoio e bom convívio durante esta longa caminhada.

Ao Prof. Dr. Raúl Sánchez Gutiérrez e toda a sua equipe da Universidad de La Frontera pelo bom convívio, confiança e oportunidade de aprendizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Teixeira de Andrade

RESUMO

LIMA, Flávia Fernandes. *Efeitos da dieta restrita em vitamina D administrada durante os períodos perinatal e pós-natal no pênis de ratos Wistar*. 2018. 182 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A deficiência de vitamina D em gestantes e crianças é um problema de saúde que tem sido observado em muitas partes do mundo. A inadequação materna de vitamina D afeta tanto a saúde da mãe como a do feto, e tem impacto sobre o desenvolvimento de doenças crônicas na prole na idade adulta. O presente estudo avaliou os efeitos da dieta restrita em vitamina D administrada nos períodos perinatal e pós-natal na morfologia do pênis de ratos *Wistar* adultos. Fêmeas *Wistar* foram separadas em dois grupos: dieta padrão (SC AIN93G) e dieta restrita em vitamina D (VitD AIN93G). Ao desmame os filhotes foram divididos de acordo com a dieta materna: SC/SC (provenientes de mães SC, alimentados com dieta SC) e VitD/VitD (descendentes de mães VitD, alimentados com dieta VitD). Avaliou-se dados biométricos, bioquímicos e realizou-se análises histoquímicas e imunohistoquímica no pênis. A dieta restrita em vitamina D promoveu hiperglicemia de jejum (+86,42%; $p=0,0096$), intolerância à glicose (+12,02%; $p=0,0180$), hiperinsulinemia (+53,80%, $p=0,0072$), aumento do HOMA-IR (+87,51%; $p<0,0001$), elevação da pressão arterial sistólica (+15,30; $p<0,0001$) e redução dos níveis séricos de vitamina D (-61,00%, $p<0,0001$). No que concerne à morfologia do pênis, a dieta sem vitamina D diminuiu as seguintes áreas: do corte transversal do pênis (-5,45%; $p=0,0083$), do corpo cavernoso com (-7,01%; $p=0,0007$) e sem túnica albugínea (-5,70%; $p=0,0133$), da túnica albugínea (-8,55%; $p=0,0001$) e da veia dorsal profunda (-47,28%, $p=0,0004$). Além disso, a restrição de vitamina D induziu no corpo cavernoso o aumento das porcentagens de tecido conjuntivo (+9,52%, $p<0,0001$), de músculo liso (+25,19%; $p<0,0001$) e da proliferação celular (+17,39%; $p=0,0161$). A dieta VitD aumentou a porcentagem de tecido conjuntivo (+16,23%, $p<0,001$) e de músculo liso (+21,06%, $p=0,0074$) no corpo esponjoso. Em contrapartida, essa mesma dieta reduziu os espaços sinusoidais (-21,54%; $p=0,0002$) e fibras elásticas (-14,83%, $p=0,0009$) no corpo cavernoso, bem como promoveu a diminuição das fibras elásticas na túnica albugínea do corpo esponjoso (-11,86%, $p<0,001$). Nos dados avaliados na artéria dorsal, a dieta VitD aumentou a área da túnica média (+45,82%, $p=0,0156$) e reduziu a área do lúmen (-47,28%, $p=0,0040$). A restrição de vitamina D reduziu as fibras elásticas (+30,26%, $p=0,0073$) e diminuiu a altura da lâmina limitante elástica interna (-28,11%, $p<0,001$) da artéria dorsal. A dieta sem vitamina D também aumentou a porcentagem de vasos nos corpos cavernoso (+43,44%, $p=0,0061$) e esponjoso (+53,57%, $p<0,0001$). Adicionalmente, também reduziu a porcentagem de vasos (-26,47%, $p=0,0470$) e nervos (-24,43%, $p<0,0001$) na região dorsal dos pênis. Os resultados mostraram que a restrição de vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal promove alterações estruturais e quantitativas nos elementos constituintes do pênis da prole, indicando a importância de níveis séricos adequados de vitamina D durante a gestação, lactação e vida pós-natal, para manter a integridade da morfologia peniana nos adultos.

Palavras-chave: Programação fetal. Vitamina D. morfologia. Pênis. Ratos *Wistar*.

ABSTRACT

LIMA, Flávia Fernandes. *Effects of vitamin D restricted diet administered during perinatal and postnatal periods on the penis of Wistar rats*. 2018. 182f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Vitamin D deficiency in pregnant women and children is a health problem that has been observed in many parts of the world. Maternal inadequacy of vitamin D affects both the health of the mother and the fetus, and has an impact on the development of chronic diseases in adulthood. The present study evaluated the effects of vitamin D restricted diet administered in the perinatal and postnatal periods in adult *Wistar* rats penis morphology. *Wistar* female were separated into two groups: standard diet (SC AIN93G) and vitamin D restricted diet (VitD AIN93G). At weaning, the offspring were divided according to the maternal diet: SC/SC (from SC mothers, fed with SC diet) and VitD/VitD (from VitD mothers, fed with VitD diet). Biometric and biochemical data were evaluated and a histochemical and immunohistochemical analyzes of the penis were also performed. Vitamin D restricted diet promoted fasting hyperglycemia (+86.42%; $P=0.0096$), glucose intolerance (+12.02%; $p=0.0180$), hyperinsulinemia (+53.80%, $p=0.0072$), increased HOMA-IR (+87.51%, $p < 0.0001$), elevation of systolic blood pressure (+15.30, $p < 0.0001$) and reduction of serum vitamin D levels (-61.00%, $p < 0.0001$). Concerning the morphology of the penis, the VitD diet decreased the following areas: cross sectional area (-5.45%; $p=0.0083$), corpus cavernosum with (-7.01%; $p=0.0007$) and without tunica albuginea (-5.70%; $p=0.0133$), tunica albuginea (-8.55%, $p=0.0001$) and deep dorsal vein (-47.28%, $p=0.0004$). In addition, vitamin D restriction induced an increase in the percentage of connective tissue (+9.52%, $p < 0.0001$), smooth muscle (+25.19%, $p < 0.0001$), and cell proliferation (+17.39%, $p=0.0161$) in the corpus cavernosum. The VitD diet increased the percentage of connective tissue (+16.23%, $p < 0.001$) and smooth muscle (+21.06%, $p=0.0074$) in the corpus spongiosum. On the other hand, this same diet reduced the sinusoidal spaces (-21.54%, $p=0.0002$) and elastic fibers (-14.83%, $p=0.0009$) in the corpus cavernosum, as well as reduced the number of elastic fibers in the tunica albuginea of the corpus spongiosum (-11.86%, < 0.001). In the data evaluated in the dorsal artery, the VitD diet increased the area of the tunica media (+45.82%, $p=0.0156$) and reduced the lumen area (-47.28%, $p=0.0040$). Restriction of vitamin D reduced elastic fibers (+30.26%, $p=0.0073$) and decreased the height of the internal elastic limiting lamina (-28.11%, $p < 0.001$) of the dorsal artery. The diet without vitamin D increased the percentage of vessels in the corpus cavernosum (+43.44%, $p=0.0061$) and corpus spongiosum (+53.57%, $p < 0.0001$). In addition, it also reduced the percentage of vessels (-26.47%, $p=0.0470$) and nerves (-24.43%, $p < 0.0001$) in the dorsal region of the penis. The results showed that vitamin D restriction in the perinatal and postnatal periods promotes structural and quantitative changes in the constituent elements of the penis of offspring, indicating the importance of adequate serum levels of vitamin D during gestation, lactation and postnatal life, to maintain the integrity of the penile morphology in adults.

Keywords: Fetal programming. Vitamin D. Morphology. Penis. *Wistar* rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Síntese da forma ativa da vitamina D.....	21
Figura 2-	Controle transcricional da expressão gênica pela 1,25(OH) ₂ D ₃ via VDR.....	23
Figura 3-	Vitamina D e programação fetal.....	37
Figura 4-	Divisão anatômica do pênis de rato.....	42
Figura 5-	Fotomicrografia do corte transversal do pênis de rato.....	42
Figura 6-	Aplicabilidade da ferramenta “ <i>Freehand selections</i> ”.....	52
Figura 7-	Aplicabilidade das ferramentas “ <i>Grid</i> ” e “ <i>Cell Counter</i> ”.....	54
Figura 8-	Quantificação da proliferação celular no corpo cavernoso.....	56
Figura 9-	Uso da ferramenta “ <i>Freehand selections</i> ” para medir a área da artéria dorsal.....	59
Figura 10-	Quantificação da densidade nuclear na túnica média da artéria dorsal.....	59
Figura 11-	Avaliação da altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal.....	61
Figura 12-	Quantificação da porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal.....	63
Figura 13-	Evolução da massa corporal no período experimental.....	68
Figura 14-	Evolução da pressão arterial sistólica.....	69
Figura 15-	Teste oral de tolerância à glicose e área sob a curva do TOTG.....	70
Figura 16-	Glicemia de jejum, insulina e HOMA-IR.....	71
Figura 17-	Gráfico da área do corte transversal da porção média do pênis.....	73
Figura 18-	Fotomicrografias dos pênis dos filhotes adultos.....	74
Figura 19-	Gráfico das áreas do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea.....	75
Figura 20-	Gráfico da área da túnica albugínea.....	76
Figura 21-	Gráfico das porcentagens de tecido conjuntivo e dos espaços sinusoidais no corpo cavernoso.....	77
Figura 22-	Porcentagens de tecido conjuntivo e dos espaços sinusoidais no corpo cavernoso.....	78
Figura 23-	Gráfico da porcentagem de músculo liso no corpo cavernoso.....	79
Figura 24-	Porcentagem de músculo liso no corpo cavernoso.....	80
Figura 25-	Gráfico da porcentagem de fibras elásticas no corpo cavernoso.....	81

Figura 26-	Porcentagem de fibras elásticas no corpo cavernoso.....	82
Figura 27-	Gráfico da proliferação celular no corpo cavernoso.....	83
Figura 28-	Proliferação celular no corpo cavernoso.....	84
Figura 29-	Gráfico da área do corpo esponjoso.....	85
Figura 30-	Gráficos das porcentagens de tecido conjuntivo e músculo liso no corpo esponjoso.....	86
Figura 31-	Porcentagem de tecido conjuntivo no corpo esponjoso.....	87
Figura 32-	Porcentagem de músculo liso no corpo esponjoso.....	88
Figura 33-	Gráficos das porcentagens de fibras elásticas no corpo esponjoso e na túnica albugínea do corpo esponjoso.....	89
Figura 34-	Porcentagem de fibras elásticas no corpo esponjoso.....	90
Figura 35-	Porcentagem de fibras elásticas na túnica albugínea do corpo esponjoso.....	91
Figura 36-	Gráficos das áreas da túnica média, do lúmen e da razão túnica média/lúmen da artéria dorsal.....	93
Figura 37-	Áreas da artéria dorsal, da túnica média e do lúmen da artéria dorsal.....	95
Figura 38-	Gráficos da altura da lâmina limitante elástica interna e porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal.....	96
Figura 39-	Porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal.....	97
Figura 40-	Gráfico da área da veia dorsal profunda.....	98
Figura 41-	Área da veia dorsal profunda.....	99
Figura 42-	Gráficos da porcentagem de vasos no corpo cavernoso, corpo esponjoso e região dorsal.....	101
Figura 43-	Porcentagem de vasos no corpo cavernoso.....	102
Figura 44-	Porcentagem de vasos no corpo esponjoso.....	103
Figura 45-	Porcentagem de vasos na região dorsal.....	104
Figura 46-	Gráficos da porcentagem de nervos no corpo cavernoso, corpo esponjoso e região dorsal.....	105
Figura 47-	Porcentagem de nervos no corpo cavernoso.....	107
Figura 48-	Porcentagem de nervos no corpo esponjoso.....	108
Figura 49-	Porcentagem de nervos na região dorsal.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores séricos de vitamina D e a classificação quanto a normalidade.	25
Tabela 2-	Composição das dietas experimentais.....	45
Tabela 3-	Dados biométricos e bioquímicos das mães.....	66
Tabela 4-	Dados do nascimento e desmame dos filhotes.....	67
Tabela 5-	Dados dos filhotes aos quatro meses de idade.....	72
Tabela 6-	Dados do pênis dos filhotes aos quatro meses de idade.....	92
Tabela 7-	Dados dos vasos e nervos do pênis dos filhotes aos quatro meses de idade.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área do corte transversal do pênis
AD	Artéria dorsal
AIN-93	<i>American Institute of Nutrition</i> do ano de 1993
ANG II	Angiotensina II
ASC	Área sob a curva
Ca	Cálcio
CC	Corpo cavernoso
CE	Corpo esponjoso
CAN	Comprimento naso-anal
CC com TA	Corpo cavernoso com túnica albugínea
CC sem TA	Corpo cavernoso sem túnica albugínea
CYP24A1	1,25(OH) ₂ D ₃ -24- hidroxilase
CYP27B1	25-hidroxivitamina D-1 α hidroxilase
CYP2R1	Vitamina D 25-hidroxilase
DBP	Proteína ligante de vitamina D
DCV	Doenças cardiovasculares
DE	Disfunção erétil
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
ELISA	<i>Ezyme linked Immunosorbent Assay</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HOMA-IR	<i>Insulin resistance homeostasis model assessment</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MC	Massa corporal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
25(OH)D ₃	25-Hidroxivitamina D ₃
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihidroxivitamina D ₃
NFK- β	Fator nuclear Kappa beta
ONS-n	Óxido nítrico sintase neuronal
ON	Óxido nítrico

ONS-e	Óxido nítrico sintetase endothelial
ns	Não significativo
P	Fósforo
PAS	Pressão arterial sistêmica
PBS	Tampão fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PTH	Paratormônio
PTH-rp	Peptídeo relacionado com o paratormônio
AT1R	Receptor tipo 1 da ANGIO
RD	Região dorsal
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SC	Dieta padrão
Smet	Síndrome metabólica
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TA	Túnica albugínea
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TM	Túnica media
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UVB	Radiação ultravioleta tipo B
VitD	Dieta restrita em vitamina D
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VDP	Veia dorsal profunda
VDR	Receptor de vitamina D
VDRE	Elementos-resposta da vitamin D

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Metabolismo da vitamina D	19
1.1.1	<u>Metabolismo da vitamina D na gestação</u>	26
1.1.2	<u>Metabolismo da vitamina D na lactação</u>	28
1.2	Programação fetal	29
1.3	Restrição (insuficiência ou deficiência) materna de vitamina D e programação fetal	33
1.4	Vitamina D e pênis	38
1.5	Morfologia do pênis de rato	39
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo geral	43
2.2	Objetivos específicos	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	Animais, dietas e protocolo experimental	44
3.2	Massa corporal, ingestão e eficiência alimentar	46
3.3	Pressão arterial sistólica	47
3.4	Teste Oral de Tolerância à Glicose	47
3.5	Eutanásia	48
3.6	25-hidroxitamina D3 [25-(OH)D3], insulina e HOMA-IR	48
3.7	Procedimentos histológicos	49
3.7.1	Imunohistoquímica.....	50
3.8	Histomorfometria	51
3.8.1	<u>Área do corte transversal do pênis, área do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea, área da túnica albugínea e área do corpo esponjoso</u>	51
3.8.2	<u>Quantificação das porcentagens de tecido conjuntivo, de músculo liso, dos espaços sinusoidais e das fibras elásticas no corpo cavernoso</u>	53
3.8.3	<u>Proliferação celular</u>	55
3.8.4	<u>Quantificação das porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso e das fibras elásticas no corpo esponjoso</u>	57

3.8.5	<u>Avaliações histomorfométricas da artéria dorsal.....</u>	57
3.8.6	<u>Quantificação da altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal....</u>	60
3.8.7	<u>Quantificação da porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal.....</u>	62
3.8.8	<u>Área da veia dorsal profunda.....</u>	64
3.8.9	<u>Porcentagem de vasos nos corpos cavernoso, esponjoso e na região dorsal.....</u>	64
3.8.10	<u>Porcentagem de nervos nos corpos cavernoso, esponjoso e na região dorsal....</u>	65
3.9	Análise estatística.....	65
4	RESULTADOS.....	66
4.1	Dados das mães e nascimento dos filhotes.....	66
4.2	Dados dos filhotes.....	67
4.2.1	<u>Massa corporal, ingestão e eficiência alimentar.....</u>	67
4.2.2	<u>Pressão arterial sistólica.....</u>	68
4.2.3	<u>Teste Oral de Tolerância à Glicose.....</u>	69
4.2.4	<u>Glicemia de jejum, insulina e HOMA-IR.....</u>	71
4.3	Análises histomorfométricas e imunohistoquímicas.....	73
4.3.1	<u>Área do corte transversal do pênis.....</u>	73
4.3.2	<u>Áreas do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea.....</u>	75
4.3.3	<u>Área da túnica albugínea.....</u>	76
4.3.4	<u>Porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso, espaços sinusoidais e fibras elásticas nos corpos cavernoso e esponjoso.....</u>	77
4.3.5	<u>Proliferação celular.....</u>	83
4.3.6	<u>Corpo esponjoso.....</u>	85
4.3.7	<u>Alterações histomorfológicas na artéria dorsal do pênis.....</u>	93
4.3.8	<u>Alterações histomorfológicas na veia dorsal profunda.....</u>	98
4.3.9	<u>Porcentagem de vasos no corpo cavernoso, corpo esponjoso e região dorsal.....</u>	100
4.3.10	<u>Porcentagem de nervos no corpo cavernoso, corpo esponjoso e região dorsal.....</u>	105
5	DISCUSSÃO.....	111
	CONCLUSÃO.....	117
	REFERÊNCIAS.....	120
	ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais.....	139

ANEXO B - Comprovação de submissão do primeiro artigo científico.....	140
ANEXO C – Formato final do 1 ^o artigo científico submetido	141
ANEXO D - Comprovação aceite do 1 ^o artigo científico.....	150
ANEXO E - Comprovação de submissão do 2 ^o artigo científico.....	151
ANEXO F - Formato final do 2 ^o artigo científico submetido.....	152

INTRODUÇÃO

Existe uma alta prevalência de insuficiência ou deficiência de vitamina D em todo o mundo que se tornou uma preocupação por causa dos potenciais efeitos adversos na saúde humana (VON WEBSKY et al., 2018). Os níveis séricos de vitamina D refletem tanto o consumo dietético quanto a exposição a luz solar e precisam ser conhecidos, pois níveis inadequados dessa vitamina podem comprometer a saúde.

Existem controvérsias em relação aos valores de referência para os níveis séricos de 25- hidroxivitamina D3 (25(OH)D3) para humanos e pouco se discute sobre os valores de referência para os roedores (BATTALUT et al., 2013; BROUWER-BROLSMA et al., 2013; MAKKA et al., 2008). De acordo com o *Institute of Medicine* em humanos os pontos de corte são: normal - > 20 ng/ml, insuficiência - $10 - 20$ ng/ml e deficiência - < 10 ng/ml (BOUILLON, 2017).

A insuficiência ou a deficiência de vitamina D têm sido observada em adultos e idosos (HAIMI; KREMER, 2017). Contudo, mulheres grávidas e seus filhos também constituem grupos de alto risco para deficiência de vitamina D e são, portanto, o foco de pesquisas atuais (VON WEBSKY et al., 2018). A prevalência de deficiência ou insuficiência de vitamina D durante a gestação varia entre 8% a 100% dependendo do país (HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2012).

O armazenamento da vitamina D inicia-se durante a gestação, quando essa vitamina é transferida da mãe para o feto por via transplacentária (WAGNER et al., 2012). A manutenção de níveis séricos adequados de vitamina D durante a gestação é essencial para prevenir níveis inadequados dessa vitamina durante a vida intrauterina e a sua deficiência no início da vida pós-natal (HOLLIS; WAGNER, 2004).

A principal fonte de vitamina D é a exposição à luz solar natural (HOLICK, 2017). Assim, a principal causa de deficiência de vitamina D é exposição inadequada à luz solar (HOLICK et al., 2011). Contudo, a prevalência de insuficiência e deficiência dessa vitamina é alta, até mesmo em países com climas ensolarados como o Brasil (PEREIRA-SANTOS et al., 2018).

Fatores de risco para a deficiência de vitamina D incluem baixa exposição à luz solar, latitude, pigmentação da pele, uso de protetor solar, vestuário cobrindo completamente a pele e dieta pobre em alimentos fontes (HENRY, 2011; VAN SCHOOR, LIPS, 2011).

A vitamina D é um micronutriente lipossolúvel considerado essencial para a manutenção das funções vitais (VAN SCHOOR, LIPS, 2011). A vitamina D atua na homeostase do cálcio, do fósforo e no metabolismo ósseo. Ademais, desempenha outras funções no sistema muscular, na modulação do sistema imunológico, na diferenciação e proliferação celular, além de outras ações extraósseas, que são mediadas pelo receptor nuclear de vitamina D (VDR) (DUSSO, BROWN, SLATOPOLSKI, 2005; HAUSSLER et al., 2011; PLUDOWSKI et al., 2013). A forma ativa da vitamina é produzida primariamente nos rins (ZITTERMANN, 2006), circula no sangue e se liga ao seu receptor presente nas células de quase todos os tecidos. Dessa maneira, promove efeitos sobre os diversos órgãos, levando a uma nova compreensão da atuação dessa vitamina, que atualmente é considerada um hormônio (PLUDOWSKI et al., 2013).

Estudos mostram que a crescente incidência da obesidade e doenças crônicas não transmissíveis pode ter origem em alterações ocorridas no útero e durante o início da vida pós-natal (REICHETZEDER et al., 2014). Já está bem estabelecida na literatura a existência de uma janela crítica temporal para o crescimento e o desenvolvimento fetal, que pode ser programada pela nutrição (MCCANCE, 1962). A programação é o processo pelo qual um estímulo ou insulto quando aplicado no período crítico do desenvolvimento, como gestação e/ou lactação, tem efeitos permanentes sobre as estruturas e as funções do organismo (BARKER, 1995; BARKER, CLARK, 1997; LUCAS, 1991).

A inadequação materna de vitamina D afeta tanto a saúde da mãe como a do feto, e também tem impacto sobre o desenvolvimento de doenças crônicas na prole na idade adulta (VON WEBSKY et al., 2018). A restrição de vitamina D durante o período perinatal está relacionada com o aumento da adiposidade (NASCIMENTO et al., 2012), com alterações estruturais renais, com modificações dos componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) (NASCIMENTO et al., 2012), com o desenvolvimento de intolerância à glicose (ZHANG et al., 2014) e doenças cardiovasculares na idade adulta (GEZMISH, BLACK, 2013).

O estado nutricional materno também é capaz de influenciar o desenvolvimento dos órgãos andrógenos dependentes (RAMOS et al., 2010). Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos da restrição de vitamina D durante a gestação, lactação e vida pós-natal no pênis da prole.

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade persistente de alcançar /ou manter uma ereção peniana suficiente para permitir relações sexuais bem-sucedidas, causando diminuição da qualidade de vida em homens (THORVE et al., 2011). Barassi e colaboradores (2014) mostraram que pacientes com DE têm deficiência de vitamina D (BARASSI et al.,

2014). Baixos níveis de vitamina D podem aumentar o risco de DE ao promoverem a disfunção endotelial (BARASSI et al., 2014). Sabe-se que a DE é multifatorial e que os principais fatores associados ao seu desenvolvimento são a disfunção endotelial e a deficiência de testosterona (TRAISH, GOLDSTEIN, KIM, 2007).

Estudos mostraram que baixos níveis séricos de vitamina D estão associados com uma diminuição na concentração de testosterona em ratos e humanos, o que também pode alterar a morfologia do pênis e a fisiologia da ereção (BLOMBERG JENSEN et al., 2013; RAFIQ et al., 2016; TAK et al., 2015).

Diante do exposto, a hipótese do presente estudo é que a dieta restrita em vitamina D administrada durante os períodos perinatal e pós-natal pode promover alterações na histomorfologia do pênis de ratos *Wistar* adultos. Nesse sentido, torna-se relevante estudar os efeitos da programação fetal por restrição de vitamina D, visto que a deficiência de vitamina D é comum em gestantes e seus recém-nascidos, promove alterações metabólicas na idade adulta e possivelmente também pode induzir alterações estruturais no pênis que podem levar à DE.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Metabolismo da vitamina D

A vitamina D é um micronutriente lipossolúvel considerado essencial para a manutenção das funções vitais. As fontes de vitamina D são: a produção endógena, que ocorre na pele após exposição à luz solar (raios ultravioleta do tipo B - UVB), os alimentos que contêm tanto o colecalciferol (vitamina D3- forma ativa da vitamina) ou ergocalciferol (vitamina D2) (VAN SCHOOR, LIPS, 2011).

A maioria dos alimentos naturais possuem uma pequena quantidade de vitamina D, fornecendo apenas cerca de 10% das recomendações diárias. Há pequenas concentrações de vitamina D nos ovos, na carne e em alguns alimentos fortificados, como cereais, margarina e leite, embora os níveis de fortificação variem de país para o país (MASON, SEQUEIRA, GORDON-THOMSON, 2011).

As fontes animais de vitamina D fornecem vitamina D3 ou colecalciferol, formado a partir do 7-deidrocolesterol presente na pele. São boas fontes dietéticas de colecalciferol os peixes gordurosos, tais como o salmão, cavala, atum e o óleo de fígado de bacalhau (HOLICK, 2012).

Outra fonte dietética de vitamina D é o ergosterol (vitamina D2) de origem vegetal, presente principalmente em cogumelos irradiados com radiação ultravioleta. Os suplementos dietéticos também são fontes de vitamina D (HOLICK, 2007; HOSSEIN-NEZHAD, HOLICK, 2012).

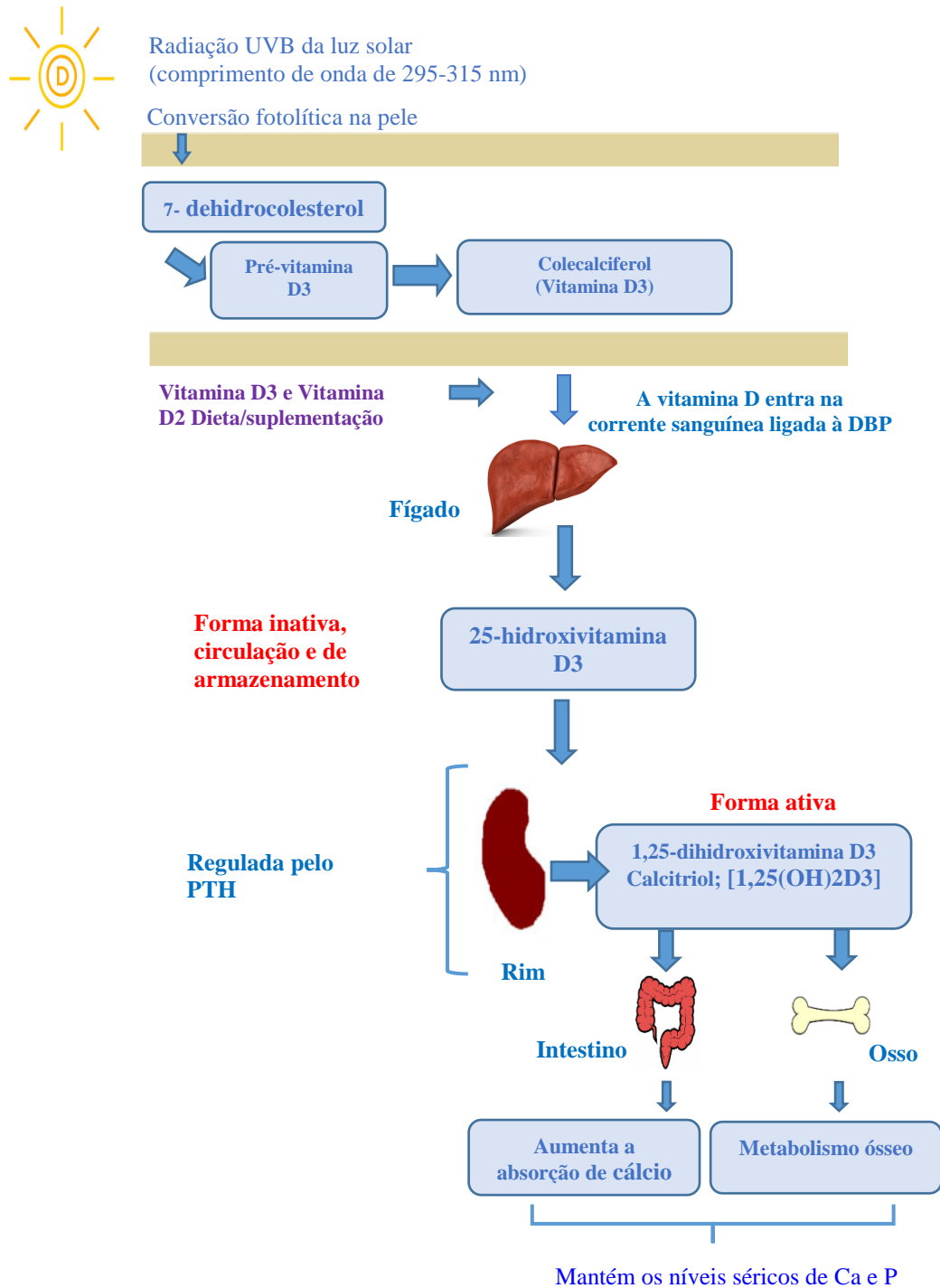
A principal fonte de vitamina D é a exposição da pele à luz solar direta. A síntese endógena da vitamina D se inicia nas camadas profundas da epiderme, onde está armazenada a substância precursora, o 7-deidrocolesterol. A exposição da pele a luz solar direta, especificamente à UVB, nos comprimentos de onda entre 295 e 315 nanômetros, promove uma cascata de reações fotolíticas e enzimáticas na molécula do 7-deidrocolesterol formando a pré-vitamina D3 (HOLICK et al., 1980). Somente cerca de 15% do 7-deidrocolesterol é convertido em pré-vitamina D3 quando a pele é exposta a luz solar direta. Uma vez formada, a pré-vitamina D3 sofre isomerização para formar a vitamina D3 ou colecalciferol (HOLICK et al., 1980). Em situações de exposição solar prolongada, a pré-vitamina D3, que é capaz de absorver fótons UVB, é isomerizada a dois produtos fotolíticos que são, o lumisterol e o

taquisterol. O lumisterol e o taquisterol são dois produtos fotolíticos que não tem efeito sobre o metabolismo do cálcio (HOLICK, MACLAUGHLI, DOPPELT, 1981). Este mecanismo endógeno exerce proteção contra uma síntese excessiva e resultante intoxicação.

A vitamina D ingerida é incorporada em quilomícrons, que são lançados no sistema linfático e entra no sangue venoso (HOLICK, 2007). O colecalciferol e o ergosterol são transportados no sangue por uma glicoproteína, a proteína ligante de vitamina D (DBP) até o tecido adiposo, para armazenamento, prolongando sua meia-vida em até dois meses, ou para o fígado (HOLICK, 2012).

As vitaminas D2 e D3 ao chegarem no fígado sofrem hidroxilação no carbono 25 que é mediada por uma enzima microsomal da superfamília do citocromo P450 chamada vitamina D 25- hidroxilase (CYP2R1), resultando na formação da 25-hidroxivitamina D ou calcidiol 25(OH)D3. O calcidiol é o principal metabólito de vitamina D circulante no sangue que é usado para determinar o estado de vitamina D de um paciente (HOLICK, 2012b, 2012c). Esse metabólito sofre mais uma hidroxilação pela 25-hidroxivitamina D-1 α hidroxilase (CYP27B1) nos rins para formar o hormônio 1 α ,25-dihidroxivitamina D3 [1,25(OH)2D3] ou calcitriol, que é a forma mais ativa dessa vitamina. A produção renal da 1,25(OH)2D3 é rigorosamente regulada pelas concentrações do paratormônio (PTH), cálcio e fósforo (DUSSO, BROWN, SLATOPOLSKI, 2005). Além disso, há enzimas que degradam o calcitriol em metabólitos solúveis em água e menos ativos tais como a 1,25-(OH)2 D3-24-hidroxilase (CYP24A1), que faz o catabolismo no rim, que por sua vez é altamente regulada positivamente pelo próprio calcitriol, como mecanismo de feedback negativo (BIKLE, 2014; WACKER, HOLICK, 2013).

Figura 1 - Síntese da forma ativa da vitamina D



Legenda: Figura mostrando as vias cutânea e dietética da produção da forma ativa da vitamina D (calcitriol). DPB, proteína ligante de vitamina D; PTH, paratormônio, Ca, cálcio; P, fósforo.

Fonte: Adaptado de (GEZMISH, BLACK, 2013).

O calcitriol liga-se ao receptor da vitamina D (VDR) para controlar a expressão de genes regulados pela vitamina D em todo o genoma por meio de mecanismos epigenéticos (HOLICK, 2007, 2012b). Mudanças hereditárias na expressão gênica que não são mediadas por alterações na sequência do DNA são chamadas de modificações epigenéticas. Diferentes mecanismos sustentam as alterações epigenéticas como a metilação no DNA, modificações de proteínas histonas e silenciamento de RNA (STEFANSKA et al., 2012).

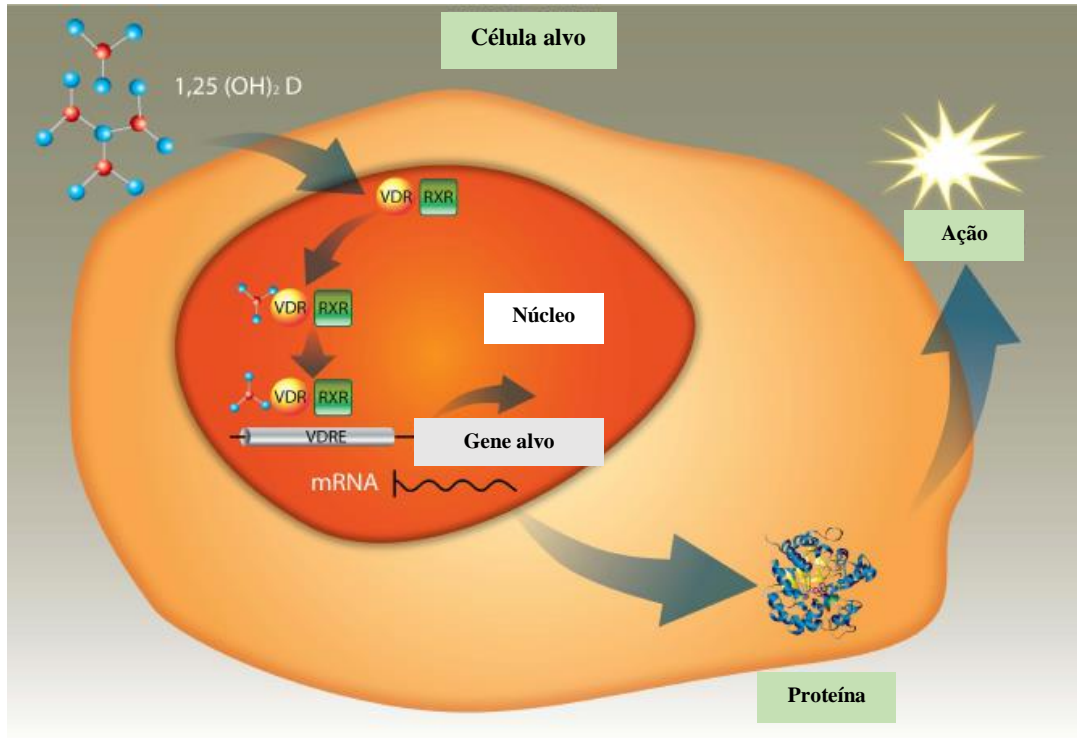
A vitamina D possui muitas funções, as principais são: regular o metabolismo e o crescimento ósseo, estimular a reabsorção renal de cálcio, regular o SRA, regular a pressão arterial e estimular a produção de insulina. Ademais, desempenha outras funções no sistema muscular, na modulação do sistema imunológico, na diferenciação e proliferação celular, além de outras ações extraósseas, que são mediadas pelo VDR (HAUSSLER et al., 2011; PLUDOWSKI et al., 2013).

A forma ativa da vitamina é produzida primariamente nos rins, circula no sangue e se liga ao seu receptor presente nas células de quase todos os tecidos (ZITTERMANN, 2006). Dessa maneira, promove efeitos sobre os diversos órgãos, levando a uma nova compreensão da atuação dessa vitamina, que atualmente é considerada um hormônio (PLUDOWSKI et al., 2013).

Os efeitos biológicos da 1,25(OH)₂D₃ são mediados pelo VDR que é um fator de transcrição que pertence à família dos receptores nucleares para hormônios esteroides. O VDR é expresso na maioria dos tecidos e células humanas e regula, de forma direta ou indireta, a expressão de cerca de 2000 genes. Muitos desses órgãos e células também têm capacidade para produzir 1,25(OH)₂D₃ (HOLICK, 2007, 2012b; NOVAKOVIC et al., 2012).

O VDR liga-se, como heterodímero, com o receptor retinoico (RXR) para estimular a transcrição gênica (HAUSSLER et al., 1997). A 1,25(OH)₂D₃ liga-se ao VDR promovendo uma mudança estrutural e formação do complexo transcricional hormônio-receptor (ROCHEL et al., 2000). Então, o complexo hormônio-receptor é heterodimerizado com RXR e esse heterodímero 1,25(OH)₂D₃-VDR-RXR acopla-se a uma sequência específica do DNA dos seus genes-alvos, chamada elementos-resposta da vitamina D (VDRE) (HAUSSLER et al., 1997). Assim, ocorre a cascata de interações moleculares que regulam a transcrição de genes específicos, resultando em aumento ou redução da atividade do gene (HOSSEIN-NEZHAD, SPIRA, HOLICK, 2013).

Figura 2 - Controle transcricional da expressão gênica pela 1,25(OH)₂D₃ via VDR



Legenda: Figura mostrando a cascata de interações moleculares que regulam a transcrição de genes, resultando na formação da proteína e ação biológica mediadas pela 1,25(OH)₂D₃ via VDR. VDR, receptor da vitamina D; RXR, receptor retinoico; VDRE, elementos-resposta da vitamina D; mRNA, Ácido ribonucleico mensageiro.

Fonte: Adaptado de (MANDARINO et al., 2015).

A principal fonte de vitamina D é a exposição à luz solar natural (HOLICK, 2017a). Cerca de 50% a 90% da vitamina D endógena é proveniente da produção que ocorre na pele e o restante é oriundo da dieta (LIPS, 2010). Assim, a principal causa de deficiência de vitamina D é exposição inadequada à luz solar (HOLICK et al., 2011a). Estima-se que mais de um bilhão de pessoas no mundo tenham níveis séricos de vitamina D inadequados, configurando uma atual “epidemia” de hipovitaminose D (HOLICK, 2017b). A prevalência de insuficiência e deficiência dessa vitamina é alta, até mesmo em países com climas ensolarados como o Brasil (PEREIRA-SANTOS et al., 2018).

Fatores de risco para a deficiência de vitamina D incluem baixa exposição à luz solar, latitude, pigmentação da pele, uso de protetor solar, vestuário cobrindo completamente a pele e dieta pobre em alimentos fontes (HENRY, 2011; VAN SCHOOR, LIPS, 2011).

O ângulo de incidência da luz solar sobre a Terra (zênite solar) se modifica durante as estações do ano, sendo maior nos meses de inverno quando a quantidade de raios UVB que

atinge a superfície terrestre é menor. Assim, a quantidade de raios UVB que atinge a pele dos indivíduos é uma função inversa da latitude e é menor nos meses de inverno (WEBB, KLINE, HOLICK, 1988). Ademais, a eficiência da síntese cutânea da vitamina D₃ é ainda depende da pigmentação da pele. A melanina compete pelo fóton da radiação UVB nos comprimentos de onda entre 290 e 315 nanômetros, reduzindo a disponibilidade de fótons para a fotólise do 7-deidrocolesterol (CLEMENS et al., 1982). Quanto mais melanina na pele menor será a quantidade de vitamina D sintetizada por uma mesma dose de raios UVB (CLEMENS et al., 1982).

Protetores solares aplicados corretamente reduziram a penetração de UVB e diminuíram substancialmente a produção de vitamina D (MATSUOKA et al., 1987). Contudo, evidências mostram que o uso de protetores solares faz relativamente pouca diferença para a os níveis séricos de vitamina D. Isso ocorre em parte porque os filtros solares tendem a ser aplicados de forma inadequada, e em parte porque as pessoas aplicam os protetores solares somente quando saem ao sol (SPRINGBETT, BUGLASS, YOUNG, 2010). Embora um protetor solar de fator 50 diminua significativamente a produção cutânea de vitamina D, os níveis circulantes de 25(OH)D₃ são minimamente afetados (LIBON et al., 2017). Isso poderia ser explicado por uma mudança para outra fonte endógena de precursores (LIBON et al., 2017). O uso de protetor solar de curto prazo provavelmente não afeta os níveis circulantes de vitamina D. No entanto, o efeito do uso de protetor solar a longo prazo deve ser avaliado (LIBON et al., 2017).

A deficiência de vitamina D também é comum em idosos. A pele dos idosos é mais fina, o que pode explicar as menores concentrações de 7-deidrocolesterol e baixa produção de vitamina D após a exposição aos raios UVB (HOLICK, MATSUOKA, WORTSMAN, 1989; NEED et al., 1993).

Dados da última Pesquisa de Orçamento Familiar, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostraram que 99% da população adulta brasileira apresenta consumo insuficiente de alimentos fontes de vitamina D (IBGE, 2010). Os níveis séricos de vitamina D refletem tanto o consumo dietético quanto a exposição a luz solar e precisam ser conhecidos, pois níveis inadequados dessa vitamina podem comprometer a saúde (HOLICK, 2017b).

A 25(OH)D₃ é o marcador mais adequado dos estoques fisiológicos de vitamina D, pois sua concentração sérica, indica o somatório da produção biológica proveniente da exposição solar e da dieta (HOLICK et al., 2011a). Ademais, a 25(OH)D₃ possui meia vida sérica de duas a três semanas, enquanto a da 1,25(OH)₂D₃ é de seis horas (MOSEKILDE, 2005).

Existem controvérsias em relação aos valores de referência para os níveis séricos de 25(OH)D3 para humanos e pouco se discute sobre os valores de referência para os roedores (BATTAULT et al., 2013; BROUWER-BROLSMA et al., 2013; MAKHA et al., 2008). Em humanos os pontos de corte são apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1 - Valores séricos de vitamina D e a classificação quanto a normalidade, insuficiência e deficiência

Classificação	Institute of Medicine	Endocrine Society	Vitamin D Council
Normal	> 20 ng/ml	> 30 ng/ml	> 40 ng/ml
Insuficiência	10 - 20 ng/ml	20 - 30 ng/ml	20 - 40 ng/ml
Deficiência	< 10 ng/ml	12 - 20 ng/ml	12 - 20 ng/ml

Fonte: Adaptado de BOUILLON, 2017.

A deficiência de vitamina D, definida como níveis séricos <10 ng/mL (25 nmol/L) é comum em muitos países em desenvolvimento (afetando até 50% da população), enquanto é menos comum nos Estados Unidos da América (afetando 6% da população) (ARABI, EL RASSI, EL-HAJJ FULEIHAN, 2010; SCHLEICHER et al., 2016). No entanto, a insuficiência de vitamina D definida com níveis séricos de 25(OH)D3 entre 10 ng/mL (25 nmol/L) e 20 ng/mL (50 nmol/L), afeta mais de um quarto dos seres humanos no mundo (HILGER et al., 2014; MITHAL et al., 2009). Essas concentrações séricas de 25(OH)D3 são consideradas como um estado de inadequação nutricional que precisa de intervenção (BOUILLON, 2017).

De acordo com os critérios da *Endocrine Society*, os níveis séricos de 25(OH)D3 devem ser >30 ng/mL (75 nmol/L), o que significa que a maioria da população mundial pode ser diagnosticada com insuficiência de vitamina D (HOLICK et al., 2011b, HOLICK 2012). As diretrizes de uma forma geral concordam que as concentrações séricas de 25(OH)D3 menores que 10- 12 ng/mL (25-30 nmol/L) devem ser evitadas em todas as idades, pois níveis

baixos constituem fator de risco para raquitismo, osteomalácia entre outros problemas de saúde (BOUILLON, 2017). Além disso, o *Institute of Medicine* e a maioria das diretrizes concluem que os níveis séricos de 25(OH)D3 maiores que 20 ng/mL (50 nmol/L) são suficientes para 97,5% da população geral (BOUILLON, 2017; ROSS et al., 2011).

1.1.1 Metabolismo da vitamina D na gestação

Durante a gestação ocorrem alterações fisiológicas que afetam o metabolismo e o transporte da vitamina D. Essas modificações tem como objetivo fornecer cálcio suficiente para promover a mineralização óssea fetal adequada (BRANNON, PICCIANO, 2011). Dentre essas alterações podemos citar: os aumentos do calcitriol sérico, da DBP, do VDR placentário, além da elevação das atividades renal e placentária da CYP27B1 (OLMOS-ORTIZ et al., 2015).

O armazenamento da vitamina D inicia-se durante a gestação, quando essa vitamina é transferida da mãe para o feto por via transplacentária (WAGNER et al., 2012a). A 25OHD3 materna atravessa a membrana placentária e é a principal fonte de vitamina D para o feto (BRANNON, PICCIANO, 2011; KALUDJEROVIC, VIETH, 2010). Contudo, o metabólito ativo 1,25(OH)2D3 não atravessa a placenta (SHIN et al., 2010). No entanto, a presença da CYP27B na placenta e nos rins do feto é capaz de converter a forma inativa da vitamina D, recebida da circulação materna, em seu metabólito ativo, suprimindo a falta de passagem transplacentária da 1,25(OH)2D3 (ADAMS, HEWISON, 2012).

As concentrações da 25OHD3 no sangue do cordão umbilical do feto variam de 68% a 108% dos níveis maternos (DROR, ALLEN 2010). Por tanto, a manutenção de níveis séricos adequados de vitamina D durante a gestação é essencial para prevenir níveis inadequados dessa vitamina durante a vida intrauterina e a sua deficiência no início da vida pós-natal (HOLLIS, WAGNER, 2004).

As concentrações séricas de 25(OH)D3 materna se mantêm constantes ao longo da gestação. Contudo, os níveis séricos de calcitriol aumentam durante a gestação (KOVACS, 2011; OLMOS-ORTIZ et al., 2015). A 1,25(OH)2D3 sérica se eleva no início da gestação e os níveis mais altos são alcançados no terceiro trimestre, sendo cerca de duas a três vezes maiores do que o observado em mulheres não grávidas (MØLLER et al., 2013; WAGNER et al., 2012c).

O aumento da 1,25(OH)2D3 induzido pela gestação pode depender da disponibilidade do substrato de 25(OH)D3 (HOLLIS et al., 2011; HOLLIS, WAGNER, 2017a). O aumento dos níveis séricos de calcitriol também está associado com a elevação da síntese e a maior atividade do CYP27B1 nos rins maternos, nos trofoblastos placentários e na decídua (KOVACS, KRONENBERG, 1997; WEISMAN et al., 1979).

Ao longo da gestação ocorre aumento da síntese da proteína relacionada com o PTH (PTH-rP) que é sintetizado pela paratireoide e placenta (SIMMONDS, KOVACS, 2010). Essa proteína pode atingir a circulação materna e ligar-se ao receptor do tipo I do PTH, e pode induzir a expressão gênica do CYP27B1 no rim e catalisar a síntese do calcitriol (VON WEBSKY et al., 2018).

Um estudo prévio mostrou que durante a gestação ratas nefrectomizadas apresentaram níveis séricos de calcitriol semelhantes aos observados nas ratas gestantes controles, o que ressaltou a importância da placenta na síntese de calcitriol (BLUM et al., 1999). Posteriormente, foi identificada a expressão da proteína CYP27B1 nas células placentárias e trofoblásticas confirmando então, o papel da placenta como um órgão capaz de produzir calcitriol (ZEHNDER et al., 2001).

A DBP tem papel importante na manutenção de reservas séricas dos metabólitos da vitamina D porque modula as taxas de biodisponibilidade, ativação e capacidade de resposta dos órgãos alvos da vitamina D (SAFADI et al., 1999). Cerca de 85% a 90% da 25(OH)D3 e 1,25(OH)2D3 estão fortemente ligadas à DBP na circulação, enquanto que uma quantidade menor (10% a 15%) está ligada à albumina. Menos de 1% da vitamina D está presente na circulação na forma livre (BIKLE et al., 1985; CHUN et al., 2014).

A gestação está associada com o aumento dos níveis séricos da vitamina D (MØLLER et al., 2012). Essa situação resulta da estimulação da síntese da DBP pelo estrogênio (MØLLER et al., 2012). Estudos mostraram que seus níveis aumentam cerca de 25% a 56% durante a gestação (RITCHIE et al., 1998; WILSON et al., 1990). Outros autores comentam que os níveis séricos da DBP em gestantes correlacionam-se com os níveis séricos de calcitriol, mostrando que o aumento da DBP pode estar vinculado a elevação da concentração do calcitriol na gestação (BIKLE et al., 1984). No entanto, estudos sugerem que a alta concentração de DBP sob efeitos estrogênicos na gestação pode ser responsável pelas baixas concentrações de vitamina D em gestantes e seus recém-nascidos porque a DBP liga-se a vitamina D (DONERAY et al., 2018).

No que se refere ao VDR, a expressão tanto do gene quanto da proteína é maior nos tecidos placentários e na decídua durante o primeiro e segundo trimestres (EVANS et al.,

2004; ZEHNDER et al., 2002). Os níveis mais altos de expressão ocorrem no primeiro trimestre na decídua, mostrando a importância do calcitriol durante a primeira parte da gestação (ZEHNDER et al., 2002). O VDR placentário está positivamente correlacionado com a transferência materno-fetal de cálcio assim a abundância de VDR na placenta é importante para saúde óssea fetal (YOUNG et al., 2014).

1.1.2 Metabolismo da vitamina D na lactação

As concentrações de 25(OH)D₃ não mudam significativamente durante a lactação nos roedores (LOBAUGH et al., 1990). Em contrapartida, na lactação os níveis séricos do calcitriol aumentam cerca de duas a três vezes em relação a concentração normal até o desmame (KOVACS, 2012). A redução dos níveis séricos de cálcio e o aumento do PTH, observado na maioria dos estudos com roedores em lactação, provavelmente contribuem para o aumento do calcitriol. O aumento dos níveis séricos do PTH pode explicar parte do aumento do calcitriol durante a lactação. Estudos prévios mostraram que em ratas paratireoidectomizadas em lactação os níveis de calcitriol corresponderam a metade das concentrações observadas no grupo controle, embora o nível alcançado tenha sido pelo menos o dobro em relação ao observado em roedores não lactantes (LOBAUGH et al., 1993; PIKE et al., 1979).

Não só as concentrações de 1,25(OH)₂D₃ são elevadas durante a lactação em roedores, mas as concentrações respondem a diferentes exigências da lactação (LOBAUGH et al., 1992). Quando a dieta materna tem baixo teor de cálcio, quando o tamanho da ninhada é grande ou com lactação mais intensa, as concentrações de 1,25(OH)₂D₃ aumentam, possivelmente para que ocorra um aumento na absorção intestinal de cálcio quando a mãe enfrenta situações de demandas extras (KOVACS, 2008).

Ratas com deficiência de vitamina D e ratas VDR-nulas amamentam normalmente e têm perdas esqueléticas semelhantes aos controles. Porém, um estudo mostrou que as ratas deficientes em vitamina D perdem mais conteúdo mineral esquelético do que as ratas normais (FUDGE, KOVACS, 2010).

Estudos comentam que em humanos o nível sérico de 25(OH)D₃ diminuiu durante a lactação (MILMAN, HVAS, BERGHOLT, 2011; NARCHI et al., 2010). Em contrapartida, as concentrações do calcitriol livre e total permanecem normais ao longo da lactação e após o

desmame (JARJOU et al., 2010; WILSON et al., 1990). Entretanto, outros estudos mostraram que a lactação prolongada por período maior que seis meses está associada com maior nível sérico de calcitriol (GREER et al., 1982; KALKWARF, SPECKER, HO, 1999). Uma possível explicação associada ao aumento da concentração do calcitriol se deve ao fato da PTH-rp atingir níveis máximos durante a lactação e provavelmente estimular a CYP27B1. No entanto, há evidências de que o PTH-rp é menos potente do que o PTH para estimular a CYP27B1 e aumentar a síntese do calcitriol (HORWITZ et al., 2005). Contudo, outros estudos comentam que há declínio nas concentrações do calcitriol após a gestação. Esse fato pode ser explicado por fatores relacionados à gestação perdidos no parto, tais como os altos níveis dos hormônios estradiol e lactogênio placentário (KOVACS, 2016).

A 25(OH)D3 têm pouca penetrância no leite materno e o calcitriol não passa para o leite materno (KOVACS, 2012). Assim, os lactentes que são alimentados exclusivamente com leite materno são expostos a um maior risco de deficiência de vitamina D (KOVACS, 2008).

1.2 Programação fetal

Estudos mostram que a crescente incidência de doenças crônicas não transmissíveis pode ter origem em alterações ocorridas no ambiente intrauterino e durante o início da vida pós-natal (KERELIUK, BRAWERMAN, DOLINSKY, 2017). O surgimento de doenças na vida adulta, resultante de um insulto vivenciado em períodos iniciais da vida, foi inicialmente postulado por Barker e colaboradores, e denominado origem fetal ou programação fetal das doenças do adulto (BARKER, OSMOND, LAW, 1989).

A programação fetal é um fenômeno pelo qual um estímulo ou insulto sofrido durante um período crítico do desenvolvimento, como gestação e/ou lactação, resulta em modificações morfológicas, metabólicas e fisiológicas permanentes. Esses efeitos em longo prazo são irreparáveis e irreversíveis, sendo observados na vida adulta mesmo na ausência do estímulo desencadeante do mecanismo adaptativo (BARKER, 1994; BARKER, 1995; BARKER, CLARK, 1997; LUCAS, 1991).

As primeiras evidências da programação fetal são provenientes de estudos epidemiológicos retrospectivos a partir dos quais foram feitas associações entre alterações do ambiente pré-natal e perinatal e o desenvolvimento de síndrome metabólica (SMet) na idade adulta (JUNIEN, NATHANIELSZ, 2007). Estudos sobre a escassez de alimentos durante o

período conhecido como “Fome do Inverno Holandês” (1944-1945) mostraram que as crianças nascidas durante a fome apresentavam diminuição do crescimento fetal, redução da tolerância à glicose, maior circunferência da cintura, obesidade, dislipidemia, aumento do risco de diabetes tipo 2, doença arterial coronariana e maior mortalidade em comparação com crianças nascidas após o término da fome (PAINTER et al., 2006; RAVELLI et al., 1998; RAVELLI et al., 1999; RAVELLI, STEIN, SUSSER, 1976; VAN ABEELLEN et al., 2012) .

Outro período de fome decorrente de conflitos humanos que também forneceu evidências da programação fetal foi o cerco ao Leningrado pelo exército alemão entre 1941 e 1944. Os indivíduos que foram expostos à desnutrição apresentaram evidência de disfunção endotelial e maior influência da obesidade na pressão arterial (STANNER et al., 1997). Contudo, as associações entre desnutrição intrauterina e intolerância à glicose, hiperlipidemia e doenças cardiovasculares (DCV) na idade adulta não foram observadas no estudo do cerco ao Leningrado (STANNER et al., 1997; STANNER, YUDKIN, 2001). Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a população de Leningrado foi exposta a menos nutrientes durante e após o nascimento (YUDKIN, STANNER, 1998). Essa população não experimentou um período de disponibilidade suficiente de alimentos após a guerra, em disparidade com a população holandesa, porque o inverno da fome teve duração menor (cerca de cinco a sete meses). Esses estudos forneceram evidências de que o ambiente intrauterino materno tem repercussões sobre a saúde no início da vida e condiciona a prole ao risco de desenvolvimento de doenças metabólicas tais como obesidade, diabetes tipo 2 e DCV na idade adulta (BARKER et al., 1993; DUPONT et al., 2012; NAVARRO et al., 2017; REMACLE et al., 2011).

Sabe-se que existe uma janela crítica temporal para o crescimento e o desenvolvimento, que pode ser programada pela nutrição (MCCANCE, 1962). A nutrição materna inadequada pode alterar o suprimento de nutrientes para o feto. Assim, o feto se adapta a um ambiente intrauterino adverso, otimizando a utilização de nutrientes para assegurar sua sobrevivência, aperfeiçoa o crescimento de órgãos vitais, como o cérebro, em detrimento de órgãos periféricos (BARKER, 1992, 2007). O que denota nesse sentido, um fenômeno adaptativo que foi chamado de “hipótese do fenótipo econômico” desencadeando adaptações metabólicas a fim aumentar as chances de sobrevivência pós-natal, garantir melhor aproveitamento dos nutrientes e estimular o seu armazenamento quando disponíveis (HALES, BARKER, 2001).

As alterações podem ocorrer de forma permanente, na forma de uma “programação”. A ideia dessa hipótese tem sido expandida com a “resposta adaptativa preditiva”, que propõe

que o feto interage com o ambiente materno prevendo o meio em que é provável que nasça, adaptando-se para ganhar uma futura vantagem competitiva (GLUCKMAN, HANSON, 2006). Esses comportamentos que resultam da experiência inicial de vida, também podem ser definidos como *imprinting* metabólico (MCMILLEN, ROBINSON, 2005) e, da mesma forma, a plasticidade no desenvolvimento pode tornar-se prejudicial em sua sobrevivência quando a adequada ou excessiva nutrição é vivenciada no ambiente pós-natal (GLUCKMAN et al., 2007; MARTIN-GRONERT, OZANNE, 2010). Portanto, desordens metabólicas e endócrinas poderão se manifestar, quando houver incompatibilidade entre o ambiente previsto e o real, ou seja, quando a dieta na vida adulta divergir do plano previsto pelo feto no ambiente intrauterino (MARTIN-GRONERT, OZANNE, 2010).

Alterações nutricionais ocorridas no ambiente intrauterino e no início da vida pós-natal podem induzir o *catch-up* de crescimento (CIANFARANI, GERMANI, BRANCA, 1999). Nesse processo ocorre crescimento acelerado após o baixo peso ao nascimento, que promove aumento da deposição de gordura na idade jovem (*catch-up fat*), hiperinsulinemia e desenvolvimento de DCV na idade adulta (KELISHADI et al., 2015; MEAS, 2010).

A epigenética é um dos mecanismos que explica a relação entre o ambiente da vida intrauterina e a susceptibilidade a doenças crônicas na vida adulta. O termo epigenética refere-se a modificações reversíveis e transmissíveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do ácido desoxirribonucleico (DNA) (REICHETZEDER et al., 2014, 2016).

Os mecanismos epigenéticos modulam os efeitos de quase todas as exposições ambientais sobre os fenótipos de saúde e doença por intermédio de regulação da transcrição, por meio de diversos processos, tais como a metilação de ilhas CpG no DNA nuclear, modificação pós-transcricional de proteínas histonas (acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação) e RNA de interferência (REICHETZEDER et al., 2014, 2016). A regulação epigenética representa por tanto, um dos mecanismos pelo qual as condições nutricionais maternas podem modular a expressão gênica e conseqüentemente o fenótipo fetal (HOCHBEG et al., 2011). As modificações epigenéticas estão envolvidas na diferenciação celular e no fenômeno da plasticidade do desenvolvimento em resposta às influências ambientais preparando o indivíduo para o meio extrauterino, podendo potencializar uma vantagem de sobrevivência por meio da regulação diferencial dos genes (GAO et al., 2014).

A partir de evidências observadas em estudos prévios, diversos modelos experimentais de programação fetal foram desenvolvidos e investigaram como a nutrição materna promove o desenvolvimento de distúrbios metabólicos na prole. Dentre esses modelos experimentais

podemos citar os seguintes: restrição energética (DURAN FERNANDEZ-FEIJOO et al., 2017), restrição proteica (GONZALEZ et al., 2016), dieta restrita em ferro (VIEYRA-REYES et al., 2017), diabetes gestacional (DONG et al., 2017), dieta hiperlipídica (HUANG et al., 2017), dieta rica em sacarose (WU et al., 2016), dieta com alto teor de frutose (TAIN, CHAN, HSU, 2016), dieta restrita em folato (MCKAY et al., 2017), dieta restrita em vitamina B12 (AHMAD et al., 2015), dieta restrita em vitamina A (CHIEN et al., 2016), dieta restrita em vitamina E (ROSARIO, GOMEZ, ANBU, 2008), dieta com restrição de vitamina D (MAIA-CECILIANO et al., 2016) entre outros.

Os modelos de programação fetal por restrição materna de micronutrientes mostram que ocorrem alterações fisiológicas na prole que predis põem ao desenvolvimento de doenças metabólicas durante a idade adulta (AHMAD et al., 2015). No que concerne a restrição materna de ferro, os estudos mostram que há comprometimento do crescimento ponderal do feto, desenvolvimento de obesidade, HAS e outras DCV (ALWAN, HAMAMY, 2015; GAMBLING et al., 2003). A restrição de cálcio e zinco durante a gestação também prejudicam o crescimento fetal e podem causar diabetes (KHOUSHABI et al., 2016; WANG et al., 2015a).

O início de doenças crônicas que ocorrem na idade adulta também está relacionado com a deficiência materna de vitaminas (BARKER, 1998). A restrição materna de folato e vitamina B12 induz o desenvolvimento de anemia, DCV e alterações renais na prole adulta (AHMAD et al., 2015).

A deficiência de vitamina D é comum em gestantes e seus recém-nascidos (GINDE et al., 2010). A hipovitaminose D na gestação tem sido observada em muitas partes do mundo (SARAF et al., 2016). O armazenamento da vitamina D inicia-se durante a gestação, quando essa vitamina é transferida da mãe para o feto por via transplacentária (WAGNER et al., 2012b). Portanto, a manutenção de níveis séricos adequados de vitamina D durante a gestação é essencial para prevenir níveis inadequados dessa vitamina durante a vida intrauterina e a sua deficiência no início da vida pós-natal (HOLLIS, WAGNER, 2004).

Existe uma alta prevalência de deficiência de vitamina D em todo o mundo que se tornou uma preocupação para os pesquisadores e as sociedades por causa dos potenciais efeitos adversos na saúde humana (VON WEBSKY et al., 2018). Gestantes e seus filhos constituem grupos de alto risco para deficiência de vitamina D e são, portanto, o foco de pesquisas atuais (VON WEBSKY et al., 2018).

1.3 Restrição (insuficiência ou deficiência) materna de vitamina D e programação fetal

A deficiência de vitamina D em gestantes e infantes é um problema de saúde que tem sido observado em muitas partes do mundo (ABBASIAN et al., 2016). A insuficiência ou deficiência materna de vitamina D afeta tanto a saúde da mãe como a do feto, e tem impacto sobre o desenvolvimento de doenças crônicas na prole na idade adulta (VON WEBSKY et al., 2018).

Estudos mostram que os baixos níveis séricos de vitamina D maternos constituem fatores de risco para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia e do diabetes *mellitus* gestacional (DMG) (AMRAEI et al., 2018; BACA et al., 2016).

A pré-eclâmpsia é uma síndrome multifatorial que ocorre durante a gestação, que pode ter um início precoce, mas normalmente os sintomas surgem no terceiro trimestre (JAMES, WHITLEY, CARTWRIGHT, 2010). A HAS e proteinúria são sintomas característicos da pré-eclâmpsia (JAMES, WHITLEY, CARTWRIGHT, 2010). Uma resposta inflamatória exagerada é observada na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, além da disfunção endotelial e os desequilíbrios angiogênicos que perturbam as trocas materno-fetal (JAMES, WHITLEY, CARTWRIGHT, 2010). A vitamina D autócrina placentária exerce efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios na decídua materna e trofoblasto fetal. A Vitamina D trofoblástica é importante para controlar a inflamação placentária (LIU et al., 2011). A vitamina D também exerce um efeito protetor na vascularização placentária e angiogênese em um estágio muito precoce da gestação e, por tanto é necessário entrar na gestação com um nível plasmático de vitamina D adequado (HOLLIS, WAGNER, 2017b).

O DMG é uma complicação comum da gestação com consequências adversas a curto e longo prazo para a saúde tanto da mãe quanto da criança (DAMM et al., 2016). A vitamina D pode influenciar a tolerância à glicose durante a gestação (TRIUNFO, LANZONE, LINDQVIST, 2017). Estudos mostram que a deficiência materna de vitamina D na gestação foi significativamente associada a um elevado risco para DMG (LU et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

A vitamina D regula a produção da insulina nas células beta-pancreáticas, pode influenciar na secreção de insulina e na sensibilidade dos tecidos sensíveis à ação da insulina, por meio de seus efeitos nos níveis de cálcio intracelular (REICHETZEDER et al., 2014; TRIUNFO, LANZONE, LINDQVIST, 2017). Os polimorfismos do gene do VDR também podem estar envolvidos no desenvolvimento do DMG (ALVAREZ, ASHRAF, 2010).

A literatura mostra que há associação entre a hipovitaminose D e os resultados adversos da gestação tais como o comprometimento do crescimento fetal e parto prematuro (VON WEBSKY et al., 2018). A deficiência de vitamina D durante a gestação faz com que o feto em crescimento fique exposto a níveis inadequados de vitamina D, que é um fator essencial para um desenvolvimento normal. Portanto, nos recém-nascidos, a deficiência materna de 25(OH)D3 tem sido associada ao baixo peso no nascimento, bebês pequenos para a idade gestacional, hipocalcemia e raquitismo (REICHETZEDER et al., 2014; ROBINSON et al., 2006; WANG et al., 2018).

Os antecedentes de DCV podem se originar muito precocemente. Fatores endócrinos como a deficiência materna de vitamina D, alterações do SRA fetal e materno, têm o potencial de programar a vulnerabilidade a longo prazo para o desenvolvimento de HAS, SMet e DCV (CHEN et al., 2014; GEZMISH, BLACK, 2013). A restrição de vitamina D durante o período perinatal induz alterações nos componentes do SRA que afetam a nefrogênese e promovem o desenvolvimento de doenças crônicas como a HAS na vida pós-natal (LAPILLONNE, 2010; MAKKA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2012).

Um estudo realizado anteriormente verificou que a deficiência de vitamina D, no período perinatal, promove em roedores, o aumento do número de glomérulos menores e imaturos (MAKA et al., 2008). Além disso, a deficiência de vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal estimula o SRA, induz liberação de moléculas pró-inflamatórias que promovem estresse oxidativo, disfunção endotelial, aumento da permeabilidade vascular, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas que estão implicadas na patogênese da HAS (MARCHESI, PARADIS, SCHIFFRIN, 2008; ROBEY, CRANE-GODREAU, 2013). De acordo com Ni et al. (2014), a eliminação seletiva do VDR em células endoteliais, promove a diminuição da expressão da ONS-e além do aumento da deposição de colágeno e diminuição das fibras elásticas na aorta, mostrando que a vitamina D regula o relaxamento e a pressão arterial (NI et al., 2014).

Um dos principais aspectos da programação fetal é o desenvolvimento de características da SMet na idade adulta, tais como a intolerância à glicose e a HAS (REICHETZEDER et al., 2014). Em roedores, a restrição materna de vitamina D causa RI com hipertrofia da ilhota pancreática e hiperinsulinemia (NASCIMENTO et al., 2013). A deficiência de vitamina D promove o aumento da atividade do SRA no pâncreas que induz elevação do estresse oxidativo e inflamação o que compromete a função das ilhotas pancreáticas e aumenta a RI no pâncreas. Essas alterações estão relacionadas com a perda do controle glicêmico (CHENG, BOUCHER, LEUNG, 2013).

Outros estudos sugerem que a restrição de vitamina D durante a gestação se reflete sobre o metabolismo de carboidratos ocasionando RI, intolerância à glicose e aumento do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) que está associado com o aumento da inflamação após o nascimento (ZHANG et al., 2014). O NF- κ B é um potente indutor da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- α e a interleucina-6, que atuam como antagonistas à ação da insulina contribuindo para o desenvolvimento da RI (SHOELSON, LEE, GOLDFINE, 2006). A restrição de vitamina D também desencadeia o acúmulo de gordura corporal e pode promover o aumento da adiposidade na prole (CROZIER et al., 2012). O aumento da adiposidade promove acúmulo de vitamina D nos adipócitos. Isso reduz a sua biodisponibilidade e aciona o hipotálamo para gerar uma cascata de reações que leva ao aumento da sensação de fome e redução do gasto energético, de modo a compensar a falta da vitamina (POURSHAHIDI, 2015; WOOD, 2008; WORTSMAN et al., 2000). Entre essas reações está o aumento do PTH, que promove lipogênese e pode modular a adipogênese por meio da supressão do VDR, que inibe compostos envolvidos na diferenciação e maturação dos adipócitos (MARWAHA et al., 2017; SUN, ZEMEL, 2008). Além disso, o calcitriol inibe a expressão da proteína desacopladora-2 (envolvida na regulação do metabolismo, na termogênese induzida pela dieta e no controle do peso corporal), por meio do VDR nos adipócitos, e aumenta, assim, a eficiência de energia (MAJOR et al., 2008). A regulação pelo calcitriol da proteína desacopladora-2 e dos níveis de cálcio intracelular parece desempenhar um efeito sobre o metabolismo da energia ao afetar a apoptose de adipócito (MAJOR et al., 2008).

O complexo sistema do metabolismo da vitamina D possui muitos alvos. O próprio *status* de vitamina D pode induzir alterações epigenéticas em vários genes, incluindo genes do metabolismo da vitamina D (FETAHU, HÖBAUS, KÁLLAY, 2014). A vitamina D é um micronutriente importante que pode influenciar o estado de metilação do genoma, comparável a outros componentes nutricionais da dieta materna (DOMINGUEZ-SALAS et al., 2014).

Na prole de roedores provenientes de pais com deficiência de vitamina D foi encontrada a hipermetilação de um gene relevante para o controle da pressão arterial (MEEMS et al., 2016). Jung e colaboradores (2016) encontraram diferenças nos perfis de metilação do DNA no sangue do cordão umbilical de recém-nascidos com altos níveis de 25(OH)D3 em comparação com aqueles com baixas concentrações de 25(OH)D3 (JUNGE et al., 2016).

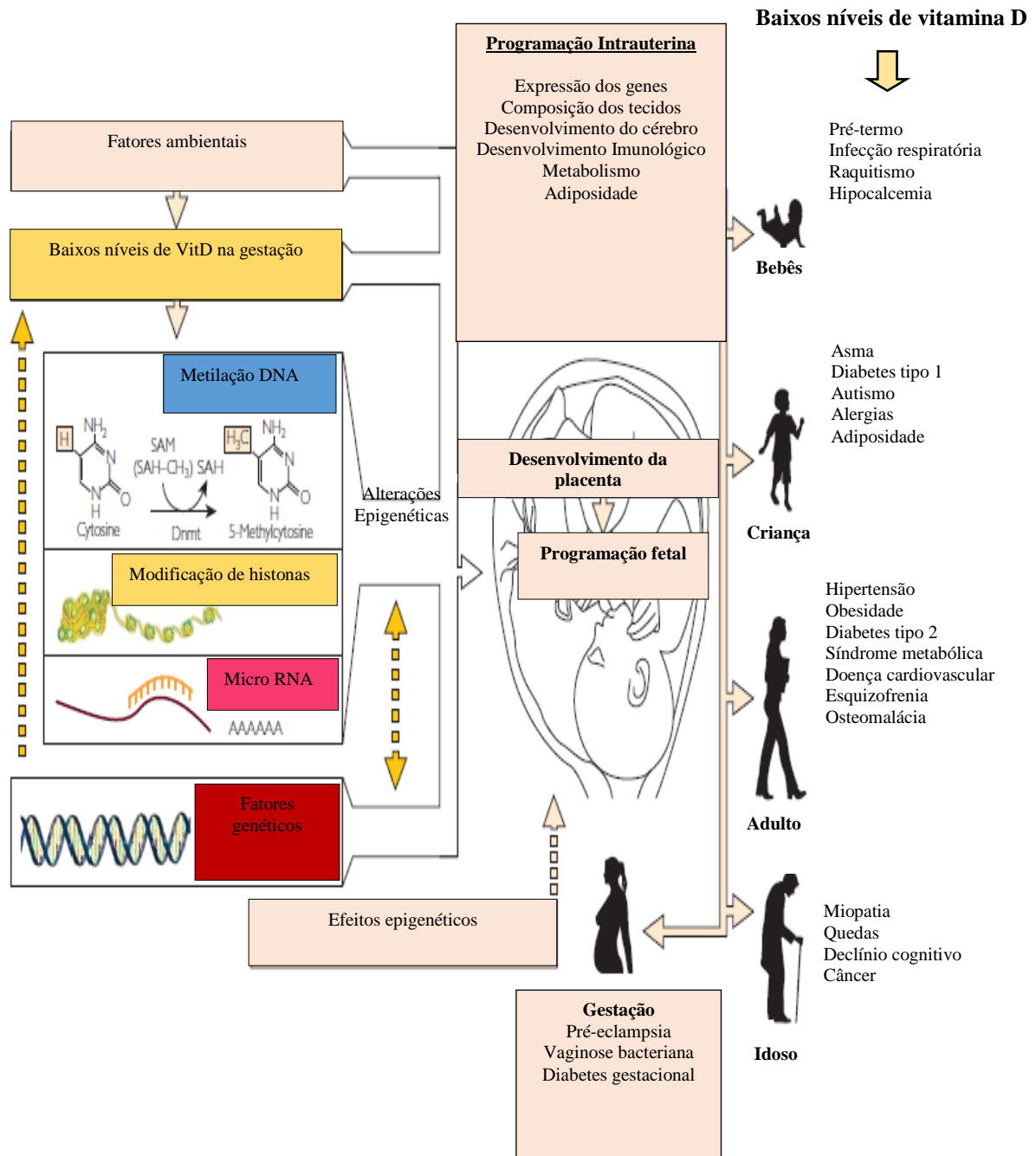
A metilação do DNA pode influenciar como um determinado gene é expresso. Em geral, a hipermetilação na região promotora de um gene geralmente está ligada ao

silenciamento de genes e diminuição da expressão gênica (REICHETZEDER et al., 2016). Em contrapartida, a hipometilação na região promotora de um gene, em geral, leva a uma maior expressão gênica (REICHETZEDER et al., 2016).

As modificações epigenéticas também podem afetar a expressão dos genes envolvidos na síntese e degradação da vitamina D e, conseqüentemente, promoverem um impacto direto no estado de vitamina D. A hipometilação do CYP2R1 hepático, o gene que codifica uma 25-hidroxilase crucial para a produção de 25(OH)D₃, poderia explicar uma expressão aumentada da enzima CYP2R1 e um aumento subsequente nos níveis de 25 (OH) D₃ (ZHOU et al., 2014). Reciprocamente, a hipermetilação e concomitante redução na expressão do gene CYP24A1, que codifica uma importante enzima de catabolismo de vitamina D, levaria a um aumento da 1,25(OH)₂ D₃ (ZHOU et al., 2014). O CYP24A1 da placenta é especificamente hipermetilado durante a gestação (NOVAKOVIC et al., 2009). Assim, uma diminuição da expressão da CYP24A1 na placenta pode levar a uma redução na degradação local da 1,25(OH)₂D₃ e, portanto, pode melhorar a disponibilidade da 1,25 (OH)₂ D₃ para o feto na interface materno-fetal (VON WEBSKY et al., 2018).

A restrição materna de vitamina D também pode afetar órgãos dependentes de andrógenos uma vez que o estado nutricional materno é capaz de influenciar o desenvolvimento desses órgãos (RAMOS et al., 2010). Estudos prévios mostraram que a dieta hiperlipídica durante a gestação e/ou lactação promoveu danos estruturais e prejudicou a esteroidogênese nas células de Leydig na prole adulta. Além disso, também induziu hipertrofia e aumento da proliferação celular na próstata associados com a diminuição dos receptores de androgênios (PINTO-FOCHI et al., 2016; PYTLOWANCIV et al., 2016). Esses resultados mostraram que estruturas andrógeno dependentes são afetadas pela nutrição materna. Porém, pouco se sabe sobre a influência da restrição de vitamina D na histomorfologia do pênis.

Figura 3 - Vitamina D e programação fetal



Legenda: A figura mostra a influência da vitamina D no desenvolvimento da placenta, nas alterações epigenéticas e na programação fetal.

Fonte: Adaptado de (Hossein-nezhad, Holick, 2013).

1.4 Vitamina D e pênis

A vitamina D é considerada um potente hormônio esteroide que promove efeitos sobre os diversos órgãos, incluindo o pênis (CANGUVEN et al., 2017; PILZ et al., 2011; TALIB, KHALAFALLA, CANGUVEN, 2017).

As atividades biológicas da vitamina D são mediadas pelo VDR. O VDR e as enzimas que metabolizam a vitamina D encontram-se expressos nos testículos, espermatozoides, epidídimo, vesícula seminal, próstata e rim o que mostra a importância dessa vitamina no sistema urogenital e na reprodução (BLOMBERG JENSEN et al., 2010; BOUILLON et al., 2008).

A vitamina D é um micronutriente essencial para a manutenção das funções vitais, boa saúde, incluindo a ereção peniana (TALIB, KHALAFALLA, CANGUVEN, 2017). A deficiência de vitamina D está associada com a dislipidemia aterogênica, diabetes *mellitus*, redução dos níveis séricos de testosterona e HAS. Essas alterações metabólicas estão relacionadas com a disfunção endotelial e são fatores de risco clássicos para o início da DE (CARETTA et al., 2016; HOLICK, 2004). O aumento do vazamento venoso cavernoso está associado com essas alterações metabólicas, que promovem danos às células endoteliais e diminuem a produção do óxido nítrico (ON), que é essencial para manter a ereção (ANDRUKHOVA et al., 2014; CARETTA et al., 2016). A redução da produção do ON impede a vasodilatação e ocasiona a aterosclerose por promover a vasoconstrição, crescimento do músculo liso vascular, diminuição da fibrinólise e trombose (BECKMAN, CREAGER, LIBBY, 2002; WILLIAMS et al., 1996).

A hipovitaminose D além de exacerbar os fatores de risco clássicos para as DCV pode levar diretamente à DE (AL MHEID et al., 2011; SORENSON, GRANT, 2012). As artérias penianas são menores do que as outras artérias que irrigam outras áreas do corpo, o primeiro sintoma da aterosclerose pode ser manifesto como DE, assim a DE é um dos melhores preditores das DCV (GAZZARUSO et al., 2011; MELDRUM et al., 2011).

A vitamina D também regula a produção de ON e das óxido nítrico sintetases partir da L-arginina (MOLINARI et al., 2011). O ON causa relaxamento do músculo liso vascular e a redução da sua biodisponibilidade pode causar danos no músculo liso e nos nervos do pênis, o que pode contribuir para a DE (THORVE et al., 2011).

A ereção é uma série complexa de sistemas de controle integrado que envolve as células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, matriz extracelular e nervos (YIN et al.,

2015, 2017). A integridade estrutural e funcional do pênis é essencial para a manutenção da função erétil normal (PINHEIRO et al., 2000).

Baixos níveis séricos de vitamina D também estão relacionados com a diminuição da concentração de testosterona no soro de ratos e humanos, o que pode alterar a morfologia do pênis e a fisiologia da ereção (RAFIQ et al., 2016b; TAK et al., 2015). Indivíduos com deficiência de vitamina D apresentaram redução da testosterona sérica, aumento da espessura da túnica íntima da artéria cavernosa, redução do fluxo na artéria e declínio da função erétil (CARETTA et al., 2016).

Uma recente análise transversal mostrou que a deficiência de vitamina D está associada com uma maior prevalência de DE (FARAG et al., 2016). Foi mostrado também que a suplementação de vitamina D melhora os níveis de testosterona, a SMet e a função erétil em homens de meia idade com deficiência de vitamina D (CANGUVEN et al., 2017). Barassi e colaboradores (2014) mostraram que pacientes com DE têm deficiência de vitamina D e que essa condição é mais frequente em pacientes com etiologia aterogênica (BARASSI et al., 2014). Baixos níveis de vitamina D podem aumentar o risco de DE ao promoverem a disfunção endotelial (BARASSI et al., 2014). A vitamina D tem influência antiproliferativa nas células musculares lisas o que indica propriedades antiateroscleróticas que podem influenciar positivamente na DE (CHEN, LAW, GARDNER, 2010; SOMJEN et al., 2005).

1.5 Morfologia do pênis de rato

O pênis dos roedores não é o mais semelhante ao pênis humano no entanto, estudos utilizam esse modelo para investigar as alterações morfológicas resultantes de condições patológicas (FELIX-PATRÍCIO et al., 2015; KOVANEZ et al., 2016).

O pênis do rato é classificado morfológicamente como fibro-elástico (PINHEIRO et al., 2000), e é dividido em três porções: proximal, média e distal. O pênis dos roedores possui a formação de um ângulo reto na região de transição entre a porção média do órgão e a glândula, e um osso cilíndrico que se estende da porção distal da porção média peniana ao topo da glândula (VILMANN, VILMANN, 1979). Esse osso em alguns animais auxilia no momento da cópula dando suporte a esse órgão (VILMANN, VILMANN, 1979). A glândula é revestida pelo prepúcio que é uma dobra de pele, que possui tecido conjuntivo altamente vascularizado.

A região peniana que possui estruturas semelhantes ao pênis humano, apesar de ter organização estrutural diferente, é a porção média. A porção média do pênis do rato é composta por dois corpos cavernosos, unidos entre si e localizados dorsalmente ao corpo esponjoso. Os corpos cavernosos são separados por um septo intercavernoso contendo vasos sanguíneos, nervos constituídos por fibras nervosas autonômicas (parassimpáticas e simpáticas) e somáticas, e de um corpo esponjoso localizado ventralmente (GOLDSTEIN et al., 1982; PINHEIRO et al., 2000). Cada estrutura erétil é recoberta por uma túnica fibrosa, denominada túnica albugínea (PINHEIRO et al., 2000).

As trabéculas dos corpos cavernosos são formadas por tecido conjuntivo, predominantemente por fibras colágenas, que conferem suporte às células musculares lisas, que circundam os espaços sinusoidais (GOLDSTEIN et al., 1982). Tanto o corpo cavernoso como o corpo esponjoso apresentam um parênquima musculo vascular cuja unidade funcional é o espaço sinusoidal.

Os espaços sinusoidais são preenchidos por sangue para a intumescência e rigidez peniana durante a ereção. Os espaços sinusoidais são cavidades alveolares forradas por células endoteliais e musculares lisas (GOLDSTEIN et al., 1982). Cada espaço sinusoidal é irrigado por uma arteríola que é um ramo terminal das artérias helicinais, e é drenado por vênulas que confluem com as dos sinusoides vizinhos para formarem as veias emissárias que atravessam a túnica albugínea (GOLDSTEIN et al., 1982).

O corpo cavernoso do rato difere do humano por possuir menores quantidades de músculo liso, fibras elásticas e maiores quantidades de colágeno (PINHEIRO et al., 2000). O músculo liso do pênis do rato localiza-se na região perissinusoidal, enquanto no homem o músculo liso mistura-se ao tecido conjuntivo e elástico para formar as trabéculas do corpo cavernoso (GOLDSTEIN et al., 1982).

O corpo esponjoso contém a uretra localizada centralmente, também possui sinusoides e trabéculas, porém em menores proporções que a dos corpos cavernosos (GOLDSTEIN et al., 1982). A túnica albugínea consiste de uma camada fibrosa externa e uma camada celular interna que envolve os corpos cavernoso e esponjoso, é formada basicamente por tecido conjuntivo fibroso e elástico (PINHEIRO et al., 2000) (Figura 4).

A inervação do pênis é autonômica (vias simpáticas e parassimpáticas) e somática (vias sensoriais e motoras). A partir da medula espinal e dos gânglios periféricos, as inervações simpáticas e parassimpáticas confluem, formando o nervo cavernoso, que adentra os corpos cavernosos e esponjosos para efetuar os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescência (DEAN, LUE, 2005). A estimulação do plexo pélvico e do nervo cavernoso

induz ereção, enquanto que a estimulação do tronco simpático causa detumescência (DEAN, LUE, 2005).

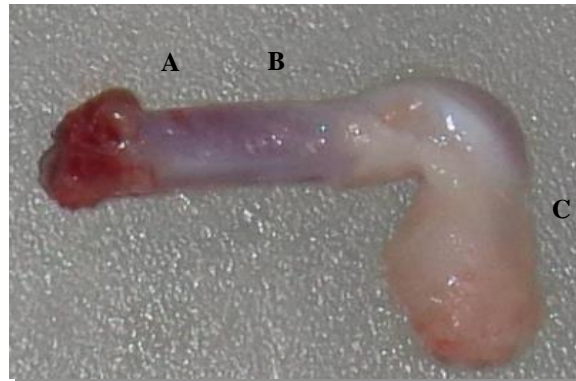
A via somatossensorial origina-se de receptores sensoriais localizados na pele do pênis, da glândula, da uretra e no interior do corpo cavernoso. O pênis é ricamente innervado por terminações sensitivas, principalmente a glândula; que tem, portanto, grande sensibilidade. A ativação desses nervos sensoriais envia mensagens de dor, temperatura e toque pelas vias espinotalâmicas e espinoreticular para o tálamo e córtex sensorial desencadeando a percepção sensorial (BURNETT et al., 1993; DEAN, LUE, 2005). O nervo dorsal do pênis supre tanto a pele quanto a glândula do pênis.

A irrigação do pênis é realizada principalmente pela artéria peniana. Essa artéria é um ramo da artéria pudenda interna, que é um ramo da artéria ilíaca interna. Da artéria pudenda interna originam-se as artérias dorsais, profundas e a bulbouretral. (BREZA et al., 1989). As artérias profundas do pênis penetram na túnica albugínea e formam a rede arterial do corpo cavernoso. As artérias profundas são os principais vasos que suprem os espaços sinusoidais, emitem vários ramos que se abrem diretamente nesses espaços. As artérias profundas do pênis adentram o pênis juntamente com as veias e os nervos cavernosos. Após adentrarem os corpos cavernosos, as artérias dividem-se em múltiplas ramificações terminais conhecidas como artérias helicinais (ANDERSSON, WAGNER, 1995; MARTÍNEZ-SALAMANCA et al., 2010).

A artéria dorsal pode ser considerada, do ponto de vista histológico, um vaso sanguíneo de eleição para mostrar os efeitos do envelhecimento e de patologias que podem afetar a artéria cavernosa e seus ramos, induzindo alterações na composição da parede. Além disso, a artéria dorsal é importante para a manutenção da homeostase e função dos tecidos penianos (BARRA, IACONO, 1997).

A drenagem venosa peniana pode ser dividida em profunda e superficial. O sistema venoso profundo drena tanto os corpos cavernosos quanto o corpo esponjoso. A principal drenagem venosa dos corpos cavernosos é realizada através das veias cavernosas, com drenagem adicional através das veias circunflexa, dorsal profunda e crural (BREZA et al., 1989). O sangue das túnicas superficiais do pênis drena para a veia dorsal superficial e dessa para a veia pudenda externa superficial (KRANE, GOLDSTEIN, DE TEJADA, 1989; PUECH-LEÃO et al., 1987).

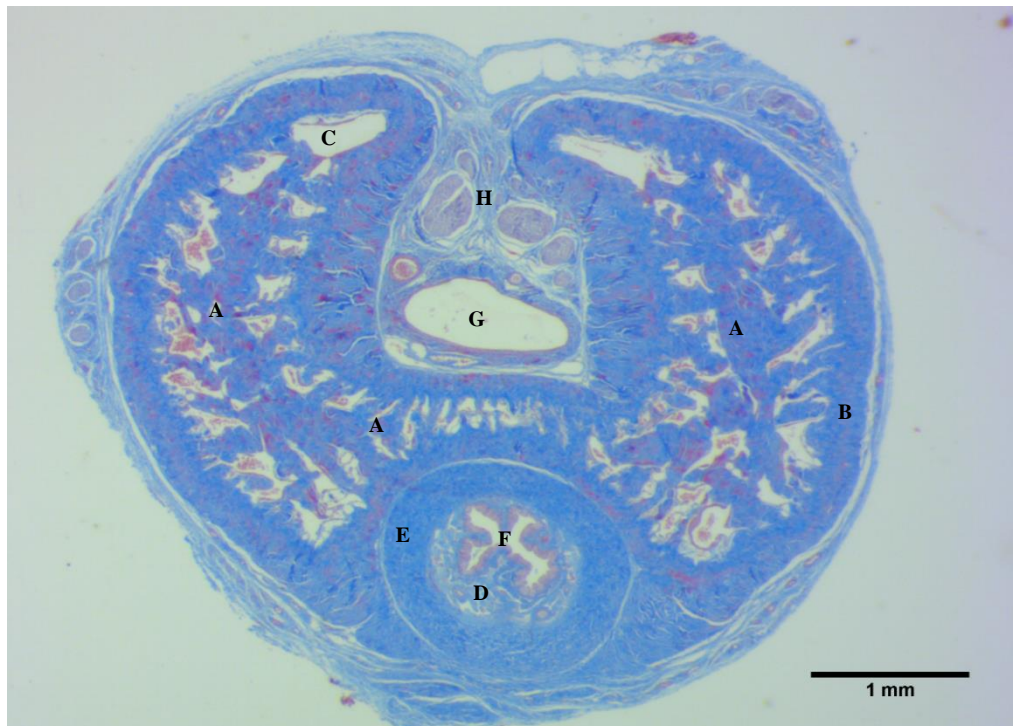
Figura 4 - Divisão anatômica do pênis do rato



Legenda: Imagem do pênis de rato após ser dissecado, com indicações de sua divisão em porções: A, proximal; B, média e C, distal. As linhas tracejadas indicam a região aproximada da divisão em porções.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 5 - Fotomicrografia do corte transversal do pênis de rato



Legenda: Fotomicrografia do corte transversal da porção média do pênis de rato corado com tricrômico de Masson, 18,9x. A, corpo cavernoso; B, túnica albugínea do corpo cavernoso; C, espaço sinusoidal; D, corpo esponjoso; E, túnica albugínea do corpo esponjoso; F, uretra; G, veia dorsal profunda e H, feixe vasculo-nervoso região dorsal do pênis.

Fonte: A autora, 2018.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da dieta restrita em vitamina D administrada durante os períodos perinatal (gestação e lactação) e vida pós-natal na histomorfologia do pênis de ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Induzir a restrição de vitamina D nas mães e nos filhotes;
- b) Avaliar o ganho de massa corporal, ingestão e eficiência alimentar, níveis séricos de glicose, insulina e 25- hidroxivitamina D3 das mães e filhotes;
- c) Comparar a ninhada e os filhotes no nascimento;
- d) Acompanhar a evolução da pressão arterial sistólica dos filhotes;
- e) Avaliar o metabolismo de carboidratos por meio da glicemia de jejum, Teste Oral de Tolerância à Glicose, insulina sérica e índice de resistência à insulina- HOMA-IR dos filhotes;
- f) Estimar por meio da técnica de morfometria: área do corte transversal do pênis, área do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea, área da túnica albugínea, área do corpo esponjoso, área da artéria dorsal, áreas do lúmen e da túnica média da artéria dorsal e área da veia dorsal profunda;
- g) Calcular a razão entre a área e o lúmen da artéria dorsal;
- h) Quantificar a densidade nuclear na túnica média da artéria dorsal;
- i) Quantificar as porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso, dos espaços sinusoidais e das fibras elásticas nos corpos cavernoso e esponjoso por métodos histoquímicos e imunohistoquímicos;
- j) Verificar a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular no corpo cavernoso por meio de imunohistoquímica indireta;
- k) Avaliar a porcentagem de vasos no corpo cavernoso, corpo esponjoso e região dorsal por meio de imunohistoquímica indireta;
- l) Avaliar a porcentagem de nervos no corpo cavernoso, corpo esponjoso e região dorsal por meio de imunohistoquímica indireta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, dietas e protocolo experimental

O projeto e o protocolo de pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo CEUA/034/2014).

Todos os procedimentos seguiram as recomendações e foram conduzidos de acordo com as diretrizes convencionais para a experimentação com animais (NIH Publicação N°. 85-23, revisado em 1996).

A linhagem utilizada (ratos *Wistar*) foi proveniente do biotério da Unidade de Pesquisa Urogenital da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente com condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$), com livre acesso à comida e à água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12h/12h claro e escuro (07 às 19h) e ciclo de exaustão de ar (15 min./hora). Os animais foram alocados em ambiente com luz incandescente, sem radiação ultravioleta, para evitar a síntese de vitamina D na pele.

Fêmeas virgens da linhagem ratos *Wistar* com 6 semanas de idade foram divididas aleatoriamente em dois grupos nutricionais: SC (fêmeas do grupo dieta padrão, dieta AIN-93G, com vitamina D3 - 0,25g/Kg, n=8) e VitD (fêmeas do grupo dieta restrita em vitamina D; dieta AIN-93G, sem vitamina D3 - 0,00g/Kg, n=9).

As dietas experimentais foram elaboradas com nutrientes purificados, em conformidade com as recomendações nutricionais para roedores do “*American Institute of Nutrition*”, e confeccionadas pela empresa PragSoluções® (Jau, São Paulo, Brasil, www.prag solucoes.com.br) (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993). A composição das dietas está na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais de acordo com as recomendações da AIN-93 (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993)

Nutriente (g/Kg)	SC-AIN93G	VitD- AIN93G	SC-AIN93M	VitD- AIN93M
Amido de milho	397,48	397,48	465,69	465,69
Caseína	200,00	200,00	140,00	140,00
Amido dextrinizado	132,00	132,00	155,00	155,00
Sacarose	100,00	100,00	100,00	100,00
Óleo de soja	70,00	70,00	40,00	40,00
Fibras	50,00	50,00	50,00	50,00
L-cistina	3,00	3,00	1,80	1,80
Colina	2,50	2,50	2,50	2,50
Antioxidante	0,014	0,014	0,008	0,008
Mix de minerais	35,00	35,00	35,00	35,00
Carbonato de Cálcio	357,00	357,00	357,00	357,00
Mix de vitaminas	10,00	10,00	10,00	10,00
Vitamina D3 (400.00 UI/g) - (g/Kg Mix)	0,25	0,00	0,25	0,00
Total	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00
Energia (Kcal)	3950,00	3950,00	3803,00	3803,00
Glicídios (%)	64,00	64,00	76,00	76,00
Proteínas (%)	19,00	19,00	14,00	14,00
Lipídios (%)	17,00	17,00	10,00	10,00

Legenda: SC-AIN93G, dieta padrão (do inglês *standard chow*) para os períodos de gestação, lactação e crescimento; VitD-AIN93G, dieta restrita em vitamina D para os períodos de gestação, lactação e crescimento; SC-AIN93M, dieta padrão para manutenção de animais adultos; VitD-AIN93M dieta restrita em vitamina D para manutenção de animais adultos.

Nota: Todos os nutrientes correspondem às recomendações do “*American Institute of Nutrition*” (AIN93G e AIN93M) para roedores.

Fonte: A autora, 2018.

Uma semana antes do acasalamento, as fêmeas ficaram em jejum por um período de 12 horas para avaliação da glicemia. Uma pequena incisão na cauda do animal foi realizada e o sangue obtido por ordenha. A glicose sérica foi mensurada com glicosímetro (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

As fêmeas SC e VitD acasalaram seis semanas após o início das dietas experimentais, com machos reprodutores da mesma idade que receberam dieta SC durante toda a vida. As fêmeas receberam as respectivas dietas durante seis semanas pré-gestacionais, para que a insuficiência ou deficiência da vitamina D fosse alcançada durante a gestação (MAKA et al., 2008). As mães também receberam as dietas experimentais SC e VitD durante a gestação e

toda lactação. A fecundação foi confirmada através do *plug* vaginal e as fêmeas foram acondicionadas em caixas individuais. Após três semanas, as fêmeas grávidas foram colocadas novamente em jejum, para avaliação da glicemia na última semana gestacional. No entanto, nas fêmeas grávidas, o jejum teve duração de quatro horas, para evitar uma possível hipoglicemia (NASCIMENTO et al., 2013). O método utilizado foi o mesmo descrito anteriormente.

No dia do nascimento o sexo dos filhotes foi identificado pelo método da distância ânus-genital. Seguidamente, os filhotes foram pesados separadamente e o tamanho da ninhada foi aleatoriamente ajustado para seis filhotes por lactante, três machos e três fêmeas, a fim de garantir nutrição adequada (LANGLEY-EVANS, GARDNER, JACKSON, 1996).

Ao desmame (21 dias de idade) os filhotes machos foram divididos de acordo com o seguinte esquema: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (filhotes oriundos de mães SC, e foram alimentados com a dieta SC desde o desmame até os quatro meses de idade, n=8) e VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (filhotes provenientes de mães VitD, e foram alimentados com a dieta VitD do desmame até o final do experimento, n=9). Somente um filhote de cada progenitora foi utilizado para a formação dos grupos experimentais, nunca mais de um filhote da mesma ninhada compôs o mesmo grupo. Todos os animais receberam as dietas experimentais *ad libitum* e tiveram livre acesso à água.

3.2 Massa corporal, ingestão e eficiência alimentar

A massa corporal (MC) das mães foi avaliada semanalmente em balança digital de precisão 0,1g (Urano) no período pré-gestacional e durante a gestação. A ingestão alimentar das mães foi monitorada diariamente durante a gestação e lactação, mediante subtração entre a quantidade total de ração ofertada e a quantidade remanescente na caixa. A ingestão energética diária foi obtida multiplicando-se a gramatura de ração ingerida pelo valor energético da dieta em quilojoules (kJ). A eficiência alimentar foi calculada como a razão entre o ganho de MC (g) e a ingestão energética em kJ de cada animal apresentada em porcentagem.

A MC e o comprimento naso-anal (CNA) da prole foram aferidos semanalmente desde o nascimento até os quatro meses de idade. A média da MC dos grupos foi calculada e traçado

o gráfico de evolução. A ingestão alimentar e energética, bem como a eficiência alimentar foram monitoradas diariamente, a partir do desmame até o final do experimento. A ingestão energética e a eficiência alimentar das proles foram calculadas conforme o protocolo descrito anteriormente para as mães.

3.3 Pressão arterial sistólica

Os filhotes foram adaptados por três semanas anteriores a avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) com o objetivo de minimizar o estresse durante a execução do protocolo de aferição da pressão arterial. Dos três aos quatro meses de idade a PAS dos filhotes foi aferida semanalmente (às 18:00 horas). O método utilizado foi não invasivo pela pletismografia da artéria caudal (Insight, São Paulo, SP, Brasil). Foi utilizada a média de três aferições em cada momento.

3.4 Teste Oral de Tolerância à Glicose

O Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) foi realizado nos filhotes na semana anterior à eutanásia, os animais foram mantidos em jejum durante 12 horas. As amostras de sangue para determinação da glicose sérica foram obtidas da veia caudal após uma pequena incisão na ponta da cauda. Posteriormente, foi administrado, por gavagem orogástrica, o soro glicosado hipertônico (50% de glicose em solução salina estéril – 0,9% NaCl) na dosagem de 2g/Kg de MC. A concentração de glicose sérica foi aferida antes da sobrecarga de glicose e nos tempos subsequentes: 15, 30, 60 e 120 minutos, utilizando-se um glicosímetro (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil). Para a avaliação da intolerância à glicose foi calculada a área sob a curva (ASC) considerando o tempo total de zero a 120 minutos. Para tanto, utilizou-se a ferramenta trapezoidal do programa GraphPad Prisma (versão 6.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.5 Eutanásia

Os filhotes machos provenientes das mães dos grupos SC e VitD foram sacrificados nas seguintes idades: nascimento, desmame (21 dias) e quatro meses de idade. Os animais que compuseram o grupo ao nascimento e desmame foram separados de suas mães e tiveram, após a aferição da MC e CNA, a cabeça decapitada. As concentrações de glicose sanguínea foram mensuradas com glicosímetro (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brasil).

Ao término do período de lactação dos filhotes (21 dias), realizou-se a eutanásia das mães. As mães permaneceram em jejum durante 12 horas e seguidamente foram submetidas à câmara de gás dióxido de carbono. Posteriormente, o tórax foi aberto, o coração foi exposto e amostras de sangue foram coletadas diretamente do átrio direito, para determinação da glicemia de jejum. O restante das amostras foi imediatamente centrifugado e armazenado a -80°C para futuras análises séricas.

Aos quatro meses de idade, realizou-se a eutanásia dos filhotes, os quais também permaneceram em jejum por 12 horas e posteriormente foram submetidos à câmara de gás dióxido de carbono. Seguidamente, o mesmo procedimento descrito previamente para as mães foi realizado para os filhotes.

3.6 25-hidroxivitamina D3 [25-(OH)D3], insulina e HOMA-IR

Após a coleta do sangue das mães e dos filhotes, o soro foi separado por centrifugação (12000 rpm por 15 minutos) em temperatura ambiente e estocado a temperatura de -80°C até a realização das análises bioquímicas.

As concentrações de 25-hidroxivitamina D3 [25(OH)D3] e insulina séricas foram realizadas em duplicata e dosadas pelo método de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática, n=8 animais por grupo). Os níveis séricos de 25(OH)D3 foram avaliados com um kit de teste (CEA915Ge *test kit*, *Cloud Clone Corp.*, *Houston*, Texas, EUA). A insulina sérica foi analisada com um kit para dosagem de insulina (Rat/mouse insulin kit, *Millipore- catalog EZRMI-13K*, *St Charles*, *Missouri*, EUA).

O HOMA-IR (*Insulin Resistance Homeostasis Model Assessment*) foi utilizado para avaliar a RI. O HOMA-IR foi calculado da seguinte forma: [glicose sérica de jejum (mmol/L)

x insulina sérica de jejum ($\mu\text{UI/L}$)]/22,5 (MATTHEWS et al., 1985). Todas as amostras foram analisadas em duplicata para as quais o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1,4%.

3.7 Procedimentos histológicos

Foram realizados cortes transversais da porção média do pênis dos filhotes com quatro meses de idade para realização das análises histológicas. As amostras da porção média dos pênis foram lavadas em solução salina (0,9% NaCl) e fixadas por imersão em formaldeído a 4% em tampão fosfato salino (PBS) durante 48 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras da porção média dos pênis foram desidratadas em álcool com concentrações crescentes até alcançarem o álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes histológicos com $5\mu\text{m}$ de espessura, posteriormente corados pela hematoxilina-eosina a fim de verificar a integridade das amostras. Foram realizadas as colorações de tricrômico de Masson e a técnica de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona.

Os cortes corados pelo tricrômico de Masson foram utilizados para a realização das seguintes análises histomorfométricas: área do corte transversal do pênis, área do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea, área da túnica albugínea e área do corpo esponjoso. Além disso, os cortes corados pelo tricrômico de Masson também foram utilizados para a quantificação das porcentagens de tecido conjuntivo e dos espaços sinusoidais nos corpos cavernoso e no corpo esponjoso.

A técnica de coloração de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona foi realizada para evidenciar as fibras do sistema elástico. Posteriormente foi utilizada para determinação da porcentagem dessas fibras nos corpos cavernoso e esponjoso, túnica albugínea do corpo esponjoso e na artéria dorsal. Nos cortes corados pela técnica de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona também foram mensuradas a altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal.

3.7.1 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos em lâminas silanizadas foram desparafinados e hidratados. A recuperação antigênica foi realizada com tampão ácido etilenodiamino tetra-acético, pH 9,0, por 12 horas (*overnight*), a 60°C. Posteriormente as peroxidases endógenas foram inativadas com uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 15 minutos. Na sequência, foram realizadas lavagens dos cortes em PBS e sequencialmente incubados com 10% de soro de cabra a 60°C por 10 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas.

A seguir, os cortes foram simultaneamente incubados com anticorpos primários monoclonais anti-alfa actina de músculo liso (18-0106, diluição 1:100, Invitrogen, *Camarillo*, EUA), anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (18-0110, diluição 1:100, Invitrogen, *Camarillo*, EUA) e anti-tubulina- β 3 (ab78078, diluição 1:100, abcam, *Cambridge*, Reino Unido) a 37°C por 1 hora. Consecutivamente, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpos secundários biotinilados por 20 minutos e a reação foi detectada com o complexo biotina-estreptavidina-peroxidase (Kit Invitrogen, 859643, *Frederick*, EUA). Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS e a imunoreação positiva foi identificada após incubação com 3,3'diaminobenzidina tetraclorido (859643, Invitrogen, *Frederick*, EUA) e os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer. Simultaneamente, foram obtidas as lâminas do controle negativo onde os anticorpos primários foram substituídos por PBS/albumina do soro bovino. As imagens digitais dos pênis imunomarcados foram obtidas usando a câmera *Olympus DP70* (Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio *Olympus BX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

A imunohistoquímica anti-alfa actina de músculo liso foi realizada para identificar as células musculares lisas, para avaliar dados histomorfométricos da artéria dorsal e da veia dorsal profunda. Além disso, também foram avaliadas as porcentagens de vasos no corpo cavernoso, corpo esponjoso e na região dorsal do pênis. A imunohistoquímica anti-tubulina- β 3 foi realizada para estimar a porcentagem de nervos nos corpos cavernoso e esponjoso e na região dorsal do pênis.

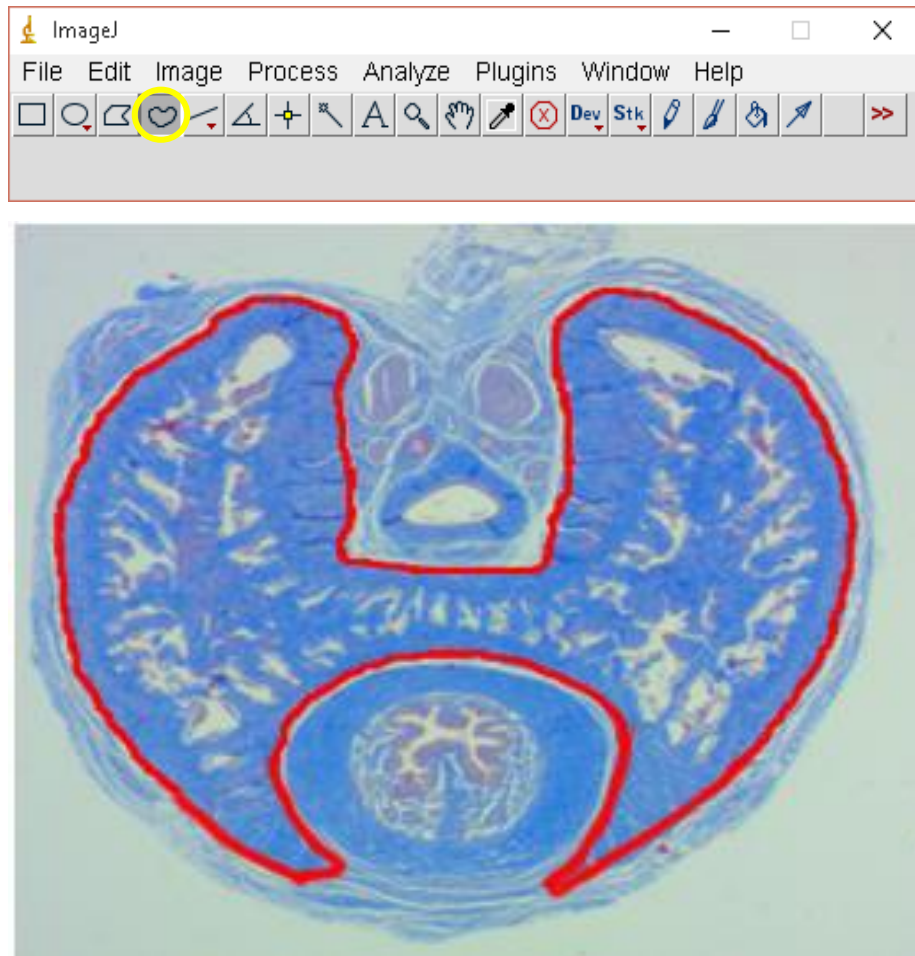
3.8 Histomorfometria

3.8.1 Área do corte transversal do pênis, área do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea, área da túnica albugínea e área do corpo esponjoso

Para as análises histomorfométricas das áreas do pênis dos filhotes aos quatro meses de idade foram utilizadas fotomicrografias das lâminas coradas pelo tricrômico de Masson. Cada um dos cortes transversais do pênis foi fotografado digitalmente com câmera Zeiss AxioCam ERc5s em microscópio óptico Carl Zeiss microscopy GmbH (Carl Zeiss, Gttingen, Alemanha) com aumento de 18,9x. Nas imagens obtidas foi possível observar todo o corte transversal do pênis. Posteriormente, diferentes parâmetros histomorfométricos foram aferidos: área do corte transversal, área do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea, área da túnica albugínea e área do corpo esponjoso. Esses parâmetros foram mensurados em mm². A área da túnica albugínea foi estimada pela diferença entre as áreas do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea.

As fotomicrografias para a avaliação das áreas do pênis foram obtidas de sete lâminas histológicas com três cortes de cada animal. Foram avaliados um total de 20 campos por animal. As mensurações foram realizadas com auxílio do programa *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java*, NIH, Bethesda, Maryland, EUA). A primeira etapa na utilização do programa foi a realização da calibração. Após esse procedimento, foram executadas as análises. Para a aferição das áreas do corte transversal, do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea e do corpo esponjoso foi selecionada a ferramenta “*Freehand selections*”, que possibilita o contorno das áreas, e o cálculo da área da região delimitada (Figura 6).

Figura 6 - Aplicabilidade da ferramenta “*Freehand selections*”



Legenda: Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “*Freehand selections*” (destacada pelo círculo amarelo). A seleção dessa ferramenta permitiu delimitar e mensurar a área do corpo cavernoso com túnica albugínea destacada em vermelho na imagem.

Nota: Fotomicrografia do corte transversal da porção média do pênis corado com tricrômico de Masson, aumento de 18,9x. A ferramenta “*Freehand selections*” foi utilizada para mensurar as áreas do corte transversal do pênis, do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea e a área da túnica albugínea.

Fonte: A autora, 2018.

3.8.2 Quantificação das porcentagens de tecido conjuntivo, de músculo liso, dos espaços sinusoidais e das fibras elásticas no corpo cavernoso

As fotomicrografias, de campos aleatórios, foram capturadas por uma câmara digital *Olympus DP71* (Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio óptico *Olympus BX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

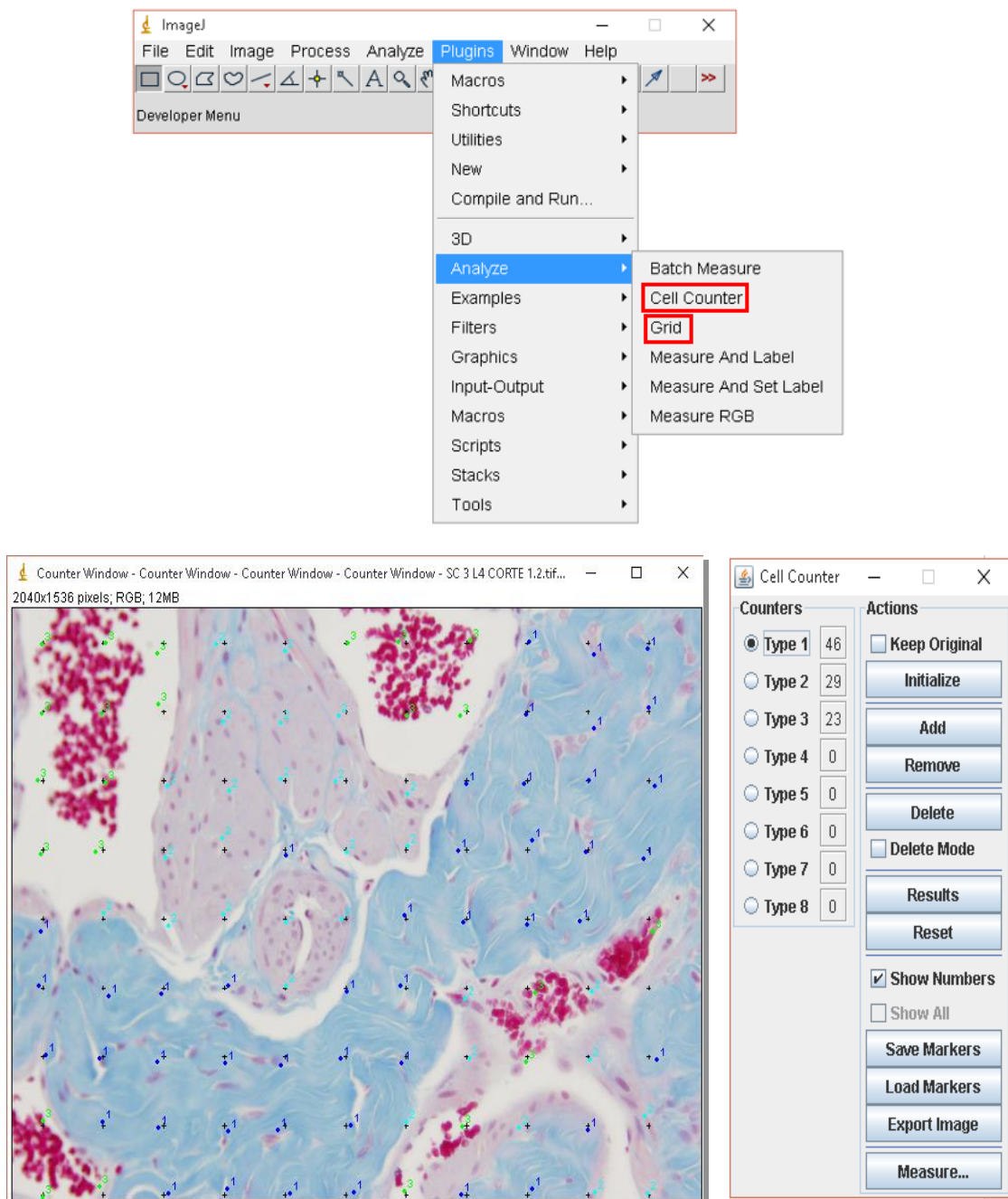
As porcentagens de tecido conjuntivo e dos espaços sinusoidais foram quantificadas nas fotomicrografias dos cortes corados pelo tricrômico de Masson. As fotomicrografias foram capturadas com aumento de 400x.

A imunohistoquímica anti-alfa actina de músculo liso foi realizada para quantificar as porcentagens de músculo liso no corpo cavernoso. As fotomicrografias foram capturadas com aumentos de 400x.

Os cortes histológicos corados pela técnica de resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação por oxona foram utilizados para a quantificação das fibras elásticas e as fotomicrografias foram capturadas com aumento de 1000x.

As porcentagens de tecido conjuntivo, de músculo liso, dos espaços sinusoidais e das fibras elásticas foram estimadas pelo método da contagem de pontos que foi realizado com o programa *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java*, NIH, Bethesda, Maryland, EUA). Uma grade de 99 pontos foi sobreposta às imagens e o número de pontos que tocaram a estrutura analisada foi dividido pelo número de pontos totais do sistema teste-99 pontos [Pp/Pt (%)]. Foi utilizada a ferramenta “*Cell Counter*” para a contagem de pontos (Figura 7). Os valores foram expressos em porcentagem. Para essas análises histomorfométricas foram obtidas cinco lâminas histológicas de cada animal. Cinco campos foram avaliados em cada lâmina, perfazendo um total de 25 campos avaliados por animal.

Figura 7 - Aplicabilidade das ferramentas “Grid” e “Cell Counter”



Nota: Imagem ilustrando a aplicabilidade das ferramentas “Grid” e “Cell Counter” no método da contagem de pontos (destacadas em vermelho). Na fotomicrografia do corpo cavernoso, nota-se uma grade de 99 pontos e a caixa do “Cell Counter”. Cada “type” representa as cruzes que estão sobrepondo as diferentes estruturas: type 1 = cruzes que estão sobre o tecido conjuntivo; type 2 = cruzes que estão sobre o músculo liso e type 3 = cruzes que estão sobre o espaço sinusoidal. O número de cruzes que sobrepõe cada estrutura é contado (pontos parciais) e multiplicado por 100 e dividido pelo número total de cruzes do sistema teste (pontos totais-99), e dessa maneira, obtém-se a porcentagem de cada estrutura. O método da contagem de pontos foi utilizado para quantificar as porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso, espaços sinusoidais, fibras elásticas, vasos e nervos.

Fonte: A autora, 2018.

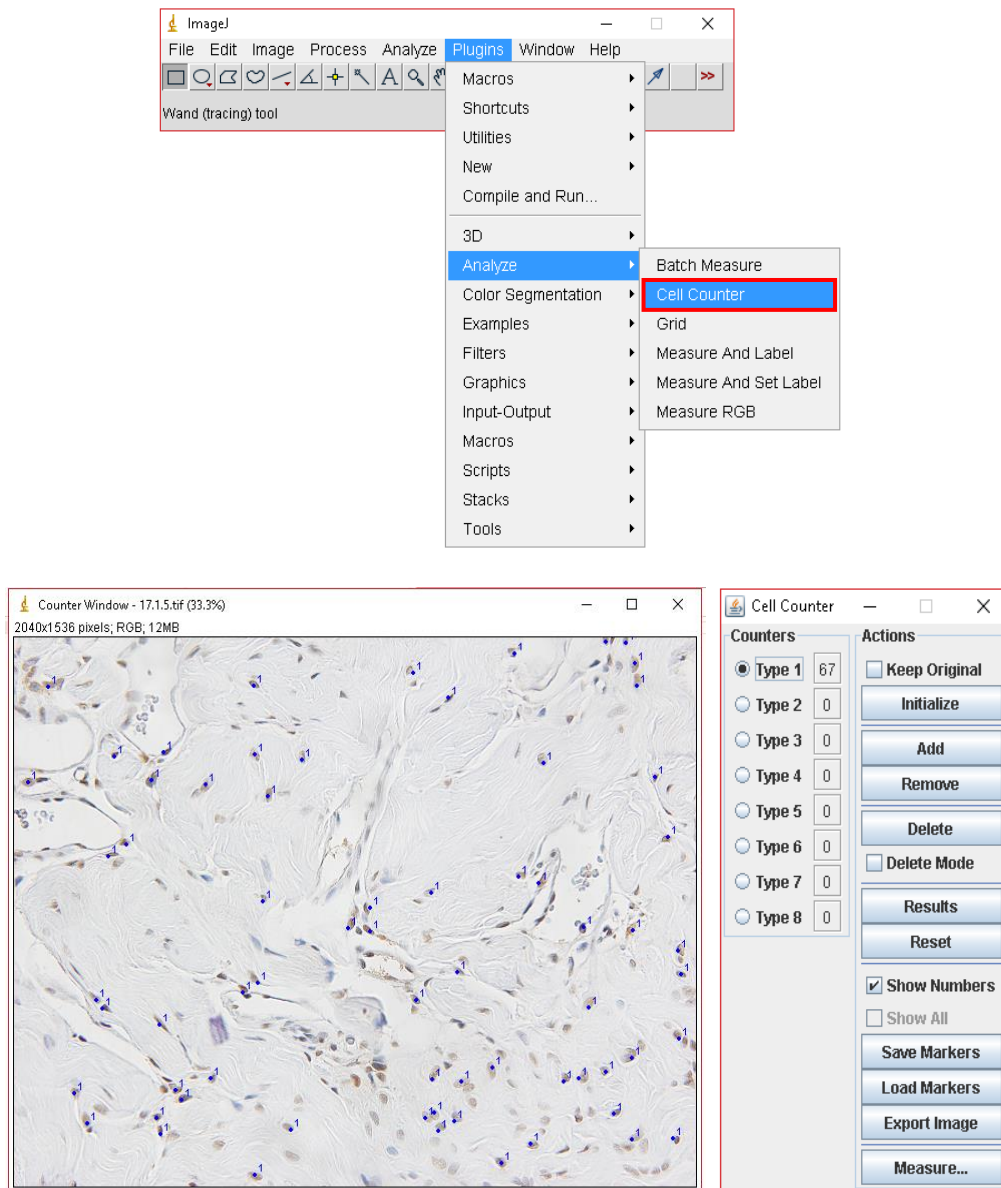
3.8.3 Proliferação celular

As fotomicrografias, de campos aleatórios, foram capturadas por uma câmara digital *Olympus DP71* (Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio óptico *Olympus BX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

Os núcleos imunomarcados com anticorpo anti-PCNA foram quantificados em fotomicrografias capturadas com aumento de 400x. A proliferação celular no corpo cavernoso foi quantificada pelo número de células por mm². A análise foi realizada com auxílio do programa *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java*, NIH, Bethesda, Maryland, EUA).

As etapas para calibração do programa foram as mesmas realizadas anteriormente, posteriormente as áreas das imagens foram calculadas em mm². Após o conhecimento das áreas das imagens, os núcleos imunomarcados foram quantificados com o recurso “*Cell Counter*” do programa *ImageJ*. A proliferação celular no corpo cavernoso foi quantificada pelo número de células em proliferação por mm². Para essa análise histomorfométrica foram obtidas cinco lâminas histológicas de cada animal. Cinco campos foram avaliados em cada lâmina, perfazendo um total de 25 campos avaliados por animal (Figura 8).

Figura 8 - Quantificação da proliferação celular no corpo cavernoso



Legenda: Imagem mostrando a quantificação dos núcleos imunomarcados com anticorpo anti-PCNA com o auxílio do recurso “Cell Counter” do programa *ImageJ*. A proliferação celular no CC foi quantificada pelo número de células em proliferação por mm²; CC, corpo cavernoso.

Nota: Imagem do CC imunomarcado com imunohistoquímica anti-PCNA, 400x.

Fonte: A autora, 2018.

3.8.4 Quantificação das porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso e das fibras elásticas no corpo esponjoso

As fotomicrografias, de campos aleatórios, foram capturadas por uma câmara digital *Olympus DP71* (Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio óptico *Olympus BX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

A porcentagem de tecido conjuntivo foi quantificada nas fotomicrografias dos cortes histológicos corados pelo tricrômico de Masson. O material imunomarcado para a alfa-actina de músculo liso foi utilizado para quantificar a porcentagem de músculo liso no corpo esponjoso.

Os cortes histológicos corados pela técnica de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona foram utilizados para a quantificação das fibras elásticas no corpo esponjoso e na túnica albugínea do corpo esponjoso. As fotomicrografias foram capturadas com aumento de 1000x para a realização das quantificações no corpo esponjoso.

As porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso e das fibras elásticas foram estimadas pelo método da contagem de pontos, descrito anteriormente, e que foi realizado com o programa *ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, EUA)*. Os valores foram expressos em porcentagem. Para essas análises histomorfométricas foram obtidas cinco lâminas histológicas de cada animal. Cinco campos foram avaliados em cada lâmina, perfazendo um total de 25 campos avaliados por animal.

3.8.5 Avaliações histomorfométricas da artéria dorsal

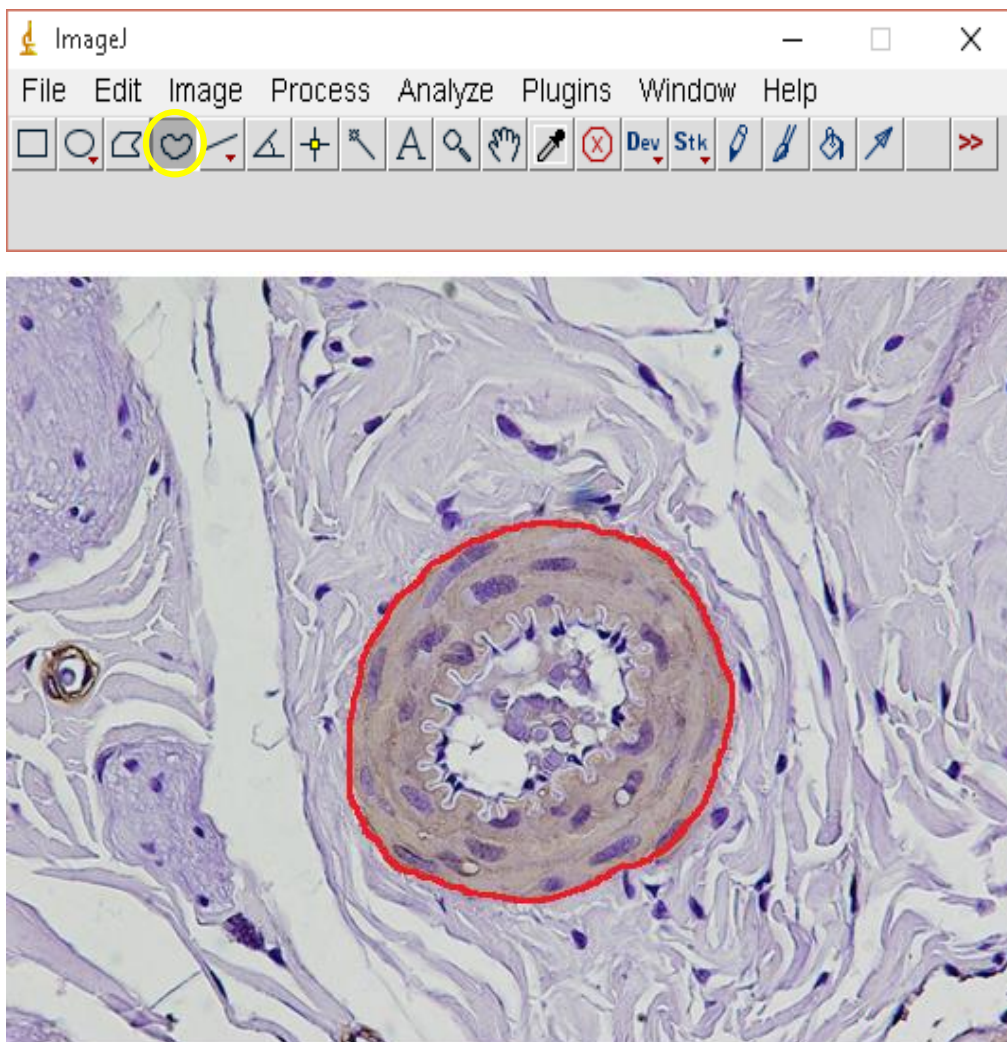
As imagens digitais dos cortes imunomarcados foram obtidas usando a câmara *Olympus DP70* (Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio *Olympus BX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

A imunohistoquímica anti-alfa actina de músculo liso foi realizada para identificar o músculo liso e para mensurar as áreas da artéria dorsal, da túnica média e do lúmen da artéria dorsal. A área da túnica média foi estimada pela diferença entre as áreas da artéria dorsal e do lúmen. A razão entre as áreas da túnica média e do lúmen da artéria dorsal foi calculada. A densidade nuclear na túnica média da artéria dorsal também foi quantificada.

As medidas foram aferidas com auxílio do programa *ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, EUA)*. Para a aferição das áreas da artéria dorsal

e do lúmen da artéria dorsal foi selecionada a ferramenta “*Freehand selections*”, que possibilita o contorno das áreas, e conseqüentemente o cálculo da área da região delimitada (Figura 9). A quantificação da densidade nuclear na túnica média da artéria dorsal foi realizada com o *plugin* “*Cell Counter*” do programa *ImageJ* (Figura 10). Os parâmetros foram avaliados em fotomicrografias capturadas com aumento de 600x obtidas a partir de 5 lâminas histológicas, 1 corte por lâmina, 2 campos em cada corte, perfazendo um total de 10 campos avaliados por animal.

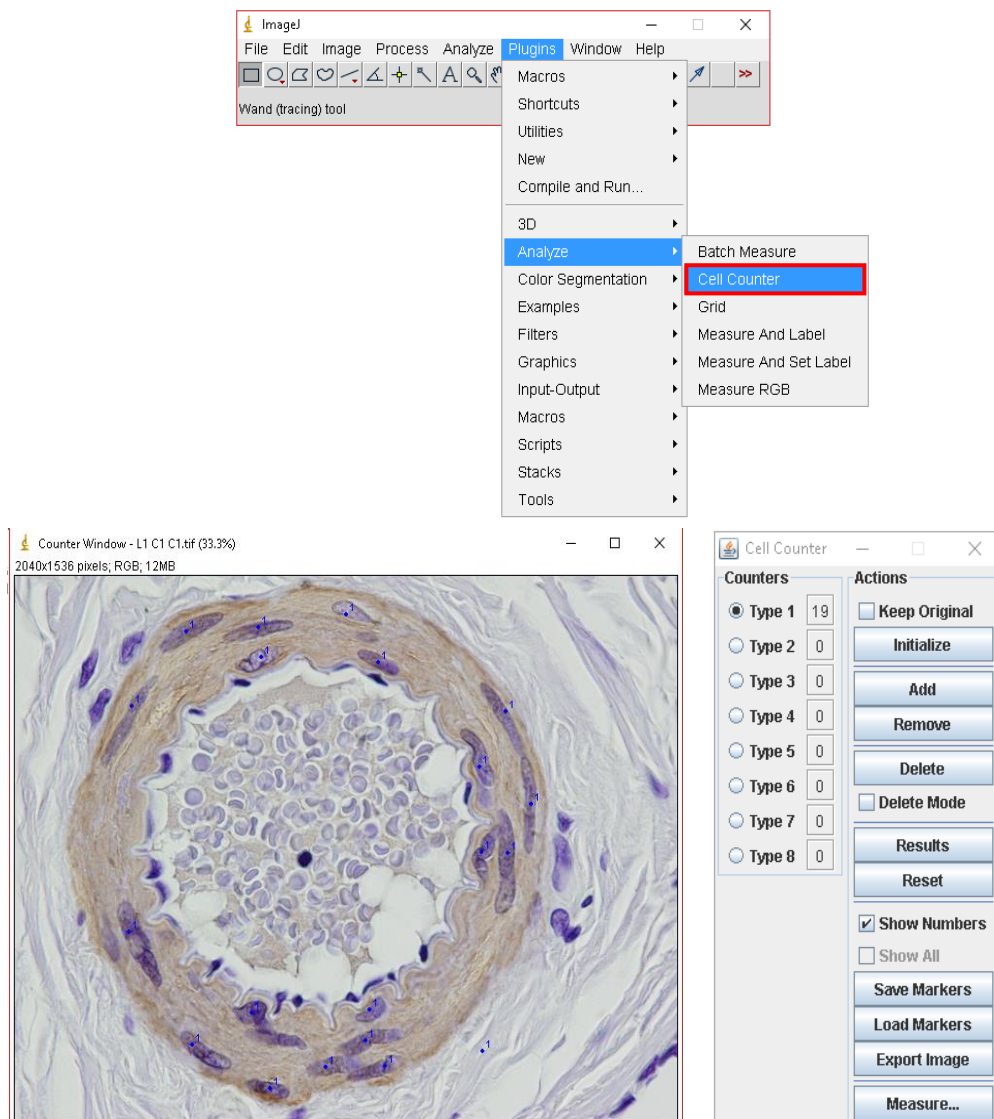
Figura 9 - Uso da ferramenta “*Freehand selections*” para medir a área da artéria dorsal



Legenda: Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “*Freehand selections*” (destacada pelo círculo amarelo). A seleção dessa ferramenta permitiu delimitar e medir a área da AD destacada em vermelho na imagem. AD, artéria dorsal. Nota: Fotomicrografia da AD do pênis imunomarcada com anticorpo anti-alfa actina de músculo liso, 600x. A ferramenta “*Freehand selections*” foi utilizada para medir as áreas da AD e do lúmen da AD.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 10 - Quantificação da densidade nuclear na túnica média da artéria dorsal



Legenda: Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “*Cell Counter*” (destacada em vermelho).

Nota: Fotomicrografia da AD imunomarcada com anticorpo anti-alfa actina de músculo liso, 600x. A ferramenta “*Cell Counter*” foi utilizada para quantificar os núcleos na túnica média da AD. AD, artéria dorsal.

Fonte: A autora, 2018.

3.8.6 Quantificação da altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal

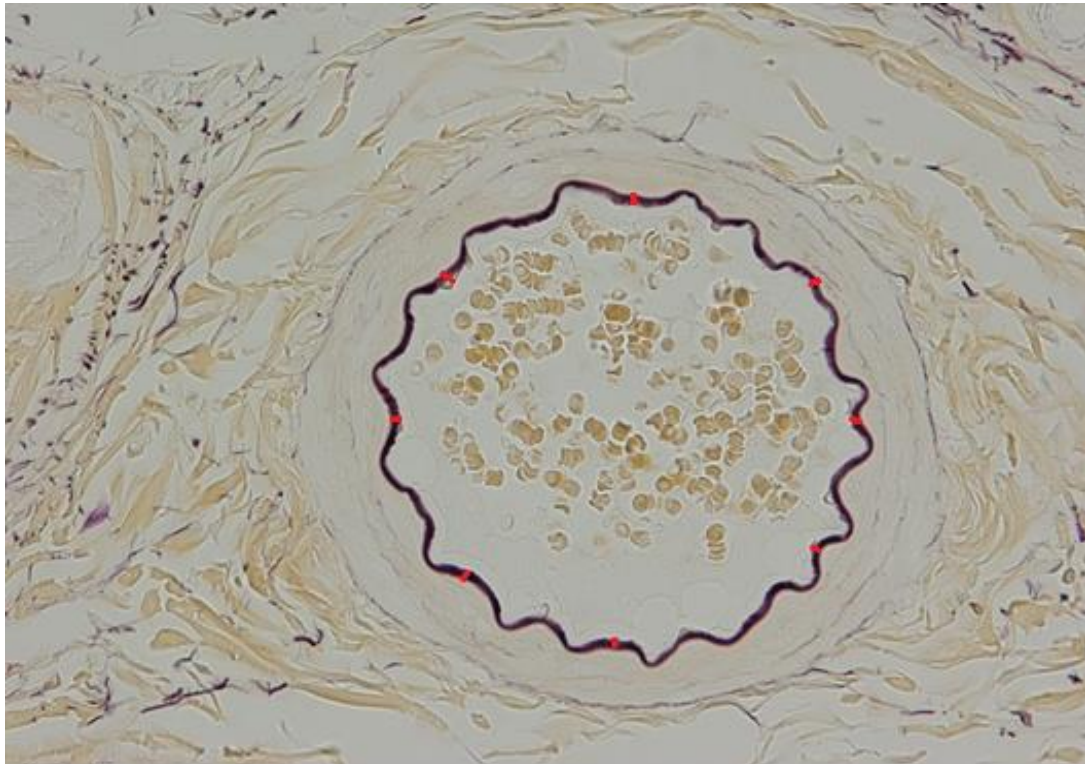
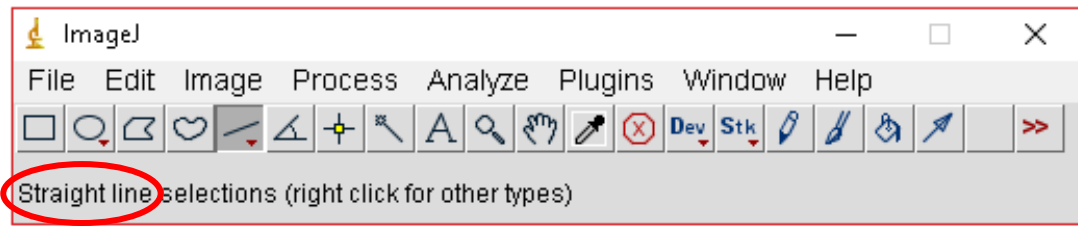
As Imagens digitais dos cortes histológicos foram obtidas usando a câmera *Olympus DP70* (Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio *Olympus BX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

Os cortes corados pela técnica de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona foram utilizados para medir a altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal. A altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal foi aferida com auxílio do programa *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java*, NIH, Bethesda, Maryland, EUA) com o uso da ferramenta “*Straight line*” (Figura 11).

Em cada fotomicrografia foram aferidas oito medidas distribuídas pela área da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal. O resultado foi dado pela média das medidas, determinando-se a altura da lâmina limitante elástica interna.

As fotomicrografias foram capturadas com aumento de 600x. Foram obtidas 5 lâminas histológicas de cada animal. Um campo foi avaliado em cada lâmina, perfazendo um total de cinco campos avaliados por animal.

Figura 11 - Avaliação da altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal



Nota: Imagem ilustrando a aplicabilidade da ferramenta “*Straight line*” (destacada em vermelho). Os traços em vermelho na imagem representam as medidas que foram aferidas para a obtenção da média para determinação da altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal (AD). Fotomicrografia da AD do pênis corada pela técnica de fucsina-resorcina de Weigert, 600x.

Fonte: A autora, 2018.

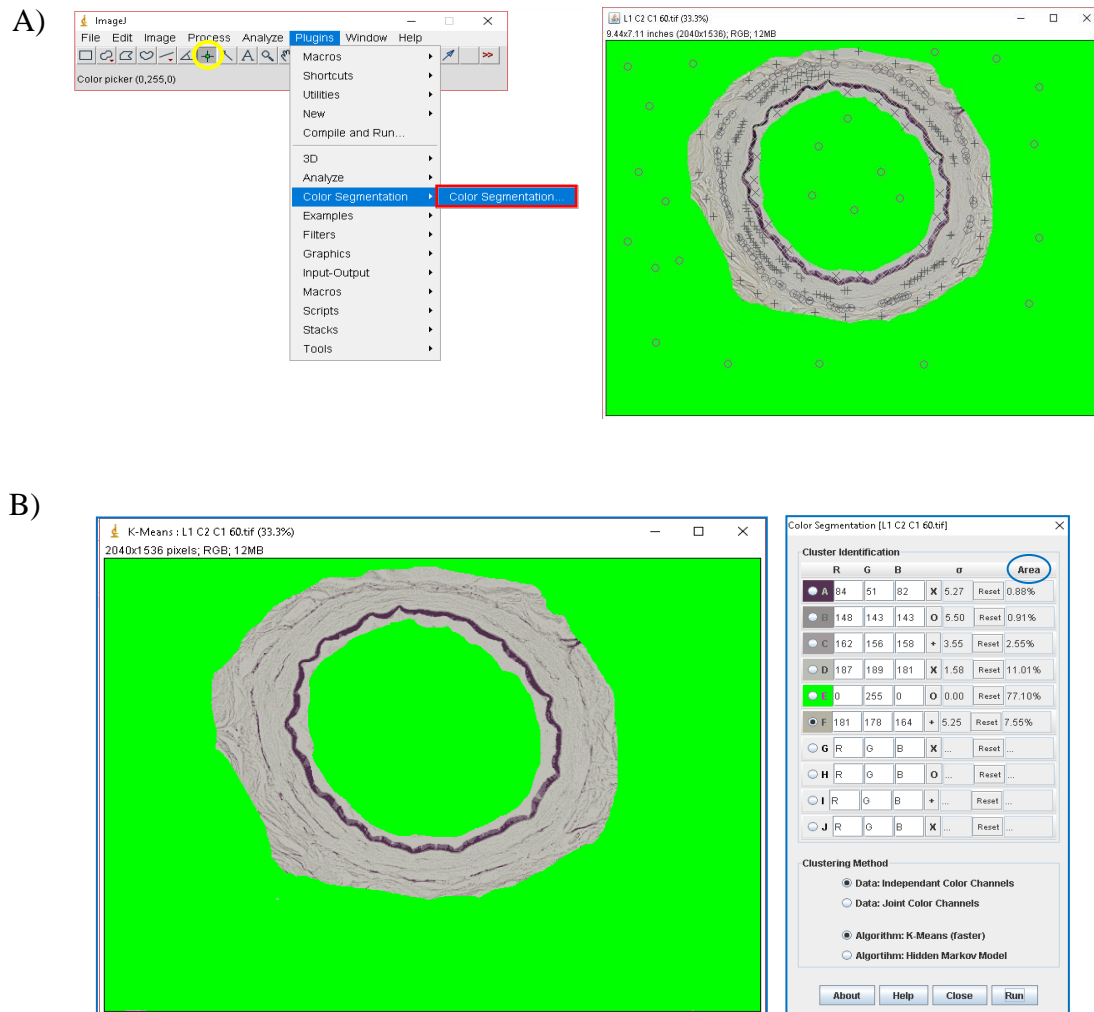
3.8.7 Quantificação da porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal

Os cortes corados pela técnica de resorcina-fucsina de Weigert também foram utilizados para realização da quantificação da porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal.

A porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal foi quantificada com a técnica baseada em segmentação de cores. O programa *Image J (Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, EUA)* carregado com seu próprio *plugin “Color Segmentation”* foi utilizado para quantificar a porcentagem de fibras elásticas. As áreas foram determinadas de acordo com a gama de cores selecionadas e expressas em porcentagem.

As fotomicrografias foram capturadas com aumento de 600x. Foram obtidas 5 lâminas histológicas de cada animal. Um campo foi avaliado em cada lâmina, perfazendo um total de cinco campos avaliados por animal. Foram feitas três aferições para cada campo, e o resultado foi dado pela média das porcentagens obtidas para cada gama de cor (Figura 12).

Figura 12 – Quantificação da porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal



Legenda: A) Figura ilustrando a aplicabilidade do *plugin* “Color Segmantation” (destacado em vermelho) para quantificação da porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal (AD). Utilizando-se a ferramenta “*pointcross*” (destacada em amarelo) foi realizada a seleção por gama de cores RGB, com controle do desvio padrão. B) A seleção de cores foi realizada, a porcentagem referente a cada cor foi mensurada e, conseqüentemente, a porcentagem de fibras elásticas foi aferida. Para o cálculo da porcentagem de fibras elásticas na AD, somente a porcentagem de área de cor conferida pela coloração com a técnica de fucsina-resorcina de Weigert, do “*Cluster*” de identificação do *plugin* “Color Segmantation”, foi utilizada.

Nota: Fotomicrografia da AD do pênis corada pela técnica de fucsina-resorcina de Weigert, 600x.

Fonte: A autora, 2018.

3.8.8 Área da veia dorsal profunda

As Imagens digitais dos cortes imunomarcados foram obtidas usando a câmera *Olympus DP70* (Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio *OlympusBX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

A imunohistoquímica anti-alfa actina de músculo liso foi realizada para identificar o músculo liso e as fotomicrografias foram utilizadas para medir a área da veia dorsal profunda. Esse parâmetro histomorfométrico foi aferido com o programa *ImageJ (Image processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, EUA)*. Para medir a área da veia dorsal profunda foi selecionada a ferramenta “*Freehand selections*”, que possibilita o contorno das áreas, e consequentemente o cálculo da área da região delimitada, conforme metodologia mostrada anteriormente.

A quantificação foi realizada em fotomicrografias capturadas com aumento de 100x obtidas a partir de 5 lâminas histológicas, 1 corte por lâmina, 1 campo em cada corte, perfazendo um total de 5 campos avaliados por animal.

3.8.9 Porcentagem de vasos nos corpos cavernoso, esponjoso e na região dorsal

As Imagens digitais dos cortes imunomarcados foram obtidas usando a câmera *Olympus DP70* (Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio *OlympusBX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

A imunohistoquímica anti-alfa actina de músculo liso foi utilizada para localizar e identificar os vasos. A porcentagem de vasos foi quantificada no corpo cavernoso, no corpo esponjoso e na região dorsal, as fotomicrografias foram capturadas com aumentos de 400x, 1000x e 600x, respectivamente.

A quantificação foi realizada com o método da contagem de pontos, descrito anteriormente, que foi realizado com o programa *ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, EUA)*. Os valores foram expressos em porcentagem. Para essas análises histomorfométricas foram obtidas cinco lâminas histológicas de cada animal. Cinco campos foram avaliados em cada lâmina, perfazendo um total de 25 campos avaliados por animal.

3.8.10 Porcentagem de nervos nos corpos cavernoso, esponjoso e na região dorsal

As Imagens digitais dos cortes imunomarcados foram obtidas usando a câmera *Olympus DP70* (Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio *OlympusBX51* (Tóquio, Japão) com resolução de 2040 x 1536 pixels e armazenadas no formato TIFF.

A imunohistoquímica anti-tubulina $\beta 3$ foi utilizada realização da quantificação dos nervos. A porcentagem de nervos foi quantificada no corpo cavernoso, no corpo esponjoso e na região dorsal. As fotomicrografias foram capturadas com aumentos de 600x.

A quantificação foi realizada com o método da contagem de pontos, descrito anteriormente, que foi realizado com o programa *ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, EUA)*. Os valores foram expressos em porcentagem. Para essas análises histomorfométricas foram obtidas cinco lâminas histológicas de cada animal. Cinco campos foram avaliados em cada lâmina, perfazendo um total de 25 campos avaliados por animal.

3.9 **Análise estatística**

Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças entre os grupos foram testadas pelo teste-t de *Student* não pareado. Em todos os casos o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$, realizado pelo programa *GraphPad Prisma (versão 6.02 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA)*.

4 RESULTADOS

4.1 Dados das mães e nascimento dos filhotes

As mães dos grupos SC e VitD iniciaram o experimento com MC semelhantes. As mães alimentadas com a dieta restrita em vitamina D durante a gestação e lactação toleraram bem a dieta e não apresentaram complicações. Além disso, o consumo alimentar em gramatura, ingestão energética e eficiência alimentar das mães foram similares durante os períodos de gestação e lactação (Tabela 3).

Não houve diferença sobre o ganho ponderal total durante a gestação, na glicemia e nos níveis séricos de insulina entre as mães de ambos os grupos experimentais (Tabela 3). Entretanto, os níveis séricos de 25(OH)D3 foram significativamente menores nas mães VitD ($28,50 \pm 2,20$ ng/ml) quando comparadas com as mães SC ($67,64 \pm 12,00$ ng/ml; $p < 0,0001$). Não houve diferença no número de filhotes nascidos vivos ou mortos e na distribuição da ninhada em relação a proporção de machos e fêmeas (Tabela 4).

Tabela 3 - Dados biométricos e bioquímicos das mães

Dados	SC	VitD	<i>p</i>
Ingestão alimentar (g/dia/animal)	22,40 ± 2,17	22,02 ± 2,03	ns
Ingestão energética (KJ/dia/animal)	376,50 ± 48,73	364,00 ± 33,79	ns
Eficiência alimentar (g/KJ)	0,71 ± 0,12	0,70 ± 0,33	ns
Ganho ponderal total (g)	55,10 ± 12,33	52,50 ± 20,17	ns
Ingestão alimentar na lactação (g/dia/animal)	41,62 ± 8,59	40,85 ± 5,87	ns
Ingestão energética na lactação (KJ/dia/animal)	687,90 ± 142,10	675,10 ± 97,03	ns
Glicemia na última semana gestacional (mmol/L)	5,30 ± 0,56	5,10 ± 0,58	ns
Glicemia no desmame (mmol/L)	6,52 ± 1,61	6,97 ± 2,31	ns
Insulina (ng/ml)	0,55 ± 0,55	0,84 ± 0,39	ns
25(OH)D3 (ng/ml)	67, 64 ± 12,00	28,50 ± 2,20	< 0,0001

Legenda: SC, grupo dieta padrão; VitD, grupo dieta restrita em vitamina D; ns, não significativo. Os dados foram expressos como média ± DP. As diferenças entre os grupos foram testadas com o teste-t não pareado. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 4 - Dados do nascimento e desmame dos filhotes

Parâmetros nascimento	SC	VitD	<i>p</i>
Filhotes por ninhada (número)	10,22 ± 3,80	11,00 ± 3,08	ns
Massa da ninhada (g)	63,11 ± 21,17	73,58 ± 21,91	ns
MC filhote (g)	6,59 ± 0,82	6,80 ± 0,65	ns
CNA (cm)	5,26 ± 0,71	5,38 ± 1,04	ns
Glicemia (mmol/L)	4,37 ± 0,38	4,75 ± 0,56	ns
Natimortos (número)	1	3	ns
Relação macho:fêmea	1,00	1,00	ns
Parâmetros do desmame			
MC filhote (g)	58,71 ± 8,65	62,30 ± 9,94	ns
CNA (cm)	14,20 ± 0,42	14,00 ± 0,70	ns
Glicemia (mmol/L)	6,88 ± 0,84	7,41 ± 1,49	ns

Legenda: SC, grupo dieta padrão; VitD, grupo dieta restrita em vitamina D; MC, massa corporal; CNA, comprimento naso-anal; ns, não significativo. Os dados foram expressos como média ± DP. As diferenças entre os grupos foram testadas com o teste-t não pareado. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

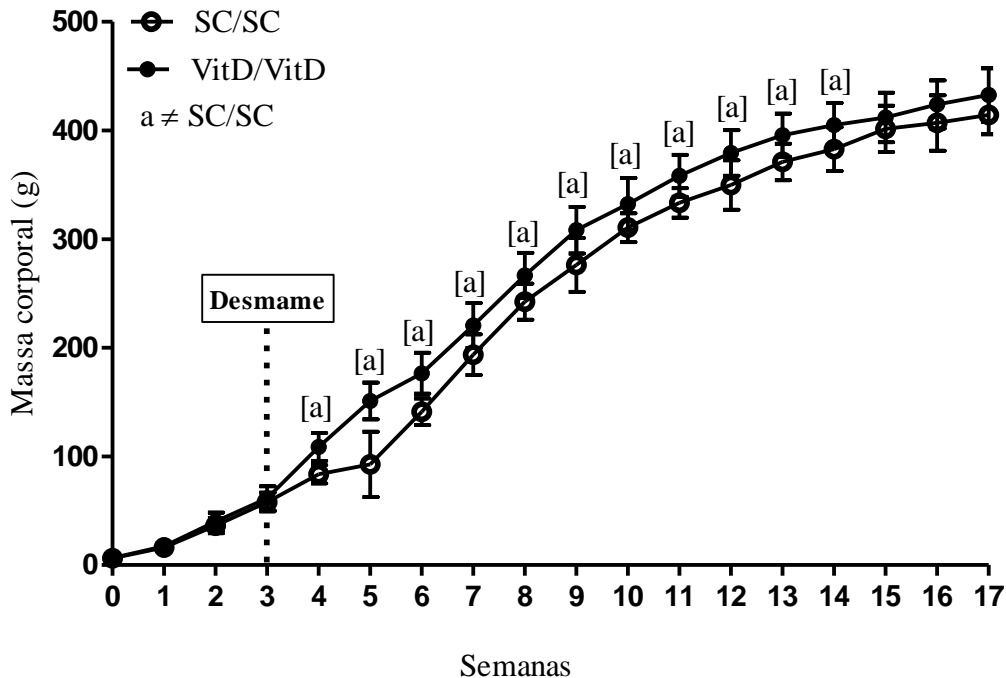
Fonte: A autora, 2018.

4.2 Dados dos filhotes

4.2.1 Massa corporal, ingestão e eficiência alimentar

Os filhotes provenientes de mães alimentadas com a dieta VitD ao nascimento e desmame apresentaram MC, CNA e glicemia semelhantes aos filhotes das mães SC (Tabela 4). No entanto, a partir da quarta semana de idade os animais do grupo VitD/VitD ($108,60 \pm 12,83$ g) apresentaram-se mais pesados quando comparados com os animais do grupo SC/SC ($83,60 \pm 8,40$ g, $p < 0,0001$). Esse comportamento foi mantido até o final da décima quarta semana. No final do período experimental (décima sétima semana de idade) as MC finais foram semelhantes nos animais alimentados com SC e VitD (Figura 13).

Figura 13 - Evolução da massa corporal no período experimental



Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D. Os dados foram expressos como média \pm DP, SC/SC (n=8) e no grupo VitD/VitD (n=9). As diferenças entre os grupos foram testadas pelo teste-t não pareado. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na mesma semana em comparação com [a] grupo SC/SC.

Fonte: A autora, 2018.

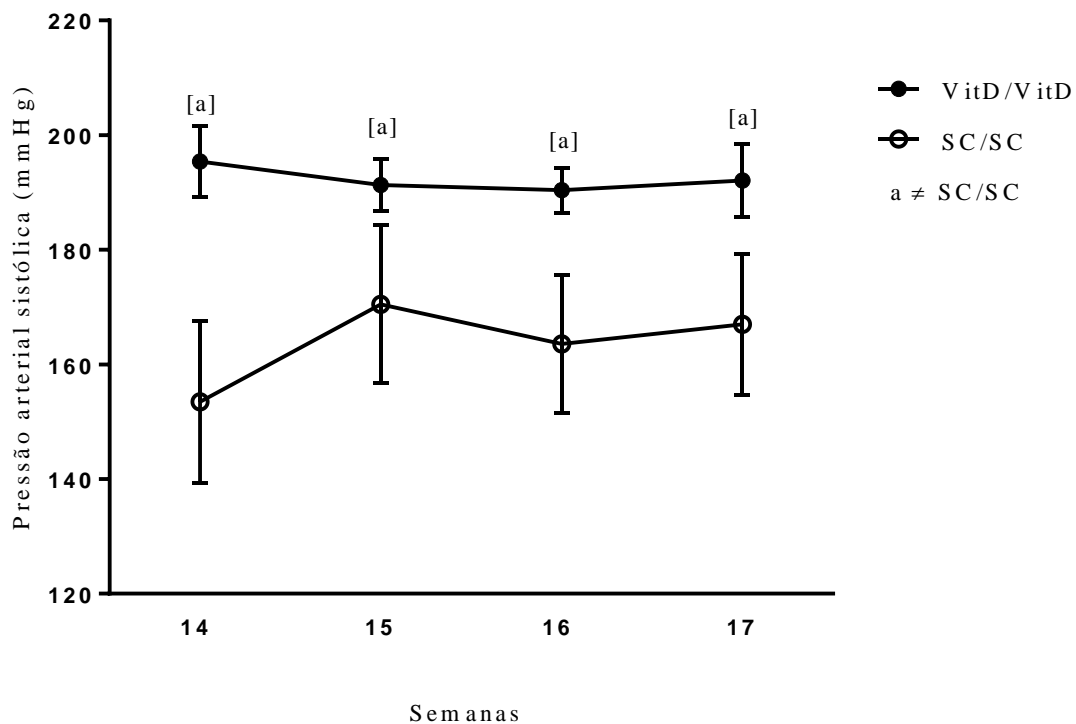
Em relação ao CNA, nenhuma diferença foi observada entre os grupos durante todo o experimento. Não houve diferença na ingestão alimentar em gramatura, ingestão e eficiência energéticas nos animais alimentados com dieta restrita em vitamina D, quando comparados aos animais que receberam a dieta padrão (Tabela 5).

4.2.2 Pressão arterial sistólica

No que concerne aos valores da PAS, a dieta restrita em vitamina D durante os períodos perinatal e pós-natal favoreceu a elevação dos níveis pressóricos. O grupo VitD/VitD apresentou aumento na PAS desde a primeira semana de aferição dos níveis pressóricos, quando comparado com o grupo SC/SC (+ 13%, $p=0,0001$). Esse comportamento se manteve

até atingir uma elevação de 15% da PAS nos animais do grupo VitD/VitD em relação aos animais do grupo SC/SC ($p=0,0022$), observada no final do período experimental (Figura 14 e Tabela 5).

Figura 14- Evolução da pressão arterial sistólica



Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D. Os valores são apresentados como média \pm DP, SC/SC (n=8) e VitD/VitD (n=9). Houve diferença significativa ($p<0,05$) em comparação com o grupo SC/SC [a] conforme determinado pelo teste-t não pareado.

Nota: As semanas (14 a 17) correspondem ao período de aferição da pressão arterial sistólica no experimento.

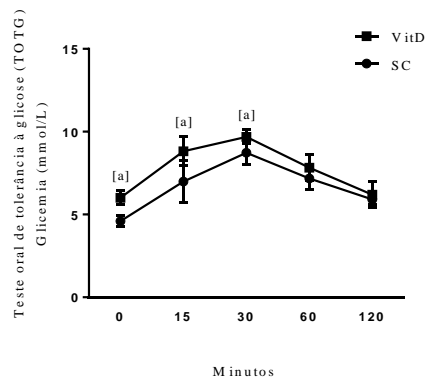
Fonte: A autora, 2018.

4.2.3 Teste Oral de Tolerância à Glicose

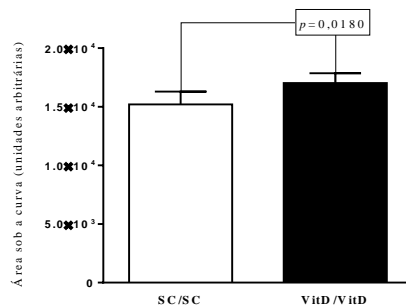
Os animais que foram alimentados com a dieta VitD apresentaram alterações no metabolismo de carboidratos. Em relação ao TOTG, houve aumento na área sob a curva (ASC) no grupo VitD/VitD, indicando uma demora na normalização nos níveis de glicose sérica após a sobrecarga, o que sugere intolerância à glicose em comparação com o grupo SC/SC (+11,62%, $p=0,0248$) (Figura 15).

Figura 15- Teste oral de tolerância à glicose e área sob a curva do TOTG

A)



B)



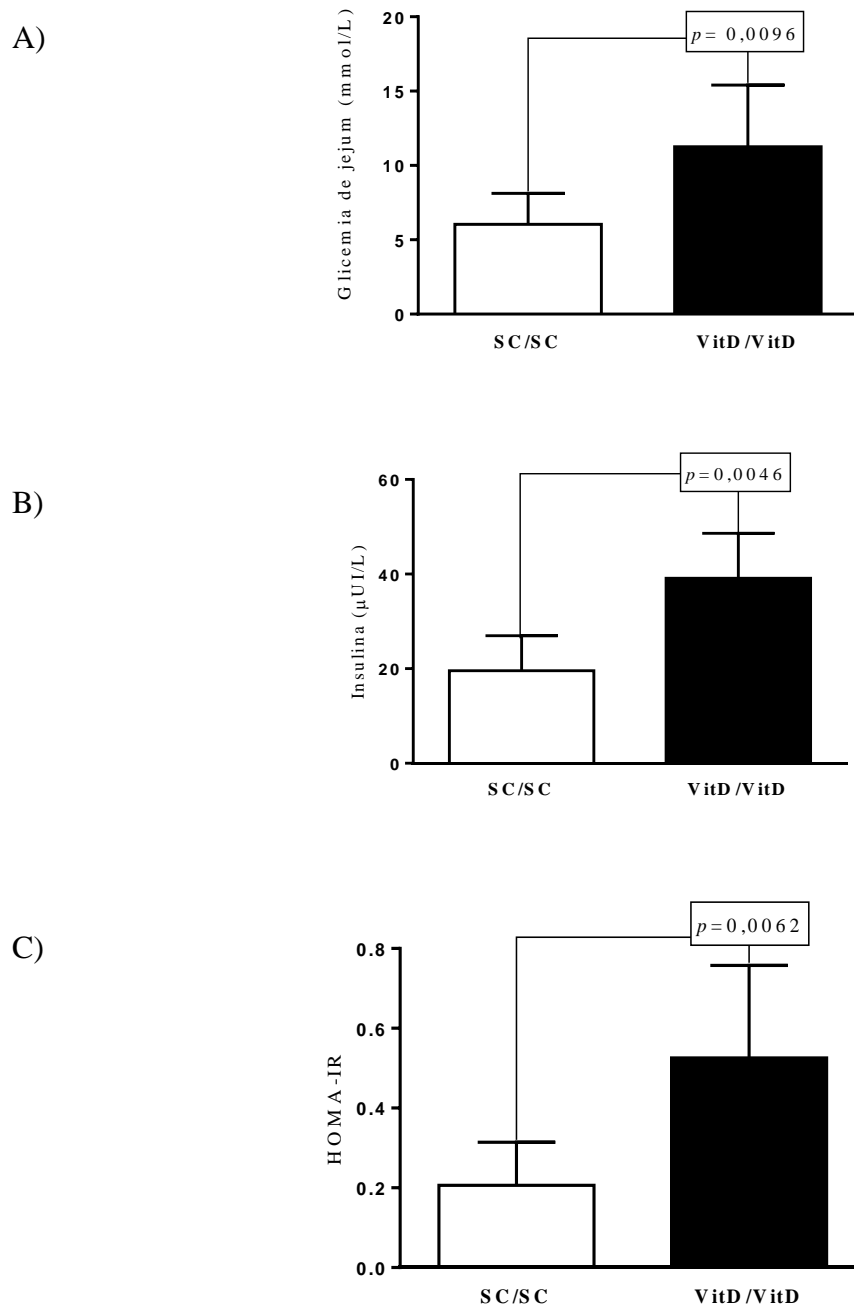
Legenda: A) Curva da glicose sérica durante o TOTG ao longo de um período de 120 minutos; B) gráfico de barras representativo da área sob a curva do TOTG. SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP, SC/SC (n=6) e VitD/VitD (n=6). A diferença significativa entre os grupos está indicada nas figuras, [a] \neq SC/SC, conforme determinado pelo teste-t não pareado, $p<0,05$.

Fonte: A autora, 2018.

4.2.4 Glicemia de jejum, insulina e HOMA-IR

No nascimento e desmame os animais de ambos os grupos experimentais (SC e VitD) apresentaram glicemia semelhantes (Tabela 4). Contudo, aos quatro meses de idade, o grupo VitD/VitD (+86,42%, $p=0,0096$) apresentou aumento da glicemia de jejum quando comparado com o grupo SC/SC. Adicionalmente, o grupo VitD/VitD apresentou hiperinsulinemia (+67,10%, $p=0,0040$) e essa alteração na homeostase da glicose resultou no aumento do HOMA-IR no grupo VitD/VitD (+73,91, $p=0,0062$) em comparação com o grupo SC/SC (Figura 16 e Tabela 5).

Figura 16 - Glicemia de jejum, insulina e HOMA-IR



Legenda: A) Glicemia de jejum, B) concentrações de insulina sérica e C) índice HOMA-IR. SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram apresentados como média \pm DP, SC/SC (n=8), VitD/VitD (n=8). As diferenças significativas estão indicadas nas figuras, $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 5 - Dados dos filhotes aos quatro meses de idade

Dados	SC/SC	VitD/VitD	<i>p</i>
Ingestão alimentar (g/animal/dia)	19,09 ± 3,98	18,91 ± 4,18	ns
Ingestão energética (KJ/animal/dia)	309,8 ± 62,46	306,3 ± 64,69	ns
Eficiência alimentar (g/KJ)x100	1,17 ± 0,12	1,15 ± 0,10	ns
PAS (mmHg)	164,00 ± 11,11	189,10 ± 8,08	< 0,0001
Glicose (mmol/L)	6,04 ± 2,08	11,26 ± 4,15	0,0096
ASC (unidades arbitrárias)	836,5 ± 61,15	933,7 ± 49,79	0,0248
Insulina (µUI/L)	21,50 ± 8,75	33,76 ± 3,52	0,0072
HOMA-IR	8,28 ± 1,39	15,53 ± 0,54	<0,0001
25(OH)D3 (ng/ml)	73,71 ± 8,86	28,74 ± 0,20	<0,0001

Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal; ASC, área sob a curva do TOTG; TOTG, Teste Oral de Tolerância à Glicose; PAS, pressão arterial sistólica; HOMA-IR, modelo de avaliação da homeostase; 25-(OH)D3, 25-hidroxivitamina D3; ns, não significativo. Os dados foram apresentados como média ± DP. Diferenças significativas entre os grupos estão indicadas com os símbolos ($p < 0,05$) conforme determinado pelo teste-t não pareado.

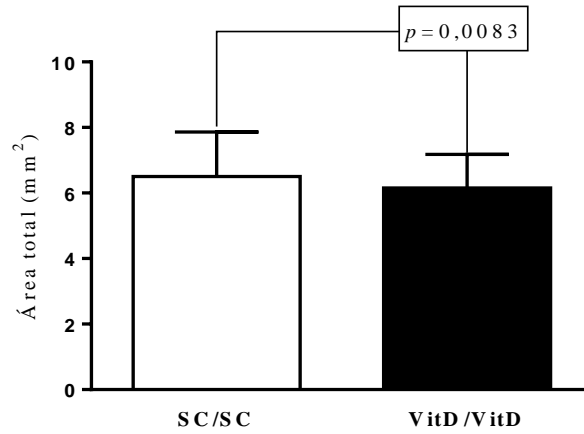
Fonte: A autora, 2018.

4.3 Análises histomorfométricas e imunohistoquímicas

4.3.1 Área do corte transversal do pênis

A restrição de vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal induziu alterações histomorfológicas no pênis da prole adulta. Houve diminuição na área do corte transversal do pênis dos animais do grupo VitD/VitD (-5,45%, $p = 0,0083$) em comparação com os animais do grupo SC/SC. (Figuras 17, 18 e Tabela 6).

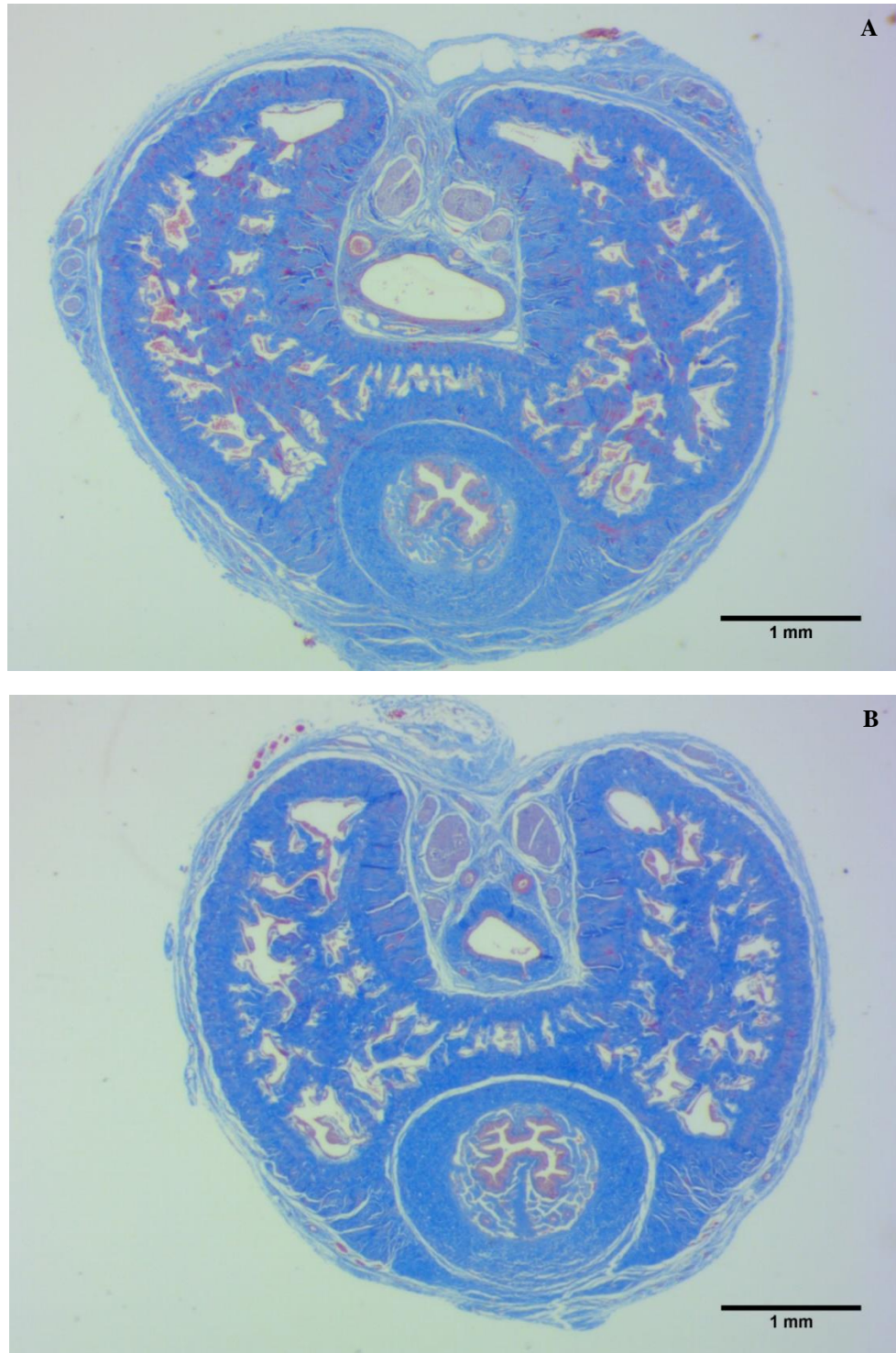
Figura 17 - Gráfico da área do corte transversal da porção média do pênis



Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram apresentados como média \pm DP, SC/SC (n= 8, 20 campos por animal), VitD/VitD (n= 8, 20 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura, $p < 0,05$, conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 18 - Fotomicrografias dos pênis dos filhotes adultos



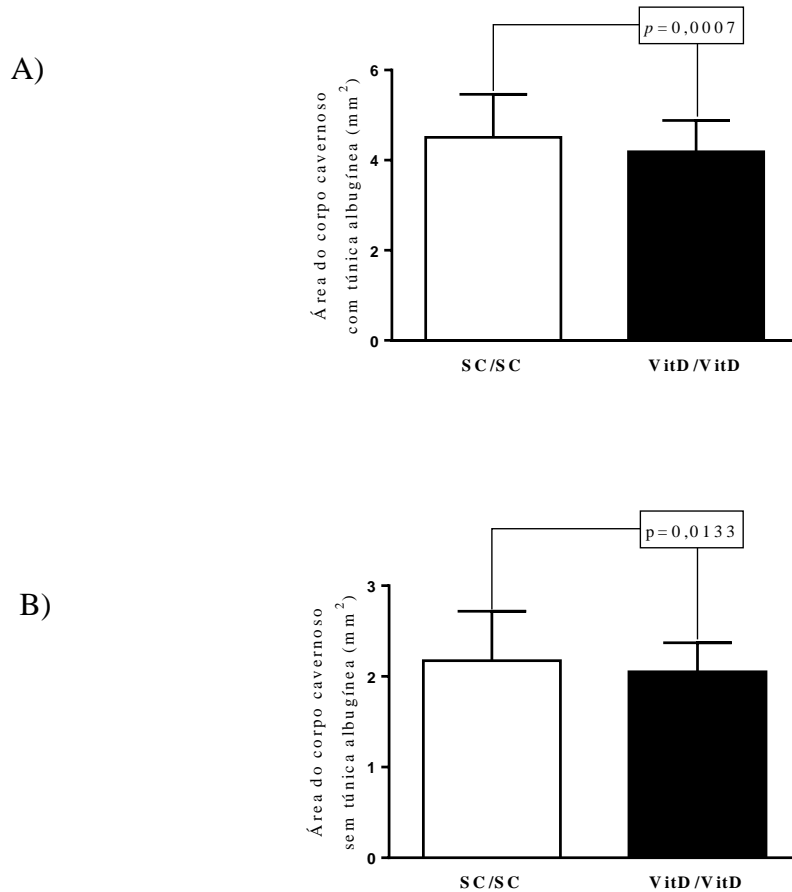
Legenda: Fotomicrografia do corte transversal dos pênis dos animais dos grupos SC/SC (A) e VitD/VitD (B). Tricrômico de Masson, aumento 18,9x. SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal, VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.2 Áreas do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea

As áreas do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea foram menores no grupo VitD/VitD (-7%, $p=0,0007$; -5,7%, $p=0,0133$) quando comparado com o grupo SC/SC, respectivamente (Figura 19 e Tabela 6).

Figura 19 - Gráfico das áreas do corpo cavernoso com e sem a túnica albugínea



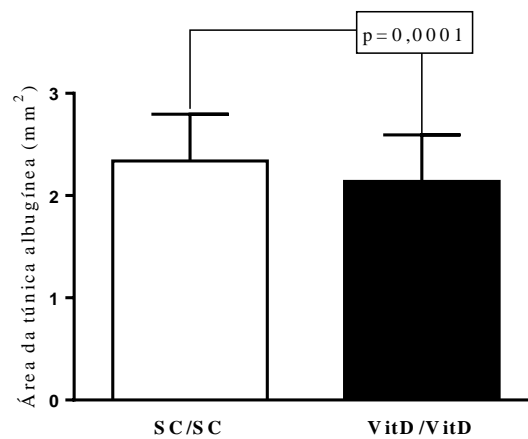
Legenda: Áreas do CC com TA (A) e CC sem TA (B). SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram apresentados como média \pm DP, SC/SC (n=8, 20 campos por animal), VitD/VitD (n= 8, 20 campos por animal). CC com TA, corpo cavernoso com túnica albugínea; CC sem TA, corpo cavernoso sem túnica albugínea. As diferenças significativas estão indicadas nas figuras ($p<0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.3 Área da túnica albugínea

Houve diminuição na área da túnica albugínea no grupo VitD/VitD (-8,55%; $p=0,0001$) em relação ao grupo SC/SC. (Figura 20, Tabela 6).

Figura 20 - Gráfico da área da túnica albugínea



Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram apresentados como média \pm DP, SC/SC (n= 8, 20 campos por animal), VitD/VitD (n= 8, 20 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p<0,05$), conforme teste-t não pareado.

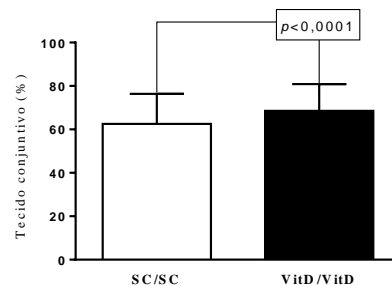
Fonte: A autora, 2018.

4.3.4 Porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso, espaços sinusoidais e fibras elásticas nos corpos cavernoso e esponjoso

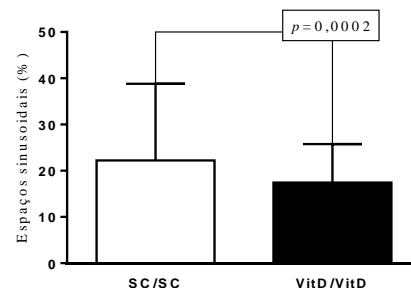
A restrição de vitamina D promoveu alterações nas porcentagens de tecido conjuntivo, músculo liso, espaços sinusoidais e fibras elásticas avaliadas no corpo cavernoso e no corpo esponjoso da prole aos quatro meses de idade. A porcentagem de tecido conjuntivo foi maior no grupo VitD/VitD (+9,52%, $p < 0.0001$) quando comparado ao grupo SC/SC (Figuras 21 e 22, Tabela 6). Em contrapartida, a porcentagem dos espaços sinusoidais (-21,54%, $p = 0,0002$) foi menor no grupo VitD/VitD em comparação com o grupo SC/SC (Figuras 21 e 22, Tabela 6).

Figura 21 - Gráficos das porcentagens de tecido conjuntivo e dos espaços sinusoidais no corpo cavernoso

A)



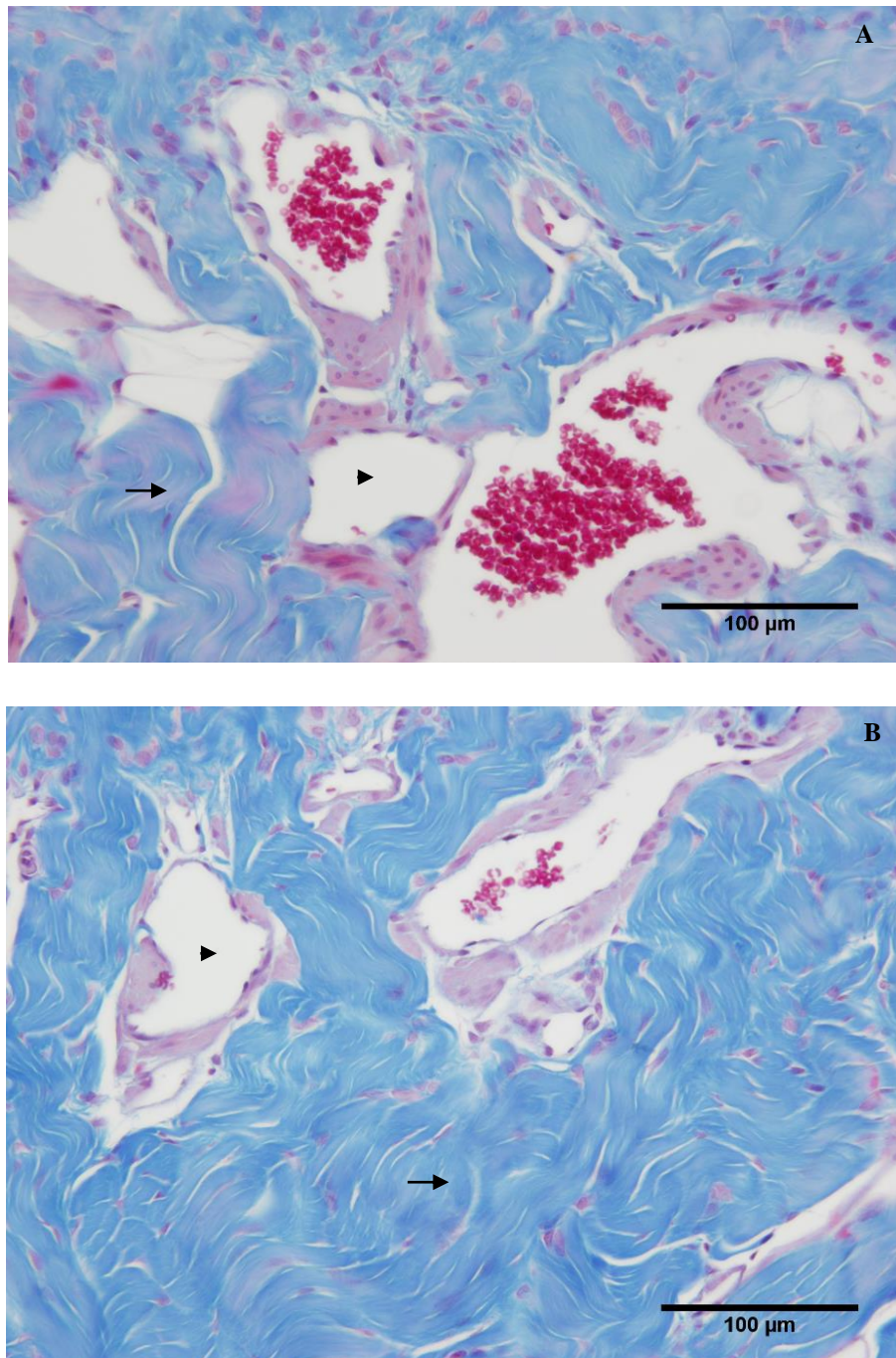
B)



Legenda: Porcentagem de tecido conjuntivo (A) e porcentagem de espaços sinusoidais (B); SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=8, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 8, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 22 – Porcentagens de tecido conjuntivo e dos espaços sinusoidais no corpo cavernoso



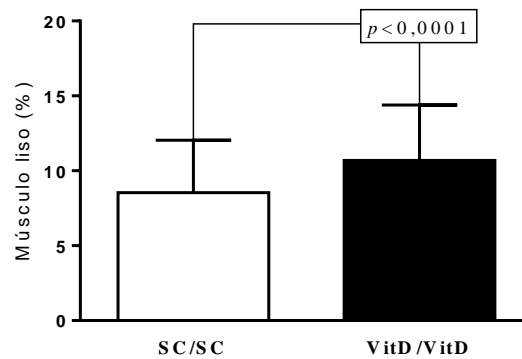
Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso dos animais aos quatro meses de idade (coloração tricrômico de Masson, 400x). (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=8, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=8, 25 campos por animal). Houve aumento da porcentagem de tecido conjuntivo e diminuição da porcentagem dos espaços sinusoidais no grupo VitD/VitD.

Nota: As cabeças de seta indicam os espaços sinusoidais e as setas mostram o tecido conjuntivo.

Fonte: A autora, 2018.

O resultado obtido na avaliação da imunohistoquímica anti- alfa-actina de músculo liso mostrou, que a porcentagem de músculo liso no corpo cavernoso foi maior no grupo VitD/VitD (+25,19%, $p < 0,0001$) do que no grupo SC/SC (Figuras 23 e 24, Tabela 6).

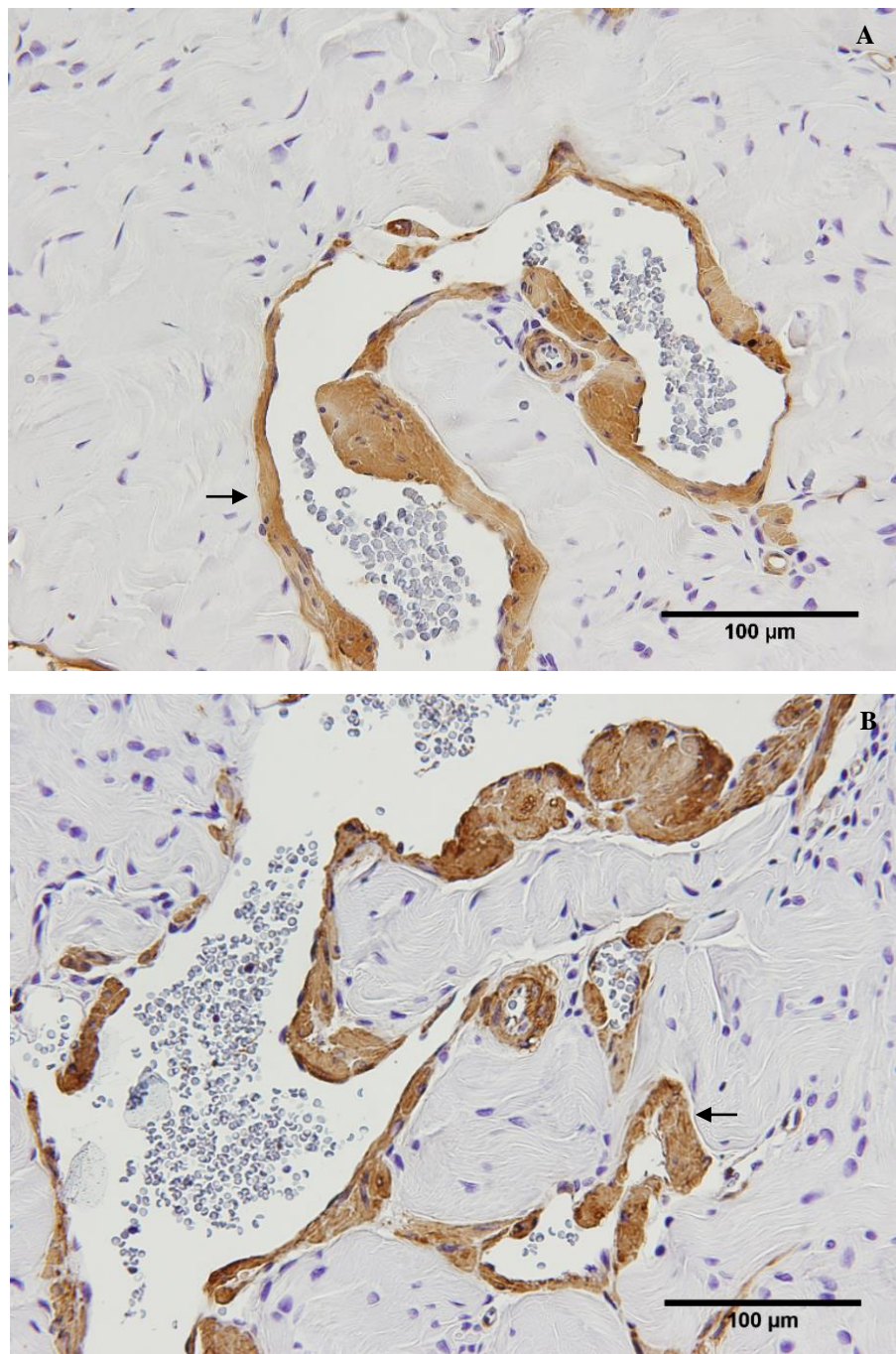
Figura 23- Gráfico da porcentagem de músculo liso no corpo cavernoso



Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=8, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 8, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 24 - Porcentagem de músculo liso no corpo cavernoso



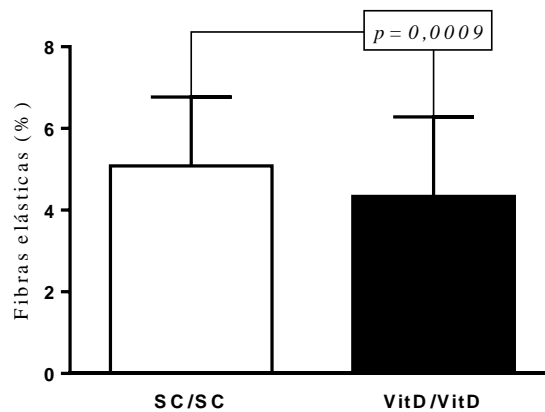
Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso dos filhotes aos quatro meses de idade (imunohistoquímica anti-alfa actina de músculo liso, 400x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

Nota: As setas mostram a imunomarcagem anti-alfa actina de músculo liso nas fotomicrografias do corpo cavernoso. Houve aumento da porcentagem das células musculares lisas no grupo VitD/VitD em relação ao grupo SC/SC.

Fonte: A autora, 2018.

Além disso, a porcentagem de fibras elásticas foi menor no grupo VitD/VitD (-14,83%, $p=0,0009$) em comparação com o grupo SC/SC (Figuras 25 e 26, Tabela 6), respectivamente.

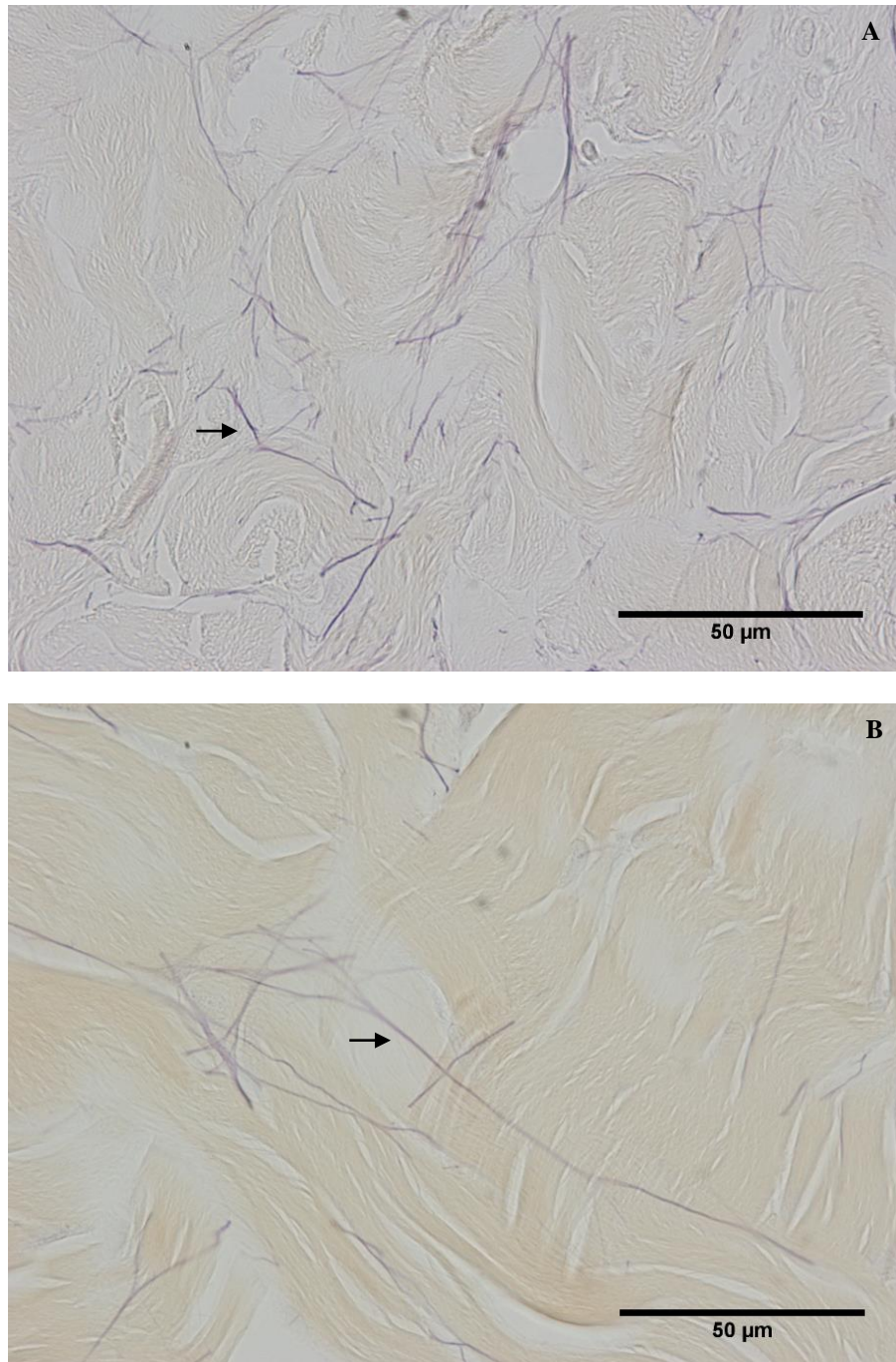
Figura 25- Gráfico da porcentagem de fibras elásticas no corpo cavernoso



Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=8, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 8, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p<0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 26 - Porcentagem de fibras elásticas no corpo cavernoso



Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso dos animais aos quatro meses de idade (técnica de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona, 1000x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=7, 25 campos por animal). Houve diminuição da porcentagem de fibras elásticas no grupo VitD/VitD.

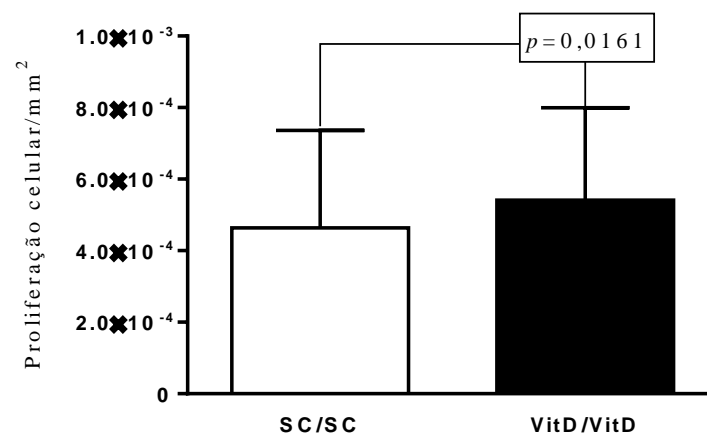
Nota: As setas mostram as fibras elásticas no corpo cavernoso.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.5 Proliferação celular

Na análise da técnica de imunohistoquímica anti-PCNA o grupo VitD/VitD (+17,39%, $p= 0,0161$) apresentou aumento da proliferação celular em relação ao grupo SC/SC (Figuras 27 e 28, Tabela 6).

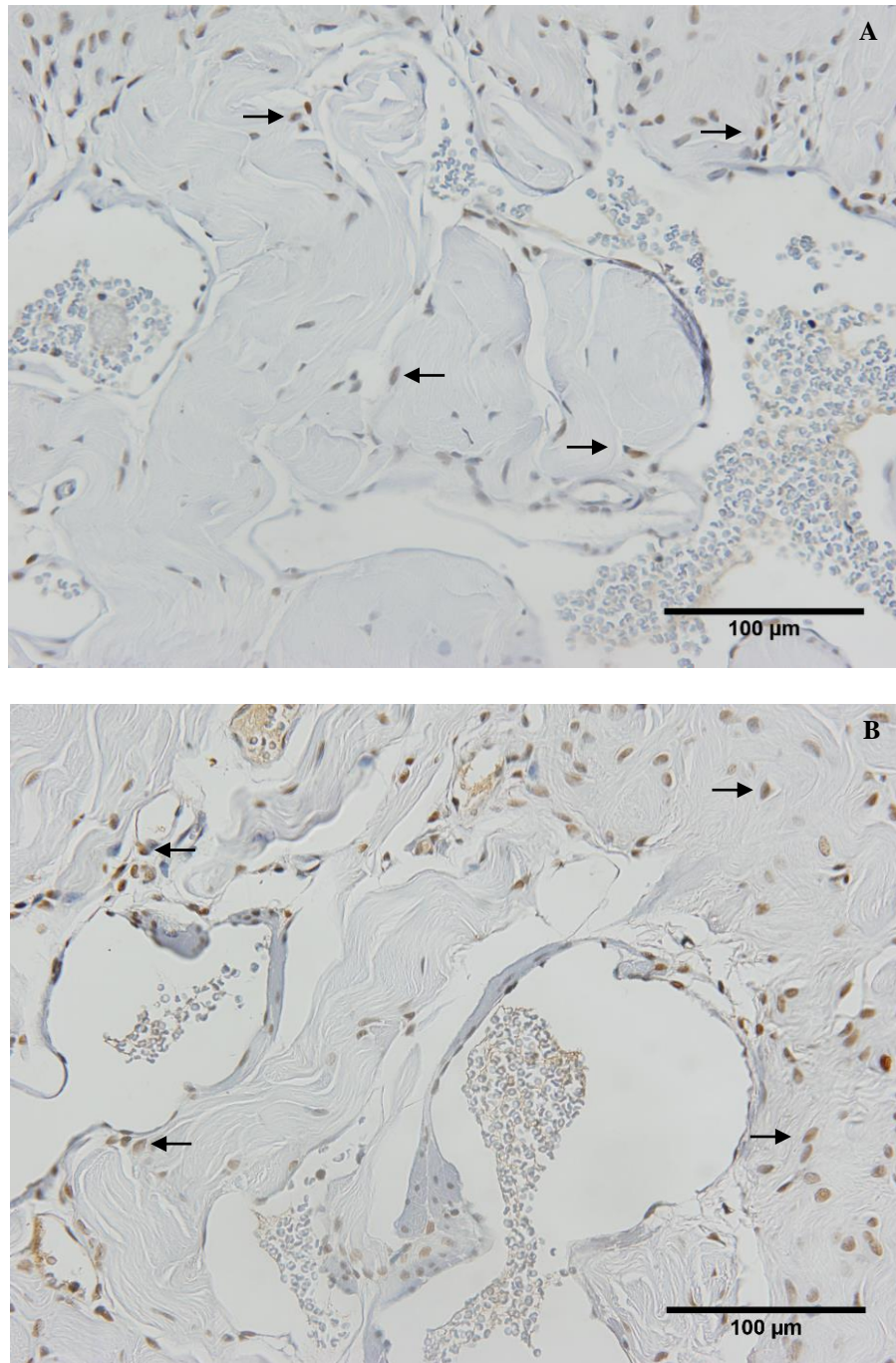
Figura 27- Gráfico da proliferação celular no corpo cavernoso



Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=8, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 8, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p<0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018

Figura 28 - Proliferação celular no corpo cavernoso



Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso dos animais aos quatro meses de idade (Imunohistoquímica anti-PCNA, 400x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal). Houve aumento da proliferação celular no grupo VitD/VitD. PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular.

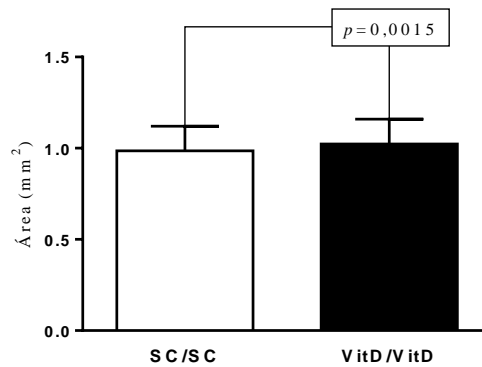
Nota: As setas indicam a imunomarcagem anti-PCNA.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.6 Corpo esponjoso

No que diz respeito as avaliações histomorfométricas do corpo esponjoso, a sua área foi maior no grupo VitD/VitD (+10%, $p=0,0015$) em comparação com o grupo SC/SC (Figura 29 e Tabela 6).

Figura 29- Gráfico da área do corpo esponjoso



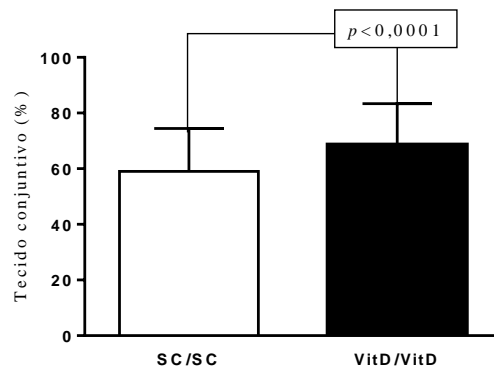
Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=8, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 8, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p<0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

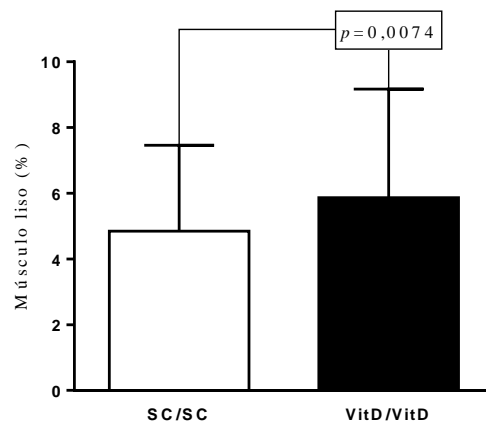
Houve aumento na porcentagem de tecido conjuntivo no grupo VitD/VitD (+16%, $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo SC/SC (Figuras 30 e 31, Tabela 6). A porcentagem de músculo liso foi maior no corpo esponjoso dos animais do grupo VitD/VitD (+21%, $p = 0,0074$) em relação ao grupo SC/SC (Figuras 30 e 32, Tabela 6).

Figura 30 - Gráficos das porcentagens de tecido conjuntivo e músculo liso no corpo esponjoso

A)



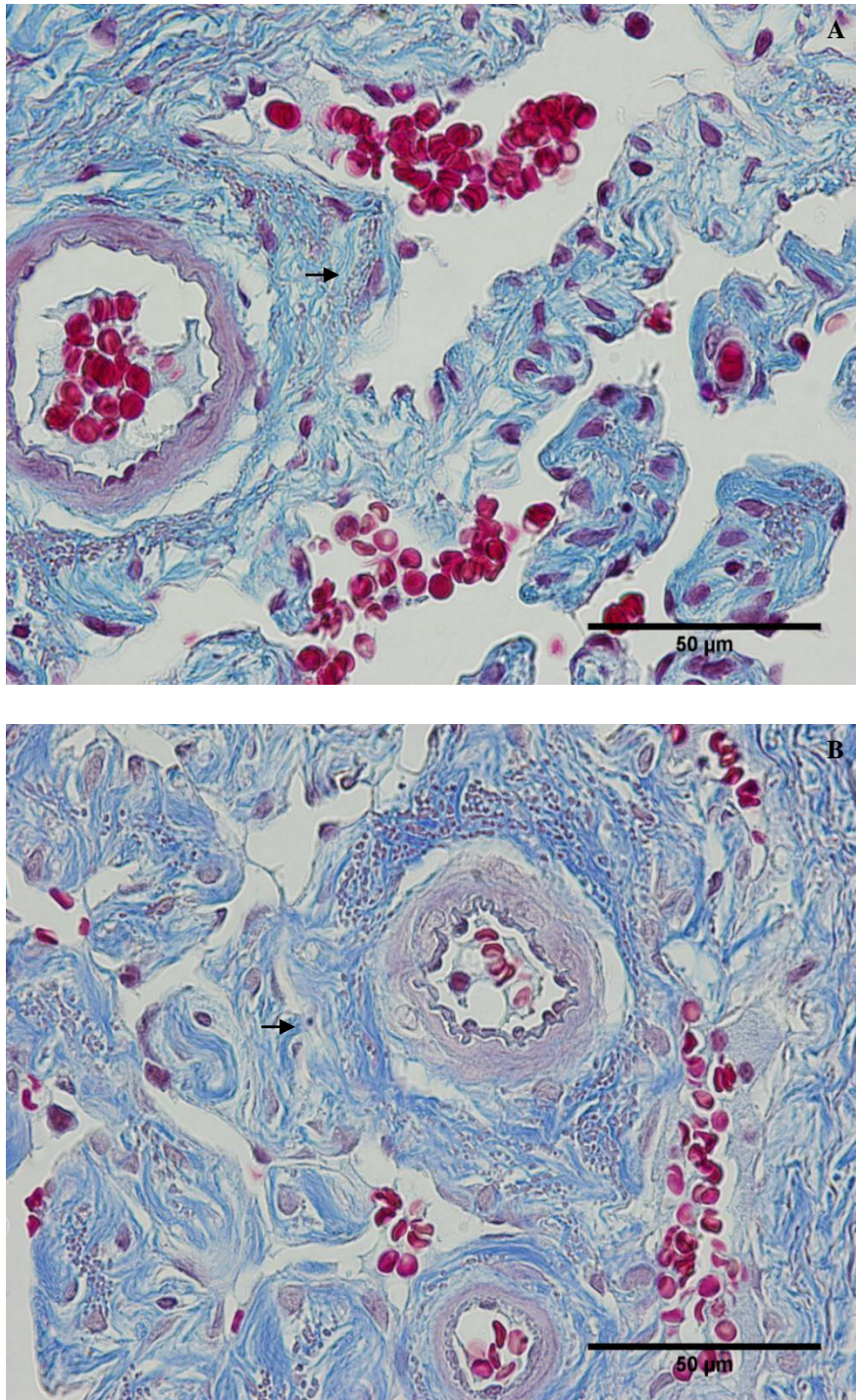
B)



Legenda: Houve aumento das porcentagens de tecido conjuntivo (A) e músculo liso (B) no grupo VitD/VitD. SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=8, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 8, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 31 - Porcentagem de tecido conjuntivo no corpo esponjoso

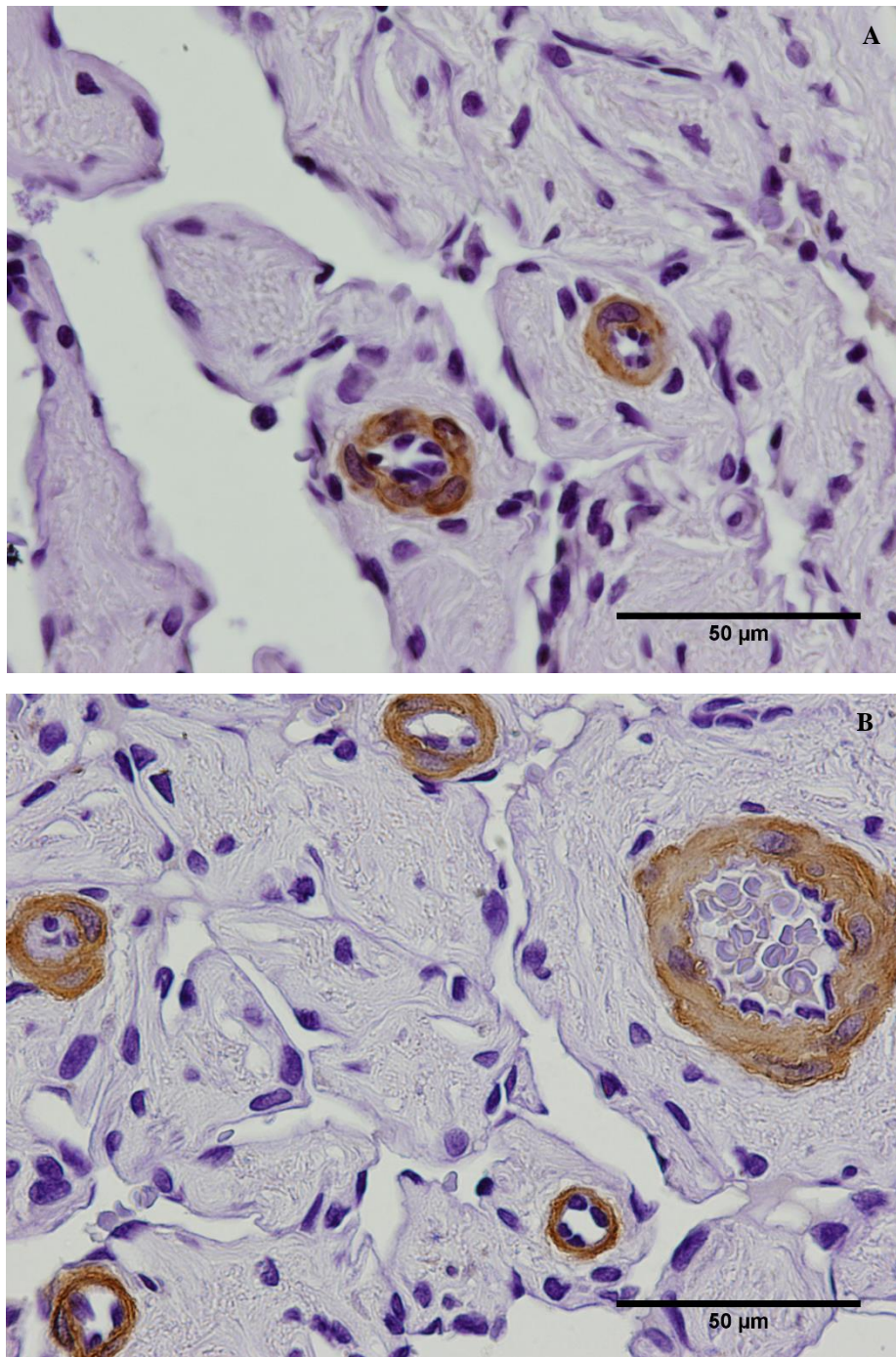


Legenda: Fotomicrografias do corpo cavernoso dos animais aos quatro meses de idade (coloração de tricrômico de Masson, 1000x). (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=8, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=8, 25 campos por animal). Houve aumento da porcentagem de tecido conjuntivo no corpo esponjoso do grupo VitD/VitD.

Nota: As setas mostram o tecido conjuntivo.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 32 - Porcentagem de músculo liso no corpo esponjoso



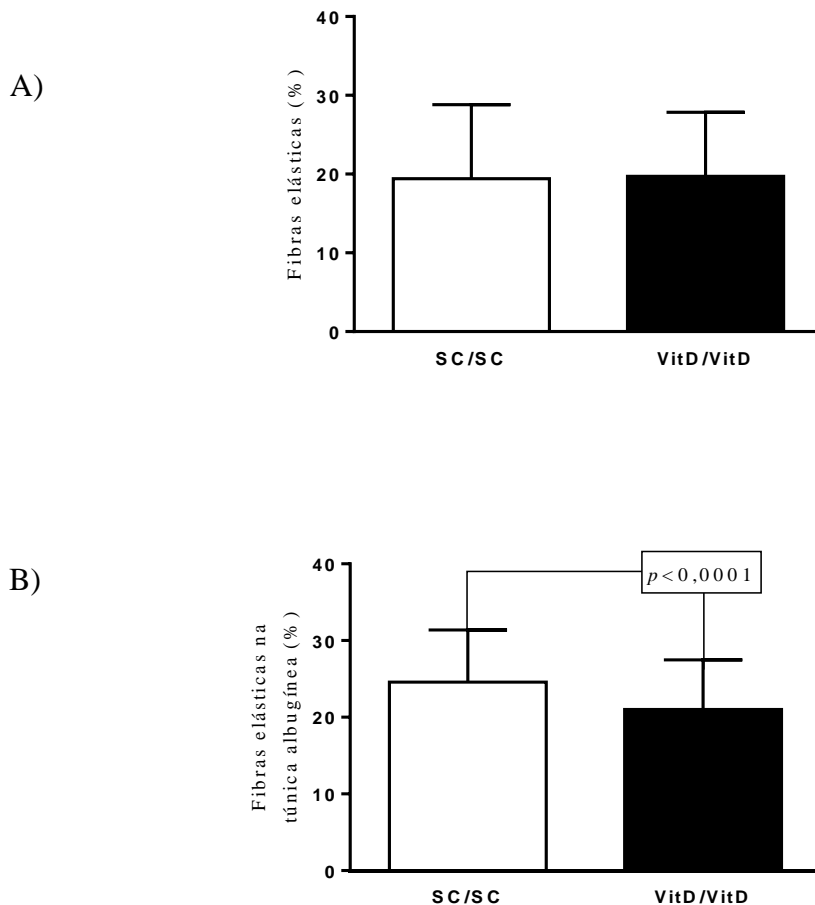
Legenda: Fotomicrografias mostrando o aumento da porcentagem de músculo liso no corpo esponjoso dos animais que receberam a dieta restrita em vitamina D. (Imunohistoquímica anti-alfa actina de músculo liso, 1000x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

Nota: As setas indicam a imunomarcagem anti-alfa actina de músculo liso.

Fonte: A autora, 2018.

Não houve diferença na porcentagem de fibras elásticas no corpo esponjoso entre os grupos SC/SC e VitD/VitD (Figura 33 e 34, Tabela 6). Entretanto, a avaliação da túnica albugínea do corpo esponjoso revelou que a porcentagem de fibras elásticas foi menor no grupo VitD/VitD (-12%, $p < 0,0001$) quando comparado com o grupo SC/SC (Figuras 33 e 35, Tabela 6).

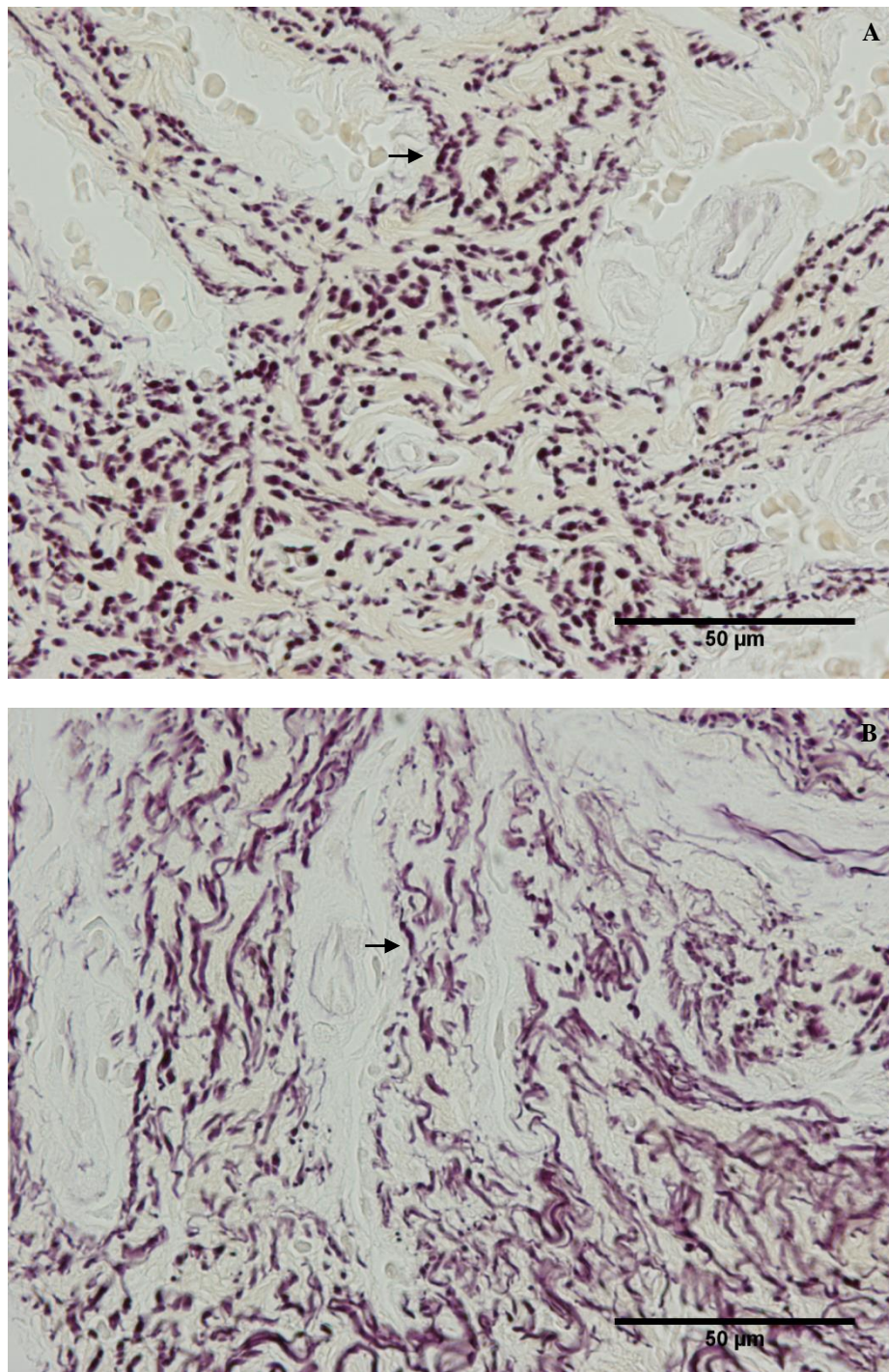
Figura 33 - Gráfico das porcentagens de fibras elásticas no corpo esponjoso e na túnica albugínea do corpo esponjoso



Legenda: Os gráficos mostram que não houve diferença na porcentagem de fibras elásticas no corpo esponjoso (A). Contudo, houve redução da porcentagem de fibras elásticas na túnica albugínea do corpo esponjoso (B). SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=8, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 8, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 34 - Porcentagem de fibras elásticas no corpo esponjoso

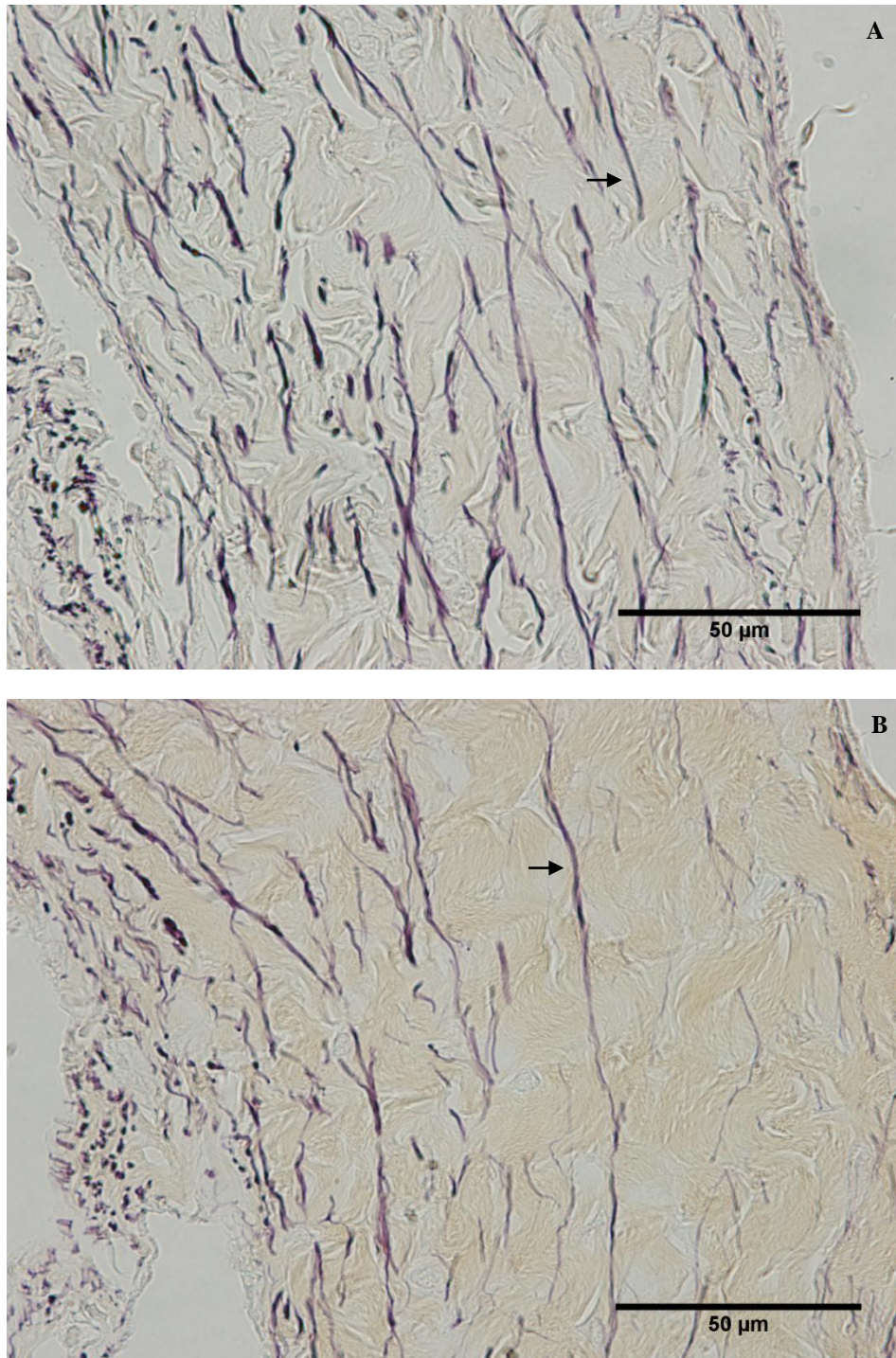


Legenda: Fotomicrografias do corpo esponjoso dos animais aos quatro meses de idade (técnica de resorcina-fucsina de Weigert com prévia oxidação com oxona, 1000x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=8, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=7, 25 campos por animal). Não houve diferença na porcentagem de fibras elásticas no grupo VitD/VitD.

Nota: As setas mostram as fibras elásticas no corpo esponjoso.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 35 - Porcentagem de fibras elásticas na túnica albugínea do corpo esponjoso



Legenda: Fotomicrografias da túnica albugínea do corpo esponjoso dos animais aos quatro meses de idade (técnica de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona, 1000x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=8, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=7, 25 campos por animal). Houve redução na porcentagem de fibras elásticas no grupo VitD/VitD.

Nota: As setas mostram as fibras elásticas na túnica albugínea do corpo esponjoso.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 6 - Dados do pênis dos filhotes aos quatro meses de idade

Dados do pênis	SC/SC	VitD/VitD	<i>p</i>
Morfometria			
A (mm ²)	6,51 ± 1,35	6,15 ± 1,02	0,0083
CC com TA (mm ²)	4,51 ± 0,95	4,19 ± 0,69	0,0007
CC sem TA (mm ²)	2,17 ± 0,54	2,05 ± 0,32	0,0133
TA (mm ²)	2,34 ± 0,45	2,13 ± 0,45	0,0001
CE (mm ²)	0,97 ± 0,12	1,02 ± 0,13	0,0015
Corpo cavernoso			
Tecido conjuntivo (%)	62,58 ± 13,81	68,54 ± 12,31	<0,0001
Músculo liso (%)	8,55 ± 3,49	10,70 ± 3,70	<0,0001
Espaços sinusoidais (%)	22,24 ± 16,57	17,45 ± 8,33	0,0002
Fibras elásticas (%)	5,09 ± 1,72	4,33 ± 1,93	0,0009
PCNA (células/mm ²)	4,63x10 ⁻⁴ ± 2,72x10 ⁻⁴	5,41x10 ⁻⁴ ± 2,58x10 ⁻⁴	0,0161
Corpo esponjoso			
Tecido conjuntivo (%)	59,04 ± 15,40	68,62 ± 14,79	<0,0001
Músculo liso (%)	4,85 ± 2,61	5,87 ± 3,30	0,0074
Fibras elásticas (%)	19,40 ± 9,42	19,73 ± 8,10	ns
Fibras elásticas na túnica albugínea (%)	24,59 ± 6,79	21,00 ± 6,48	<0,0001

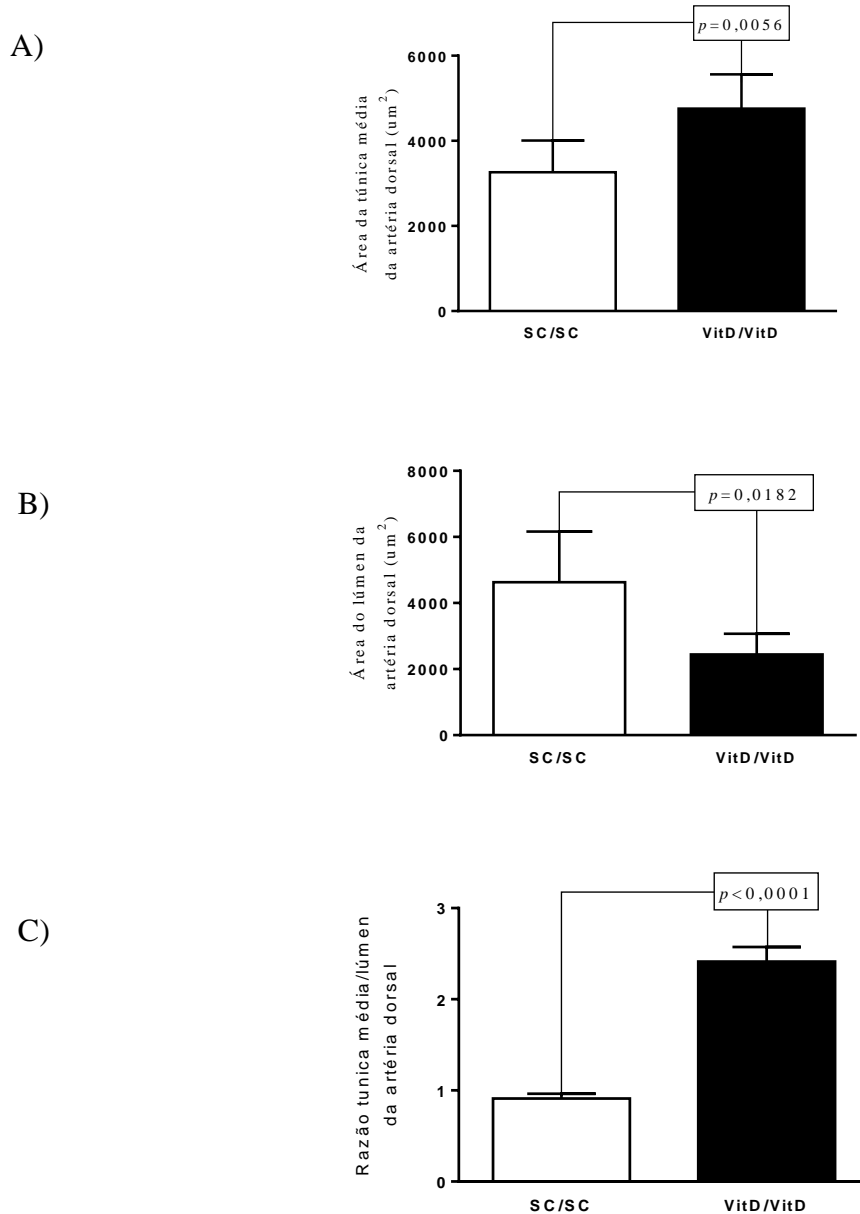
Legenda: Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão e as diferenças foram testadas com teste- t não pareado ($p < 0,05$). Abreviações: A, área do corte transversal do pênis; CC com TA, área do corpo cavernoso com túnica albugínea; CC sem TA, área do corpo cavernoso sem túnica albugínea; TA, túnica albugínea; CE, corpo esponjoso; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; ns, não significativo.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.7 Alterações histomorfológicas na artéria dorsal do pênis

Não houve diferença na área da artéria dorsal entre os grupos SC/SC e VitD/VitD. A área da túnica média da artéria dorsal foi maior no grupo VitD/VitD (+45,82%, $p=0,0156$) quando comparado com o grupo SC/SC (Figuras 36 e 37, Tabela 7). A área do lúmen da artéria dorsal foi menor no grupo VitD/VitD (-47,28%, $p=0,0040$) em relação ao grupo SC/SC (Figuras 36 e 37, Tabela 7). Consequentemente, a razão entre as áreas da túnica média e a área do lúmen da artéria dorsal foi maior nos animais do grupo VitD/VitD (+164,69%, $p<0,0001$) (Figura 36 e Tabela 7). A densidade nuclear na túnica média da artéria dorsal foi similar em ambos os grupos experimentais (Tabela 7).

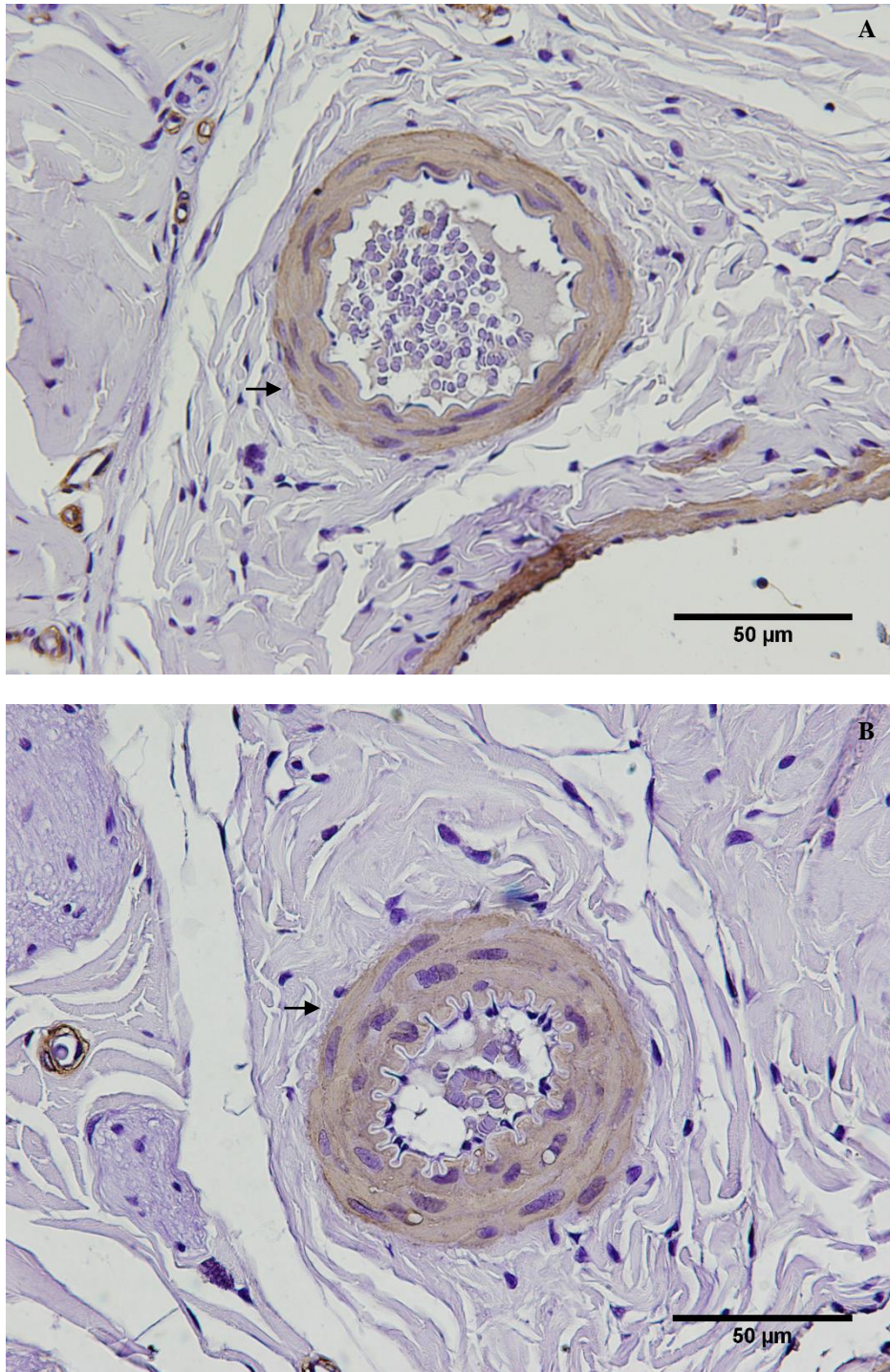
Figura 36 - Gráficos das áreas da túnica média, do lúmen e razão túnica média / lúmen da artéria dorsal



Legenda: Os gráficos mostram que houve aumento na área da túnica média (A) e redução na área do lúmen da artéria dorsal (B) o que resultou no aumento da razão entre as áreas da túnica média e do lúmen da artéria dorsal (C). SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=5, 10 campos por animal); VitD/VitD (n= 5, 10 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 37- Áreas da artéria dorsal, da túnica média e do lúmen da artéria dorsal



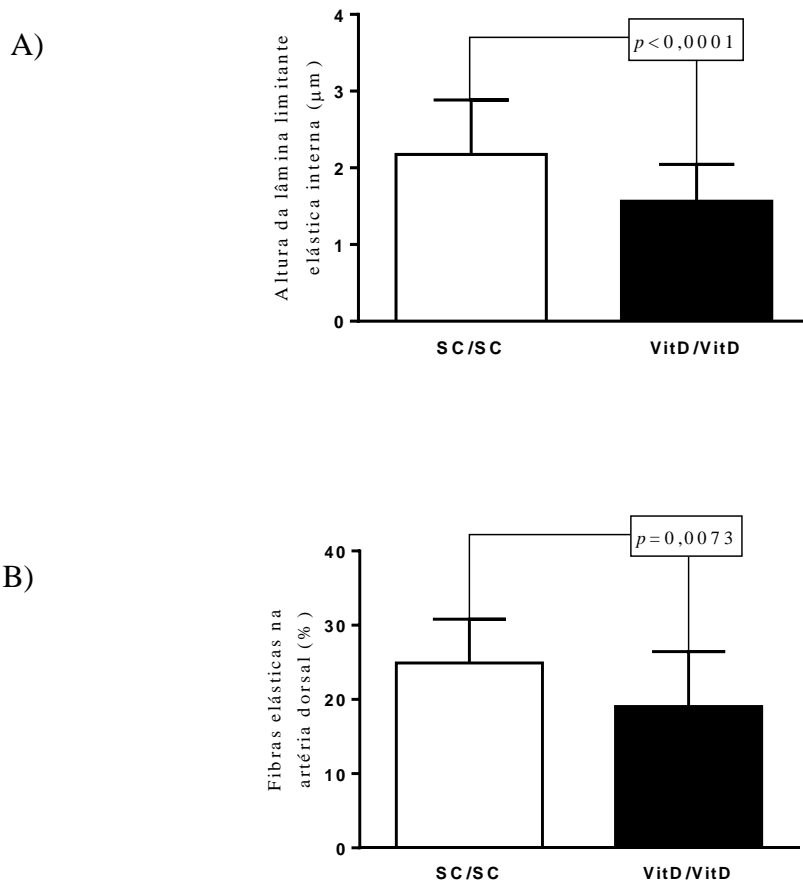
Legenda: Fotomicrografias das áreas da artéria dorsal, da túnica média e do lúmen da artéria dorsal. (Imunohistoquímica anti-alfa-actina de músculo liso, 600x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 5 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 5 campos por animal).

Nota: As setas indicam a imunomarcção anti-alfa-actina de músculo liso.

Fonte: A autora, 2018.

A altura da lâmina limitante elástica interna da artéria dorsal foi menor nos animais do grupo VitD/VitD (-28,11%, $p < 0,0001$) em relação ao grupo SC/SC (Figura 38 e Tabela 7). O grupo VitD/VitD (-30,36%, $p = 0,0073$) apresentou redução na porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal em comparação com o grupo SC/SC. (Figuras 38 e 39, Tabela 7).

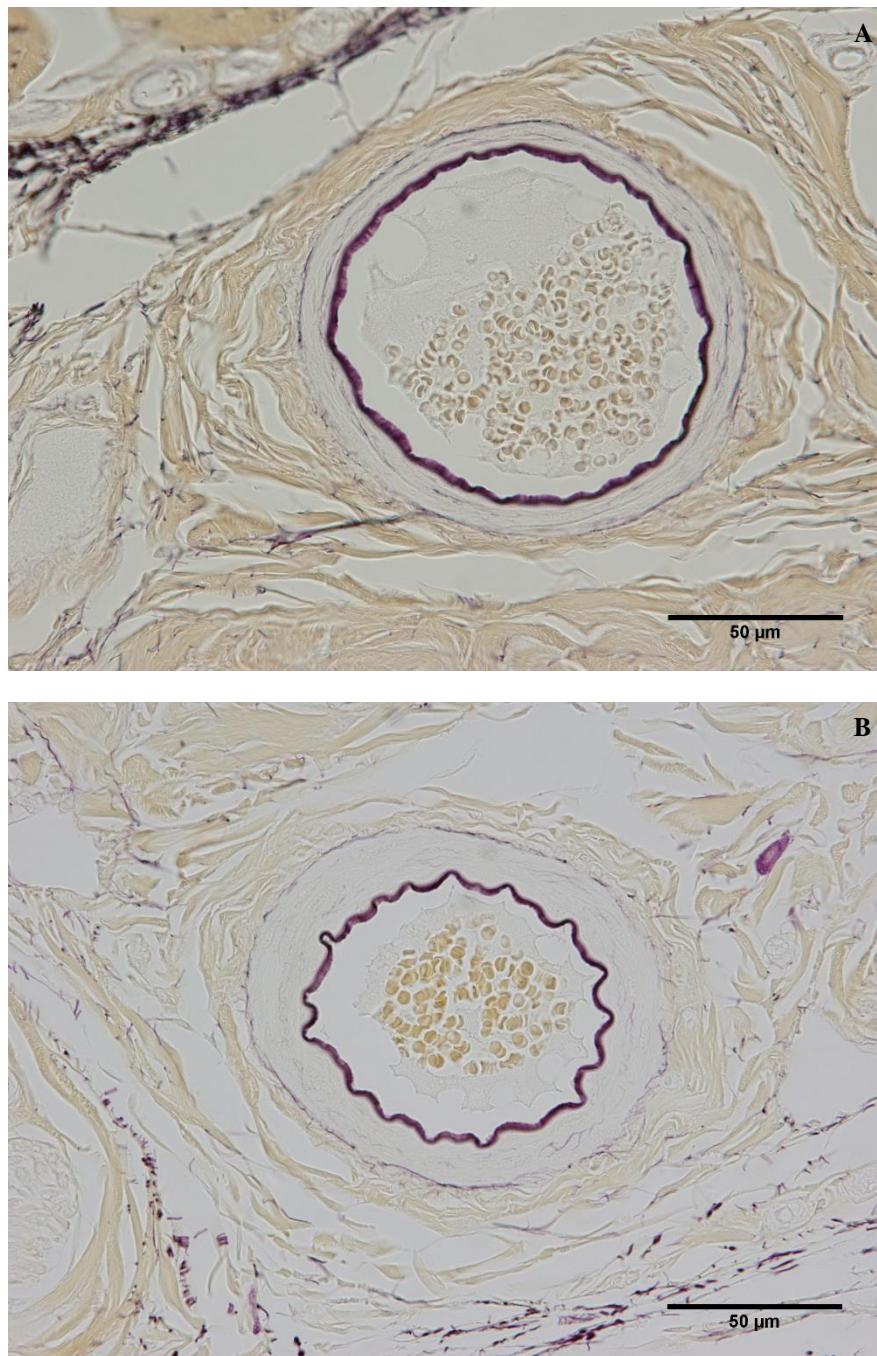
Figura 38 - Gráficos da altura da lâmina limitante elástica interna e porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal



Legenda: Os gráficos mostram que houve aumento na área da túnica média (A) e redução na área do lúmen da artéria dorsal (B) o que resultou no aumento da razão entre as áreas da túnica média e do lúmen da artéria dorsal (C). SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=5, 10 campos por animal); VitD/VitD (n= 5, 10 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 39 - Porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal



Legenda: Fotomicrografias mostrando a redução da porcentagem de fibras elásticas na artéria dorsal (técnica de fucsina-resorcina de Weigert com prévia oxidação com oxona, 600x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 5 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 5 campos por animal).

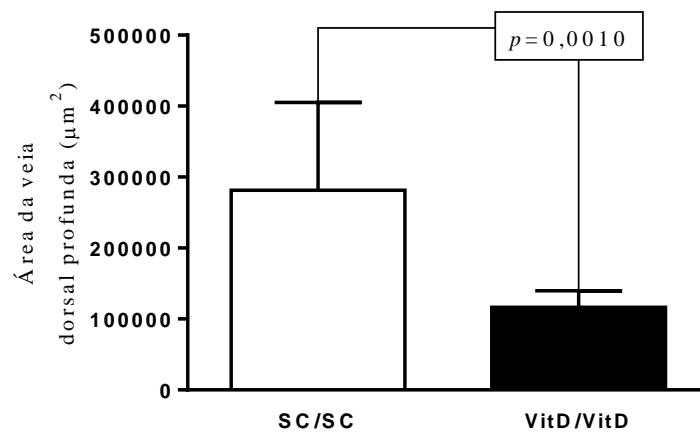
Nota: As setas mostram as fibras elásticas na túnica albugínea do corpo esponjoso.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.8 Alterações histomorfológicas na veia dorsal profunda

A área da veia dorsal profunda foi menor no grupo VitD/VitD (-58,26%, $p=0,0010$) em comparação com o grupo SC/SC (Figuras 40 e 41, Tabela 7).

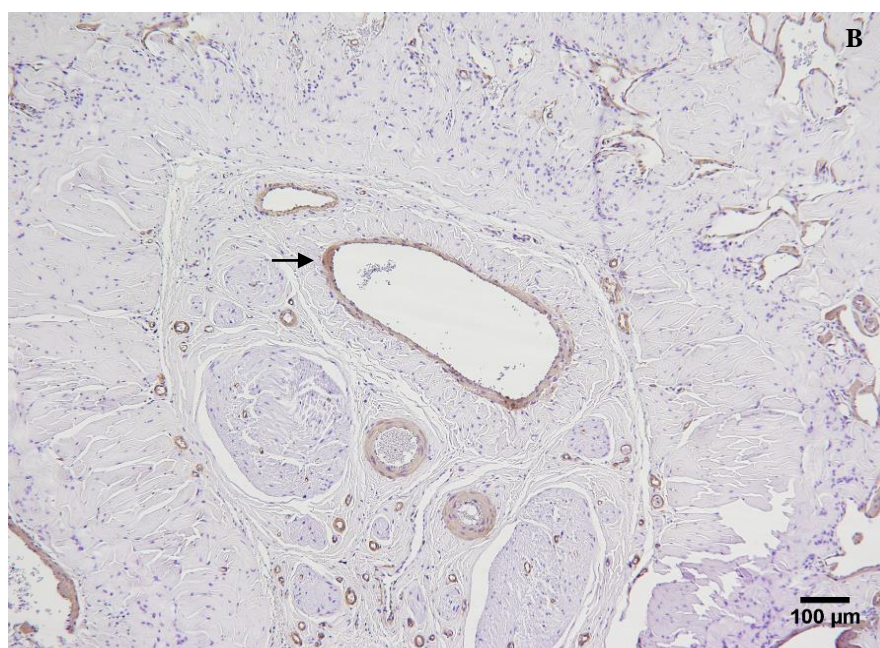
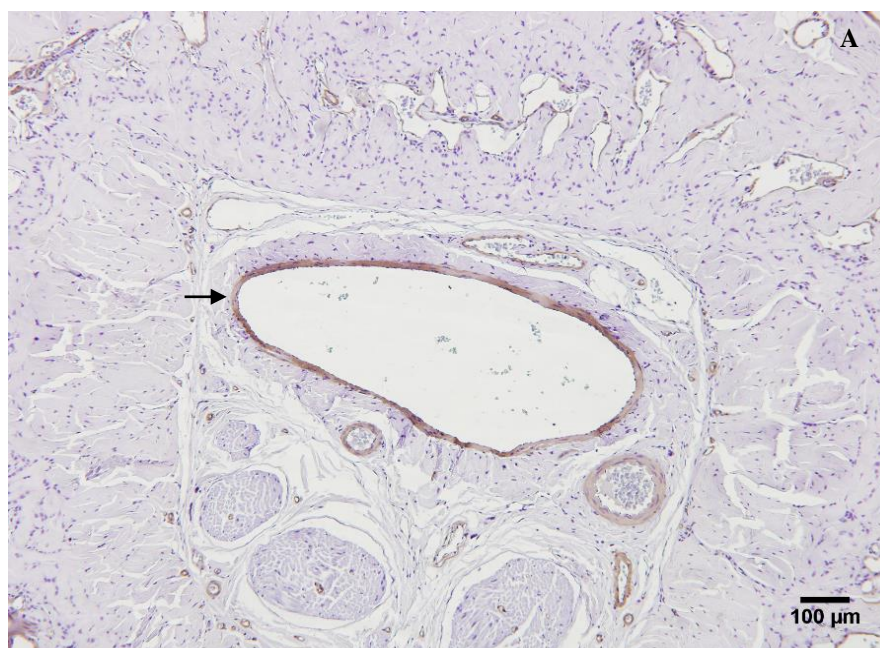
Figura 40 – Gráfico da área da veia dorsal profunda



Legenda: O gráfico mostra que a área da veia dorsal profunda foi menor no grupo que recebeu a dieta restrita em vitamina D. SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=5, 5 campos por animal); VitD/VitD (n= 5, 5 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p<0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

41- Área da veia dorsal profunda



Legenda: Fotomicrografias das áreas da veia dorsal profunda. (Imunohistoquímica anti-alfa-actina de músculo liso, 100x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 5 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 5 campos por animal).

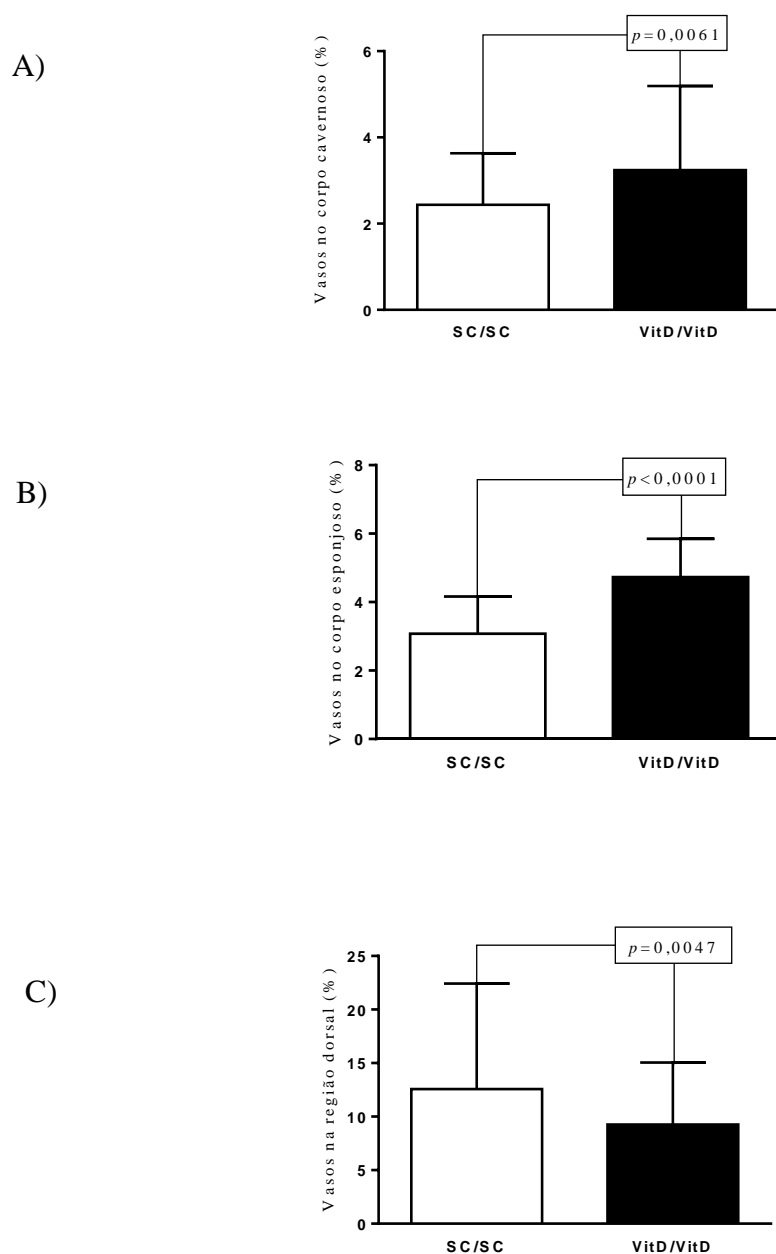
Nota: As setas indicam a imunomarcção anti-alfa-actina de músculo liso.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.9 Porcentagem de vasos

A porcentagem de vasos foi maior no corpo cavernoso (+43,44%, $p=0,0061$) e também no corpo esponjoso (+53,57%, $p<0,0001$) no grupo VitD/VitD em relação ao grupo SC/SC (Figuras 42, 43 e 44, Tabela 7), respectivamente. Observou-se uma redução na porcentagem de vasos na região dorsal (-26,47%, $p=0,0047$) nos animais do grupo VitD/VitD (Figuras 42 e 45, Tabela 7).

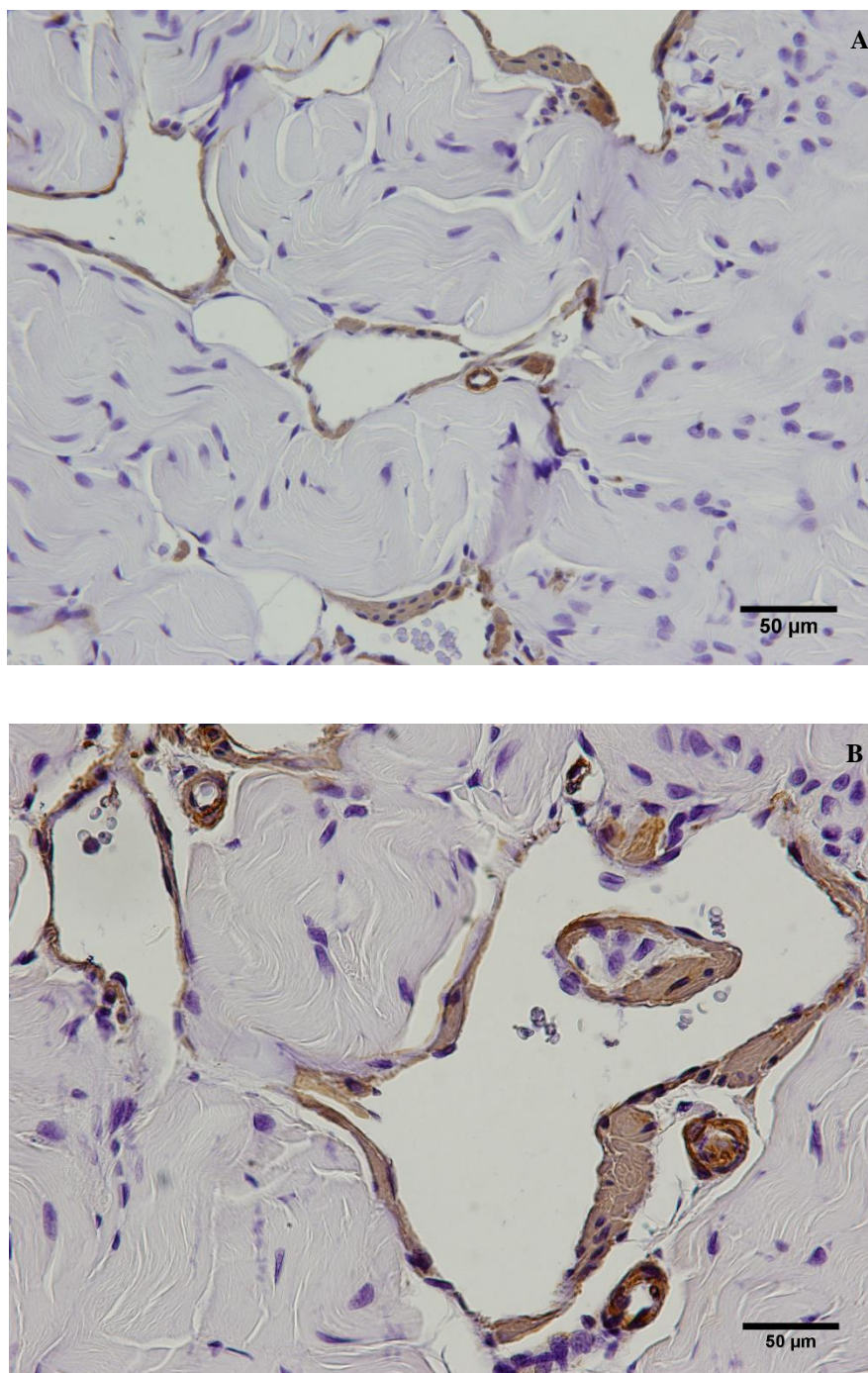
Figura 42- Gráficos da porcentagem de vasos nos corpos cavernoso, esponjoso e região dorsal



Legenda: A porcentagem de vasos foi maior nos corpos cavernoso (A) e esponjoso (B) e menor na região dorsal (C) no grupo VitD/VitD. SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=5, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 5, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 43 - Porcentagem de vasos no corpo cavernoso

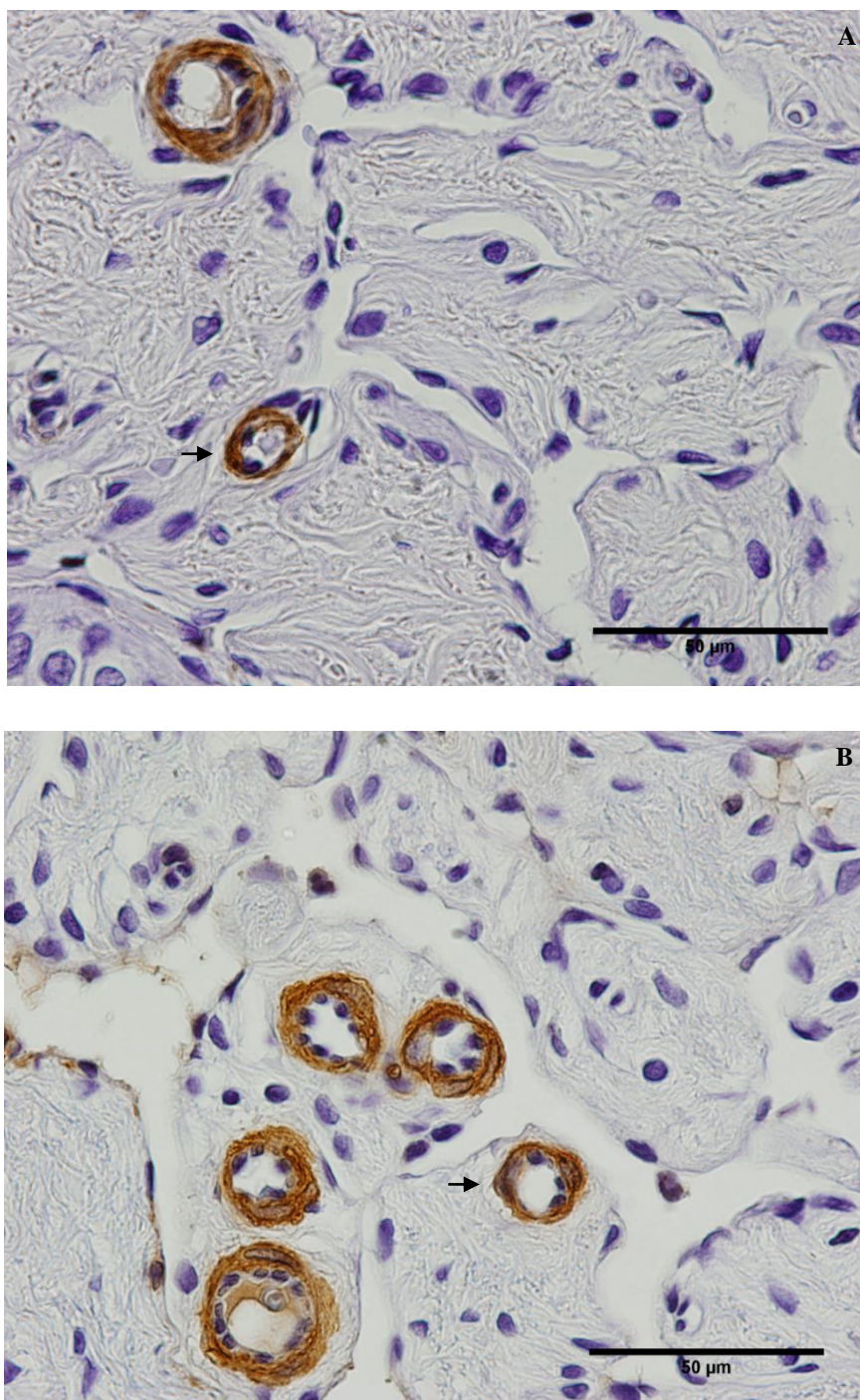


Legenda: Fotomicrografias mostrando uma maior porcentagem de vasos no corpo cavernoso do grupo VitD/VitD. (Imunohistoquímica anti-alfa-actina de músculo liso, 400x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

Nota: As setas indicam a imunomarcção anti-alfa actina de músculo liso.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 44 - Porcentagem de vasos no corpo esponjoso

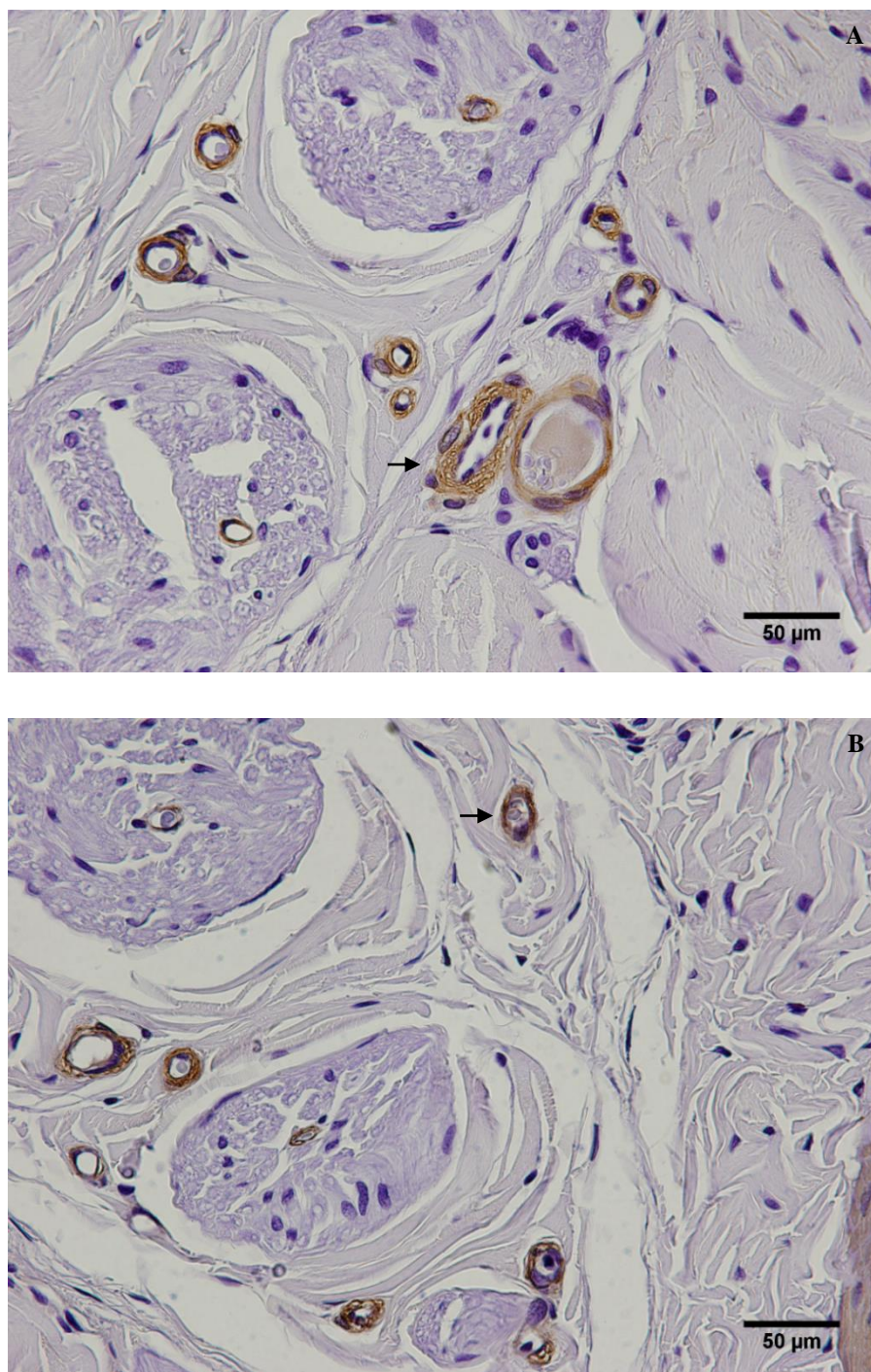


Legenda: Fotomicrografias mostrando maior porcentagem de vasos no corpo esponjoso dos animais que receberam a dieta sem vitamina D. (Imunohistoquímica anti-alfa-actina de músculo liso, 1000x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

Nota: As setas indicam a imunomarcção anti-alfa-actina de músculo liso.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 45 - Porcentagem de vasos na região dorsal



Legenda: Fotomicrografias mostrando menor porcentagem de vasos na região dorsal nos animais que receberam a dieta sem vitamina D. (Imunohistoquímica anti-alfa-actina de músculo liso, 600x). (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

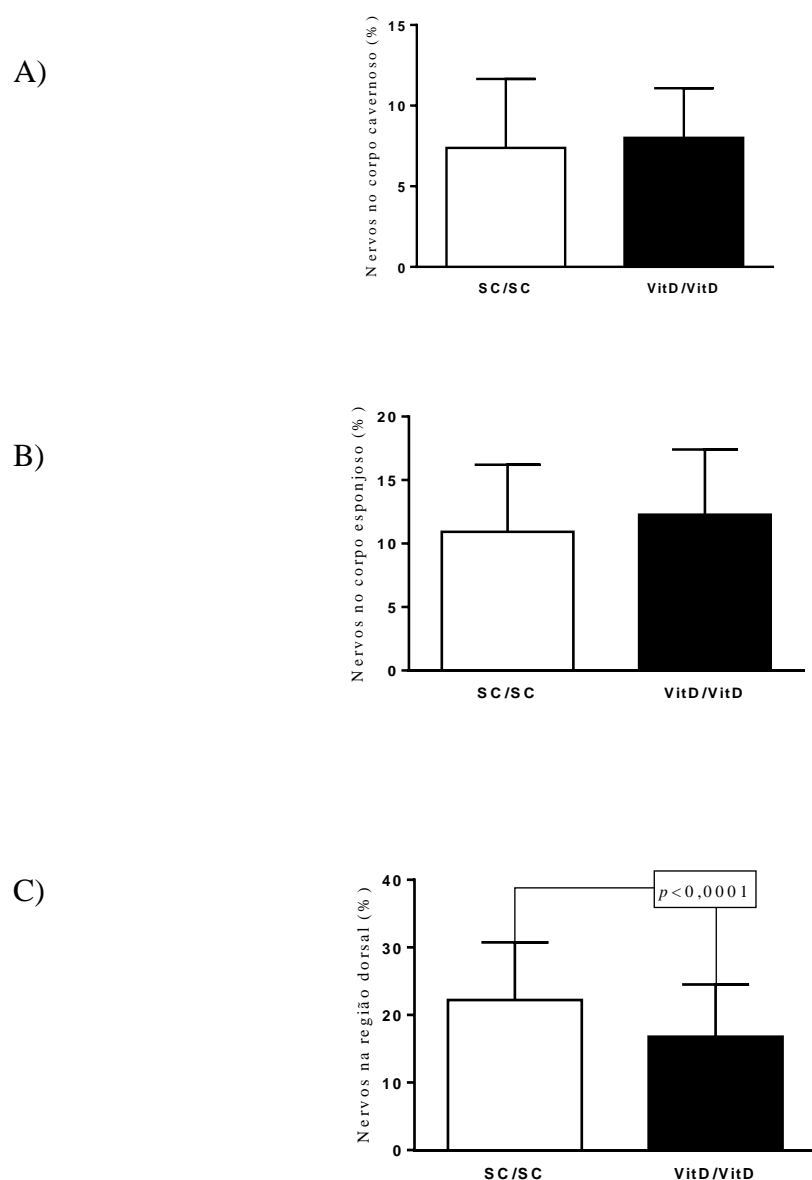
Nota: As setas indicam a imunomarcagem anti-alfa-actina de músculo liso.

Fonte: A autora, 2018.

4.3.10 Porcentagem de nervos

Não houve diferença na porcentagem de nervos no corpo cavernoso e no corpo esponjoso entre os grupos SC/SC e VitD/VitD (Figuras 46, 47 e 48, Tabela 7), respectivamente. No entanto, a porcentagem de nervos foi menor na região dorsal nos animais do grupo VitD/VitD (-24,43%, $p < 0,0001$) quando comparado com os animais do grupo SC/SC (Figuras 46 e 49, Tabela 7).

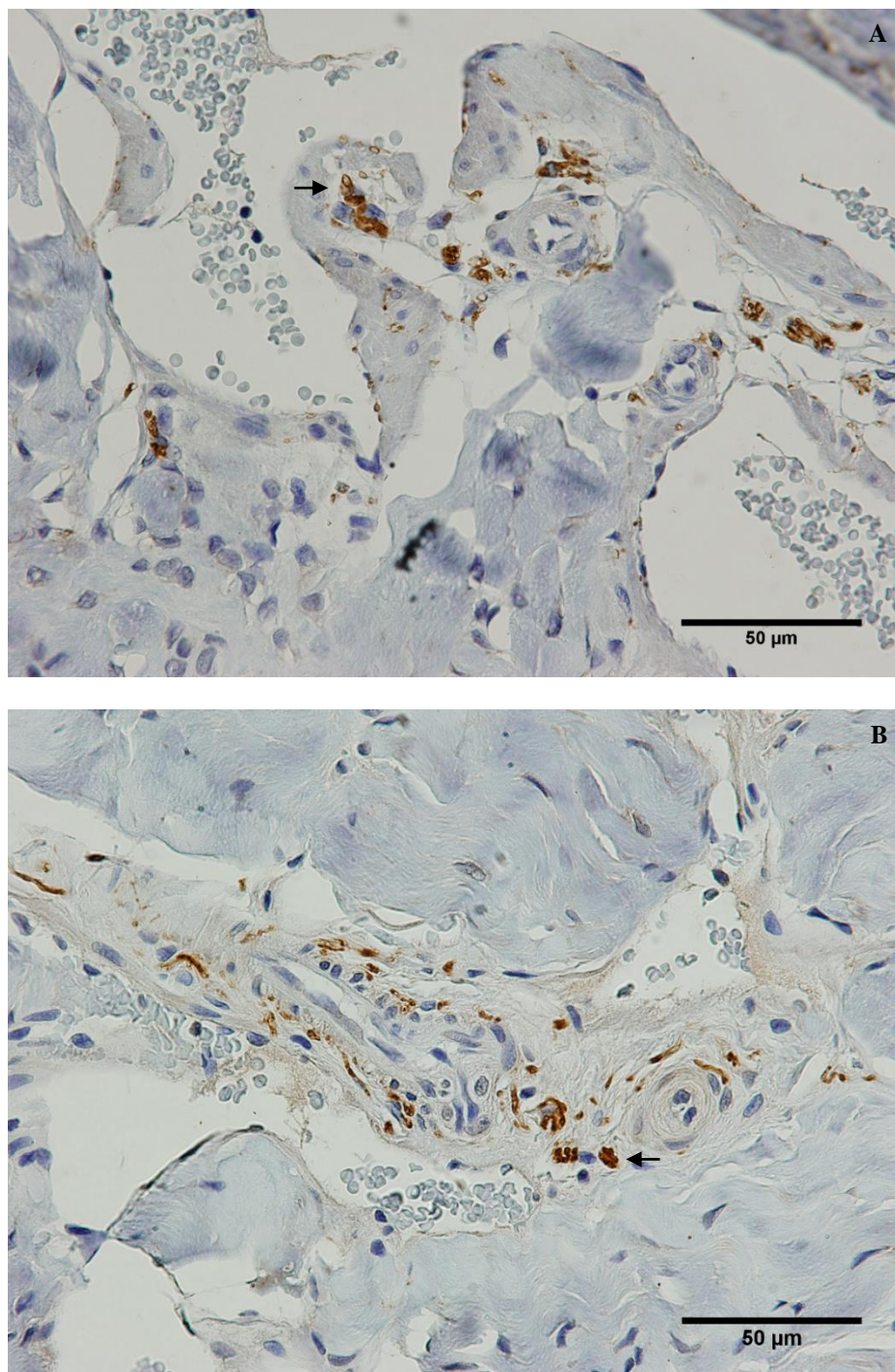
Figura 46 - Gráficos da porcentagem de nervos nos corpos cavernoso, esponjoso e na região dorsal do pênis



Legenda: A porcentagem de nervos foi menor apenas na região dorsal no grupo que recebeu a dieta restrita em vitamina D (C). SC/SC, grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Os dados foram expressos como média \pm DP. SC/SC (n=5, 25 campos por animal); VitD/VitD (n= 5, 25 campos por animal). As diferenças significativas estão indicadas na figura ($p < 0,05$), conforme teste-t não pareado.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 47- Porcentagem de nervos no corpo cavernoso

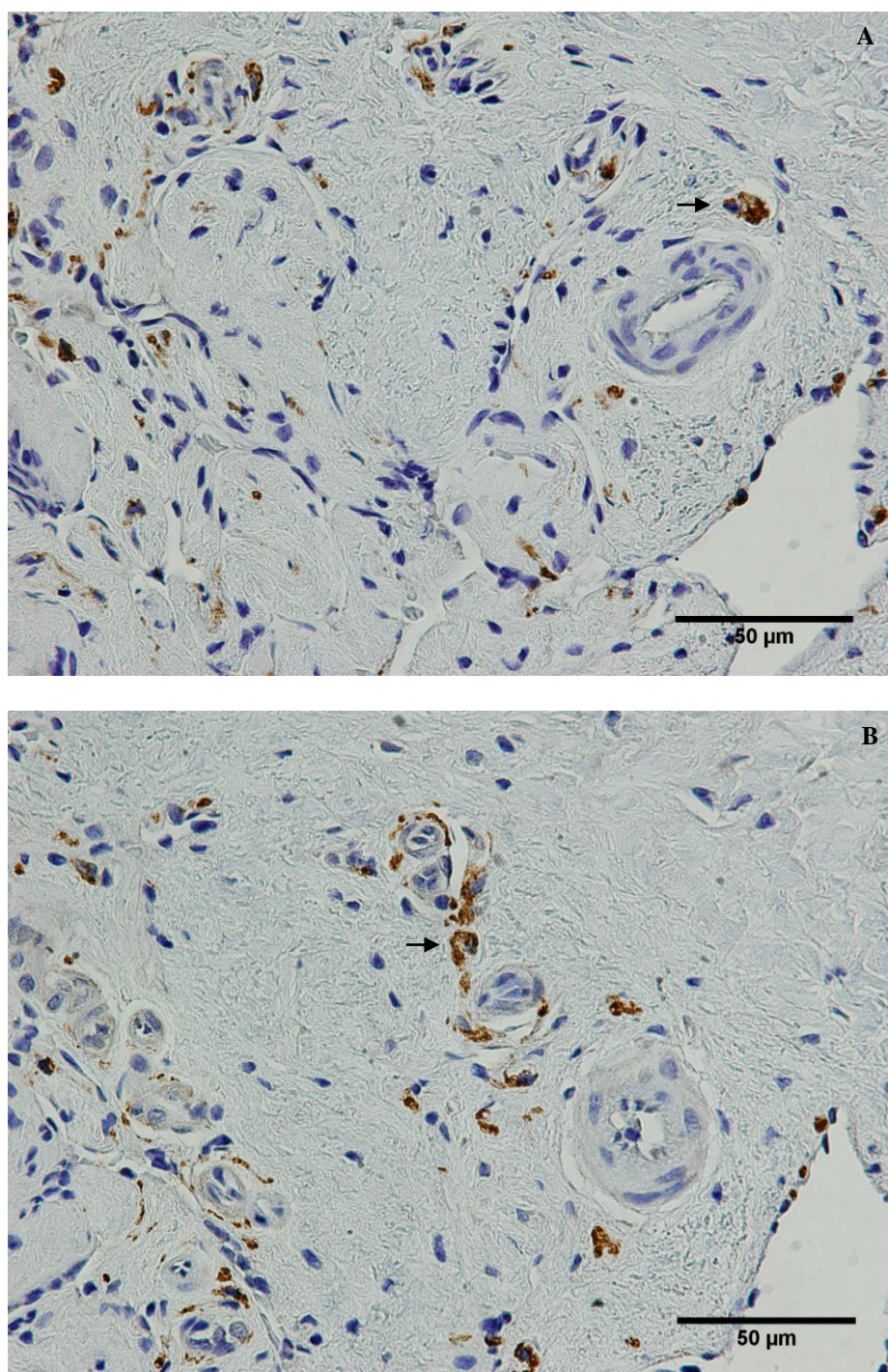


Legenda: Fotomicrografias mostrando que não houve diferença na porcentagem de nervos no corpo cavernoso entre os grupos experimentais. (Imunohistoquímica anti-tubulina $\beta 3$, 600x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

Nota: As setas indicam a imunomarcagem anti-tubulina $\beta 3$.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 48- Porcentagem de nervos no corpo esponjoso

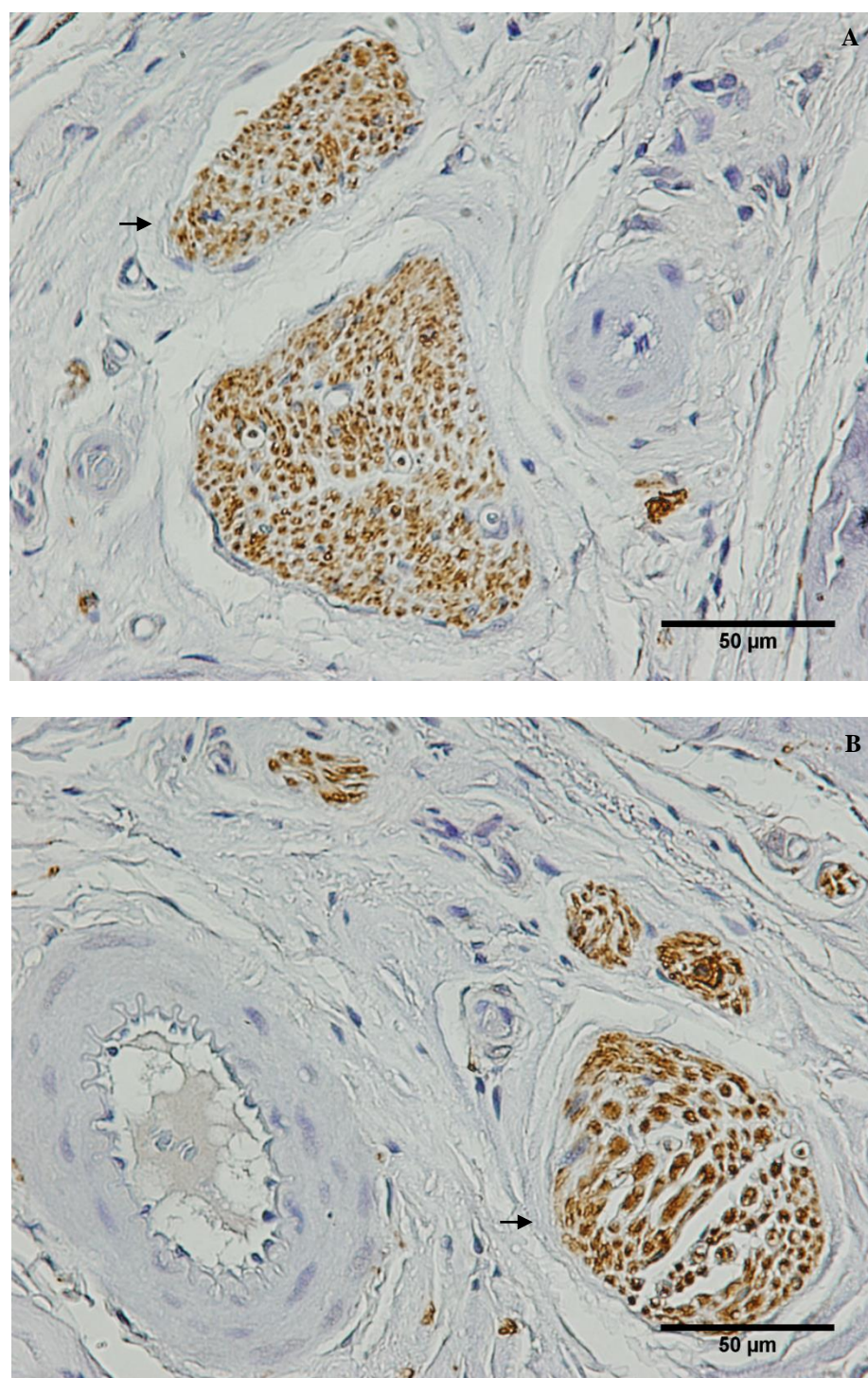


Legenda: Fotomicrografias mostrando que não houve diferença na porcentagem de nervos no corpo esponjoso entre os grupos experimentais. (Imunohistoquímica anti-tubulina $\beta 3$, 600x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

Nota: As setas indicam a imunomarcagem anti-tubulina $\beta 3$.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 49- Porcentagem de nervos na região dorsal



Legenda: Fotomicrografias mostrando que houve redução na porcentagem de nervos na região dorsal no grupo VitD/VitD. (Imunohistoquímica anti-tubulina $\beta 3$, 600x). Em (A) grupo dieta padrão nos períodos perinatal e pós-natal (SC/SC, n=5, 25 campos por animal); (B) grupo dieta restrita em vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (VitD/VitD, n=5, 25 campos por animal).

Nota: As setas indicam a imunomarcagem anti-tubulina $\beta 3$.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 7 - Dados dos vasos e nervos do pênis dos filhotes aos quatro meses de idade

Dados	SC/SC	VitD/VitD	<i>p</i>
Morfometria			
Área AD (μm^2)	7398,00 \pm 1617,00	7654,00 \pm 954,30	ns
TM da AD (μm^2)	3263,00 \pm 742,00	4758,00 \pm 801,70	0,0156
Lúmen da AD (μm^2)	4632,00 \pm 1533,00	2442,00 \pm 628,30	0,004
TM da AD/ Lúmen da AD	0,91 \pm 0,05	2,41 \pm 0,15	<0,0001
Densidade nuclear TM da AD (núcleos/ μm^2)	0,007 \pm 0,002	0,004 \pm 0,001	ns
Fibras elásticas na AD (%)	24,93 \pm 5,90	19,05 \pm 7,39	0,0073
Altura limitante elástica interna da AD (μm)	2,17 \pm 0,70	1,56 \pm 0,48	<0,0001
VDP (μm^2)	281608,00 \pm 123697,00	117532,00 \pm 25959,00	0,001
Vasos CC (%)	2,44 \pm 1,19	3,50 \pm 2,26	0,0061
Vasos CE (%)	3,08 \pm 1,08	4,73 \pm 1,12	<0,0001
Vasos RD (%)	12,58 \pm 9,84	9,25 \pm 5,78	0,047
Nervos CC (%)	7,37 \pm 4,28	8,01 \pm 3,07	ns
Nervos CE (%)	10,92 \pm 5,27	12,27 \pm 5,14	ns
Nervos RD (%)	22,22 \pm 8,51	16,79 \pm 7,73	<0,0001

Legenda: SC/SC, grupo dieta padrão; VitD/VitD, grupo dieta restrita em vitamina D; AD, artéria dorsal; TM da AD, túnica média da artéria dorsal; VDP, veia dorsal profunda; CC, corpo cavernoso; CE, corpo esponjoso; RD, região dorsal; ns, não significativo. Os dados foram apresentados como média \pm DP. As diferenças entre os grupos foram testadas com o teste-t não pareado. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2018.

5 DISCUSSÃO

A exposição à dieta restrita em vitamina D durante a gestação, lactação e vida pós-natal promoveu alterações significativas na morfologia do pênis na prole adulta tais como: o aumento das porcentagens de tecido conjuntivo, de músculo liso e de vasos nos corpos cavernoso e esponjoso, redução da porcentagem dos espaços sinusoidais no corpo cavernoso, diminuição da porcentagem de fibras elásticas no corpo cavernoso e na túnica albugínea do corpo esponjoso, aumento da proliferação celular no corpo cavernoso, incremento da túnica média da artéria dorsal e diminuição da porcentagem de vasos e nervos na região dorsal. Além disso, também foram observadas alterações metabólicas como a intolerância à glicose, hiperinsulinemia de jejum e aumento da pressão arterial sistólica.

Os resultados observados mostram que a restrição de vitamina D durante os períodos perinatal e pós-natal é um fator importante na indução de modificações penianas que podem contribuir para o desenvolvimento da DE na prole adulta. Contudo, a avaliação da funcionalidade do pênis não foi realizada, essa é uma das limitações do presente estudo.

As alterações metabólicas e na morfologia do pênis evidenciam efeitos deletérios na saúde da prole que podem ser atribuídos à restrição de vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal. Uma vez que, não houve diferenças no ganho ponderal total durante a gestação, glicemia e insulina séricas, ingestão e eficiência alimentar avaliadas nas mães. Ademais, ao nascimento e desmame não houve diferenças na MC, CNA e glicemia entre os filhotes provenientes das mães SC e das mães VitD. Resultados semelhantes também foram encontrados em estudo prévio (NASCIMENTO et al., 2012). Além disso, a dieta restrita em vitamina D, consumida durante seis semanas anteriores ao acasalamento, durante a gestação e lactação, reduziu os níveis séricos de 25(OH)D3 nas mães. Portanto, os filhotes também foram afetados, e mostraram uma redução significativa nos níveis séricos de vitamina D na idade adulta. Esse resultado é uma consequência tanto da exposição à dieta materna sem vitamina D durante a gestação e lactação quanto da dieta recebida do desmame até os 4 meses de idade.

Os grupos não apresentaram diferenças na MC, CNA e glicemia ao nascimento e desmame. Contudo, os animais do grupo VitD/VitD apresentaram-se mais pesados a partir da quarta semana de idade e mantiveram esse comportamento até o final da décima quarta semana. Esse achado evidencia um ganho de MC excessivo na fase inicial da vida. O ganho de MC precoce excessivo está associado ao surgimento tardio de complicações metabólicas e

doenças crônicas (REICHETZEDER et al., 2014). A deficiência de vitamina D durante a gestação está associada com o desenvolvimento de doenças crônicas na prole, incluindo obesidade, HAS e diabetes *mellitus* (REICHETZEDER et al., 2014).

Um dos principais aspectos da programação fetal é o desenvolvimento de características da Smet na idade adulta, tais como a intolerância à glicose e HAS que foram observadas no grupo VitD/VitD (REICHETZEDER et al., 2016). O metabolismo de carboidratos foi alterado. O grupo VitD/VitD apresentou hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia, incremento do HOMA-IR e aumento da ASC do TOTG, o que denota intolerância à glicose. Esses resultados estão em concordância com estudos publicados (MAIA-CECILIANO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2013).

Em roedores, a restrição materna de vitamina D causa RI com hipertrofia da ilhota pancreática (NASCIMENTO et al., 2013), sendo essa hipertrofia uma possível explicação para a hiperinsulinemia observada nos animais do grupo VitD/VitD como um efeito compensatório, na tentativa de manter a homeostase glicêmica. Além disso, outros estudos sugerem que a restrição de vitamina D durante a gestação se reflete sobre o metabolismo de carboidratos ocasionando RI, intolerância à glicose e aumento do NF- κ B que está associado com o aumento da inflamação após o nascimento (ZHANG et al., 2014). O NF- κ B é um potente indutor da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α e a interleucina-6, que atuam como antagonistas à ação da insulina contribuindo para o desenvolvimento da RI (SHOELSON, LEE, GOLDFINE, 2006).

Outra possível explicação para a perda do controle glicêmico, já descrita na literatura, é o aumento da atividade do SRA no pâncreas devido à deficiência de vitamina D levando ao consequente aumento da inflamação e do estresse oxidativo (CHENG, BOUCHER, LEUNG, 2013).

O aumento da PAS observado no grupo VitD/VitD aos três meses de idade está em concordância com um estudo prévio onde a prole exposta a restrição de vitamina D, em períodos críticos do seu desenvolvimento, apresentou elevação da PAS no mesmo período (NASCIMENTO et al., 2012). Os animais do grupo VitD/VitD apresentaram hiperinsulinemia que induz o aumento da retenção renal de sódio, da atividade simpática e estimula a proliferação das células musculares lisas da parede arterial (DIBONA, 2005). Portanto, essa alteração metabólica também está relacionada com a elevação da PAS observada no grupo VitD/VitD.

Atualmente existem poucos estudos discutindo os efeitos da restrição de vitamina D no início da vida e no período pós-natal sobre a morfologia do pênis. O presente estudo

verificou que a restrição de vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal induziu alterações metabólicas que constituem fatores de risco para o desenvolvimento de DE. Barassi e colaboradores (2014) mostraram que pacientes com DE apresentam deficiência de vitamina D, e que baixos níveis de vitamina D promovem disfunção endotelial o que pode aumentar o risco de DE (BARASSI et al., 2014).

O grupo que recebeu a dieta sem vitamina D apresentou hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia e PAS elevada. Essas alterações metabólicas também estão associadas à disfunção endotelial e são fatores de risco para o início da DE (BARASSI et al., 2014). Essas alterações sinalizam a importância de investigar os efeitos da restrição de vitamina D na morfologia do pênis (MUSICI et al., 2015).

Os níveis de vitamina D durante a gestação influenciam as reservas do feto. As proles das mães com hipovitaminose D têm deficiência dessa vitamina durante o desenvolvimento (MULLIGAN et al., 2010). A deficiência de vitamina D está relacionada com a redução dos níveis séricos de testosterona (TAK et al., 2015; WENTZ et al., 2016). As enzimas metabolizadoras e o receptor da vitamina D foram identificados nos testículos, indicando que a vitamina D pode desempenhar um papel na regulação da produção de testosterona (BLOMBERG JENSEN et al., 2010).

As proles que apresentaram baixos níveis séricos de vitamina D tiveram consequentemente baixos níveis séricos de testosterona na idade adulta. A restrição de vitamina D durante os períodos perinatal e pós-natal resultou na diminuição das áreas do corte transversal do pênis, do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea e da túnica albugínea. Foi encontrada uma associação positiva entre os níveis de vitamina D e os níveis séricos de testosterona (NIMPTSCH et al., 2012; VAN BALLEGOIJEN et al., 2013). Hofer e colaboradores (2014) mostraram uma possível ação da vitamina D na regulação da expressão de genes esteroideogênicos e enzimas-chave para a biossíntese dos hormônios sexuais, principalmente da testosterona, que é essencial para a manutenção da morfologia do pênis (HOFER et al., 2014). Portanto, a redução das áreas do corte transversal do pênis, do corpo cavernoso com e sem túnica albugínea e da túnica albugínea pode estar associada à deficiência de vitamina D.

Os animais do grupo VitD/VitD apresentaram aumento da PAS. Estudos têm mostrado que a HAS está associada com a diminuição de fibras elásticas e redução da espessura da túnica albugínea no pênis de animais hipertensos (NUNES, LABAZI, WEBB, 2012). Entretanto, a espessura da túnica albugínea não foi mensurada. Todavia, no grupo VitD/VitD a área da túnica albugínea foi menor quando comparada ao grupo SC/SC.

O aumento na quantidade de tecido conjuntivo no corpo cavernoso e no corpo esponjoso está relacionado à fibrose e DE (CABRINI et al., 2013). O principal evento envolvido no desenvolvimento da fibrose é o aumento da expressão do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (CABRINI et al., 2013). Uma vez que a vitamina D reduz a atividade inflamatória e fibrogênica, a deficiência dessa vitamina pode ter promovido o aumento da fibrogênese. O que pode estar relacionado ao aumento da expressão de TGF β , e consequentemente com o aumento na porcentagem de tecido conjuntivo no corpo cavernoso e no corpo esponjoso observado no grupo VitD/VitD.

Apesar das células em proliferação não terem sido identificadas, sabe-se que os fibroblastos são as células mais comuns no corpo cavernoso dos ratos, estando esses provavelmente envolvidos no aumento da proliferação celular observado no grupo VitD/VitD (PINHEIRO et al., 2000). A vitamina D é um hormônio antiproliferativo (PLUDOWSKI et al., 2013). A restrição dessa vitamina na dieta levou a um aumento na proliferação celular, que foi observado no grupo VitD/VitD. Esse dado corrobora com o aumento da porcentagem do tecido conjuntivo no corpo cavernoso e no corpo esponjoso observado nos animais do grupo VitD/VitD.

O grupo que recebeu a dieta sem vitamina D apresentou hiperglicemia o que induz glicosilação e degradação da elastina. Isso explica a diminuição das fibras elásticas no grupo VitD/VitD (MOSTAFA, SENBEL, MOSTAFA, 2013; SUSIC, 2007). A diminuição das fibras elásticas no corpo cavernoso e na túnica albugínea do corpo esponjoso os tornam menos resistentes à expansão durante a ereção, reduzindo a pressão o que pode causar DE (LUTTRELL et al., 2008). A diminuição da elastina no pênis de pacientes com DE grave foi documentada em um estudo prévio (COSTA et al., 2006).

Já está bem estabelecido na literatura que a deficiência de vitamina D estimula o SRA promovendo aumento da expressão da angiotensina II (ANGII), aumento de espécies reativas de oxigênio e ativação de células inflamatórias. Esse comportamento inflamatório estimula a hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas (PACURARI et al., 2014). Cabe ainda ressaltar que, a vitamina D regula a produção da ONS-e e a síntese do ON (ANDRUKHOVA et al., 2014). Níveis inadequados de vitamina D afetam a biodisponibilidade do ON. O ON inibe o crescimento de células musculares lisas e esse efeito é mediado pela inibição de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (PALMER, FERRIGE, MONCADA, 1987). Esses dois fatores explicam o aumento nas áreas de músculo liso no corpo cavernoso e no corpo esponjoso encontrados no grupo VitD/VitD.

O crescimento dos elementos que constituem o corpo cavernoso, como o tecido conjuntivo e o músculo liso, pode ter resultado em uma redução da área dos espaços sinusoidais no grupo VitD/VitD. As mudanças nesses elementos levam à rigidez trabecular e a alterações nas propriedades mecânicas, que também resultam em DE (COSTA et al., 2006).

A dieta restrita em vitamina D administrada durante a gestação, lactação e vida pós-natal também induziu alterações estruturais e quantitativas nos vasos e nervos do pênis da prole adulta. Os animais que receberam a dieta restrita em vitamina D apresentaram hiperglicemia, hiperinsulinemia, elevação do HOMA-IR e intolerância à glicose. Esses resultados estão em concordância com estudo já publicado (NASCIMENTO et al., 2013).

A hiperinsulinemia que foi observada no grupo VitD/VitD, tem um efeito hipertrófico nas células musculares lisas (HITOMI et al., 2011). Esse fator certamente contribuiu na hipertrofia da túnica média da artéria dorsal. O aumento da área da túnica média teve como consequência a diminuição do lúmen e o aumento da razão entre as áreas da túnica média e do lúmen da artéria dorsal. A densidade nuclear na túnica média da artéria dorsal foi similar em ambos os grupos experimentais o que corrobora a hipertrofia da túnica média da artéria dorsal observada no grupo VitD/VitD. A hipertrofia da túnica média e a redução dos espaços sinusoidais podem diminuir o suprimento sanguíneo para os tecidos penianos, o que pode afetar a hemodinâmica do órgão, levando a DE.

Níveis séricos reduzidos de testosterona estão associados com alterações morfológicas no pênis (SHEN et al., 2003). Na deficiência de vitamina D os níveis de testosterona encontram-se diminuídos (RAFIQ et al., 2016a). A diminuição da área do corte transversal do pênis foi observada em ratos submetidos à restrição de vitamina D nos períodos perinatal e pós-natal (FERNANDES-LIMA et al., 2018). A redução da área da veia dorsal profunda está associada, portanto às alterações nos níveis séricos de testosterona e consequente a dieta restrita em vitamina D.

O grupo VitD/VitD apresentou redução da área ocupada pelos nervos na região dorsal. A dieta sem vitamina D pode ter induzido essas modificações no pênis da prole adulta porque a restrição dessa vitamina altera a expressão de genes relacionados com a síntese de fatores neurotróficos e neuroprotetores (HAWES et al., 2015). Esses fatores apoiam o crescimento, sobrevivência e diferenciação dos neurônios tanto em desenvolvimento como maduros o que poderia explicar a redução da área ocupada pelos nervos na região dorsal observada no grupo VitD/VitD (EYLES et al., 2003; HAWES et al., 2015).

Um estudo prévio mostrou que roedores nascidos de mães que foram submetidas à restrição de vitamina D no período pré-natal e/ou durante a gestação apresentam redução na

expressão de fatores neurotróficos (EYLES et al., 2003). A redução da área ocupada pelos nervos na região dorsal pode ser explicada também pela redução dos níveis séricos de testosterona que está associada a dieta restrita em vitamina D (NIMPTSCH et al., 2012). Armagan e colaboradores (2008) mostraram que a privação de testosterona promove alterações na bainha de mielina e nos axônios do nervo dorsal do pênis indicando degeneração nervosa (ARMAGAN, HATSUSHI, TOSELLI, 2008). Esses dados mostram o papel neuroprotetor da testosterona nos nervos periféricos (ARMAGAN, HATSUSHI, TOSELLI, 2008). Baba e colaboradores (2000) também mostraram que a redução dos níveis séricos de testosterona altera a área ocupada pelas fibras nervosas e induz a diminuição do número de fibras nervosas contendo óxido nítrico sintetase neuronal (ONS-n) nos nervos dorsais (BABA et al., 2000).

A deficiência de vitamina D promove alterações nas isoformas da ONS-e e da ONS-n que comprometem a produção do ON. O ON é um importante vasodilatador e antioxidante. A redução da disponibilidade do ON pode causar lesões oxidativas e destruição dos nervos, explicando a redução da área ocupada por eles na região dorsal no grupo VitD/VitD (ZHONG et al., 2013). Os animais alimentados com a dieta sem vitamina D apresentaram hiperglicemia e RI que são alterações metabólicas associadas com o aumento do estresse oxidativo. A hiperglicemia induz o aumento da formação de produtos finais de glicosilação avançada e diminui a síntese de ON (DARLEY-USMAR, WISEMAN, HALLIWELL, 1995). A hiperglicemia está associada a redução da expressão da ONS-n nos nervos dorsais do pênis de ratos diabéticos (WANG et al., 2015b). A RI também induz estresse oxidativo, lesões nas fibras nervosas e redução de nervos em roedores (ZHONG et al., 2013). Esses dados corroboram a redução da porcentagem de nervos observada na região dorsal no grupo VitD/VitD que apresentou hiperglicemia e RI.

A redução da área ocupada pelos vasos e nervos na região dorsal mostra que os tecidos do pênis foram afetados de formas diferentes pela dieta sem vitamina D, provavelmente devido a heterogeneidade celular. Além disso, esses dados podem sugerir que a dieta restrita em vitamina D pode potencialmente afetar a artéria cavernosa e seus ramos bem como, os nervos cavernosos. Todos esses fatores comprometem a transmissão dos estímulos sexuais do pênis para o cérebro, a transmissão das respostas neurológicas e a velocidade de condução e podem promover a DE (ARMAGAN, HATSUSHI, TOSELLI, 2008).

CONCLUSÃO

A dieta restrita em vitamina D administrada durante os períodos perinatal e pós-natal promoveu o aumento de tecido conjuntivo, músculo liso, redução dos espaços sinusoidais e das fibras elásticas no pênis da prole, o que pode comprometer o fluxo sanguíneo e resistência do tecido e, portanto, prejudicar a ereção. A restrição de vitamina D também induziu alterações na morfologia dos vasos e nervos penianos com diminuição das fibras elásticas, hipertrofia da túnica média da artéria dorsal e redução da área ocupada pelos vasos e nervos na região dorsal. Esses dados podem sugerir que a dieta restrita em vitamina D pode potencialmente afetar a artéria cavernosa e seus ramos bem como, os nervos cavernosos. Assim, o presente estudo mostrou que a vitamina D é um importante micronutriente associado a proteção da citoarquitetura peniana. Os resultados desse trabalho indicam a importância de níveis séricos adequados de vitamina D durante a gestação, lactação e vida pós-natal que são, portanto, fundamentais para manter a integridade da morfologia peniana em animais adultos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, M. et al. Vitamin D deficiency in pregnant women and their neonates. *Global Journal of Health Science*. v. 8, n. 9, p. 83-90, September 2016.
- ADAMS, J. S., HEWISON, M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 523, n. 1, p. 95-102, July 2012.
- AHMAD, S. et al. Maternal micronutrient deficiency leads to alteration in the kidney proteome in rat pups. *Journal of Proteomics*. v. 127, n. Pt A, p. 178-184, September 2015.
- AL MHEID, I. et al. Vitamin D status is associated with arterial stiffness and vascular dysfunction in healthy humans. *Journal of the American College of Cardiology*. v. 58, n. 2, p. 186-192, July 2011.
- ALVAREZ, J. A., ASHRAF, A. Role of vitamin D in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *International Journal of Endocrinology*. v. 2010, p. 351385, January 2010.
- ALWAN, N., HAMAMY, H. Maternal iron status in pregnancy and long-term health outcomes in the offspring. *Journal of Pediatric Genetics*. v. 4, n. 2, p. 111-123, June 2015.
- AMRAEI, M. et al. Effects of vitamin D deficiency on incidence risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*, v. 9, p. 7, February 2018.
- ANDERSSON, K. E., WAGNER, G. Physiology of penile erection. *Physiological Reviews*. v. 75, n. 1, p. 191-236, January 1995.
- ANDRUKHOVA, O. et al. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Molecular Endocrinology*. v. 28, n. 1, p. 53-64, January 2014.
- ARABI, A., EL RASSI, R., EL-HAJJ FULEIHAN, G. Hypovitaminosis D in developing countries-prevalence, risk factors and outcomes. *Nature Reviews Endocrinology*. v. 6, n. 10, p. 550-561, October 2010.
- ARMAGAN, A., HATSUSHI, K., TOSELLI, P. The effects of testosterone deficiency on the structural integrity of the penile dorsal nerve in the rat. *International Journal of Impotence Research*. v. 20, n. 1, p. 73-78, January 2008.
- BABA, K. et al. Delayed testosterone replacement restores nitric oxide synthase-containing nerve fibres and the erectile response in rat penis. *BJU International*. v. 85, n. 7, p. 953-958, May 2000.
- BACA, K. M. et al. Low maternal 25-hydroxyvitamin D concentration increases the risk of severe and mild preeclampsia. *Annals of Epidemiology*. v. 26, n. 12, p. 853-857.e1, December 2016.
- BARASSI, A. et al. Vitamin D and erectile dysfunction. *The Journal of Sexual Medicine*. v. 11, n. 11, p. 2792-2800, November 2014.

BARKER, D. J. The fetal origins of diseases of old age. *European Journal of Clinical Nutrition*. v. 46 Suppl 3, p. S3-S9, October 1992.

BARKER, D. J. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. v. 341, n. 8850, p. 938-941, April 1993.

BARKER, D. J. Outcome of low birthweight. *Hormone Research*. v. 42, n. 4-5, p. 223-230, 1994.

BARKER, D. J. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. v. 311, n. 6998, p. 171-174, July 1995.

BARKER, D. J. In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*. v. 95, n. 2, p. 115-128, August 1998.

BARKER, D. J., CLARK, P. M. Fetal undernutrition and disease in later life. *Reviews of Reproduction*. v. 2, n. 2, p. 105-112, May 1997.

BARKER, D. J., OSMOND, C., LAW, C. M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *Journal of Epidemiology and Community Health*. v. 43, n. 3, p. 237-240, September 1989.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*. v. 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.

BARRA, S., IACONO, F. Echo-doppler-flowmetric assessment of penile dorsal arteries and their role in the erectile mechanism. *European Journal of Radiology*. v. 25, n. 1, p. 67-73, July 1997.

BATTAULT, S. et al. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *European Journal of Nutrition*. v. 52, n. 2, p. 429-441, March 2013.

BECKMAN, J. A., CREAGER, M. A., LIBBY, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. v. 287, n. 19, p. 2570-2581, May 2002.

BIKLE, D. Highlights from the 16th Vitamin D Workshop, San Francisco, CA, June 11-14, 2013. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 144, Part A, p. 1-4, October 2014.

BIKLE, D. D. et al. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 74, n. 6, p. 1966-1971, December 1984.

BIKLE, D. D. et al. Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin d: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 61, n. 5, p. 969-975, November 1985.

BLOMBERG JENSEN, M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Human Reproduction*. v. 25, n. 5, p. 1303-1311, May 2010.

BLOMBERG JENSEN, M. et al. Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven VDR-deficient mouse model: Targeting estrogen signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 377, n. 1–2, p. 93-102, September 2013.

BLUM, M. et al. Pregnancy decreases immunoreactive parathyroid hormone level in rats with chronic renal failure. *Clinical Science*. v. 96, n. 4, p. 427-430, April 1999.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews*. v. 29, n. 6, p. 726-776, October 2008.

BOUILLON, R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nature Reviews Endocrinology*. v. 13, n. 8, p. 466-479, April 2017.

BRANNON, P. M., PICCIANO, M. F. Vitamin D in Pregnancy and Lactation in Humans. *Annual Review of Nutrition*. v. 31, n. 1, p. 89-115, August 2011.

BREZA, J. et al. Detailed anatomy of penile neurovascular structures: surgical significance. *The Journal of Urology*. v. 141, n. 2, p. 437-443, February 1989.

BROUWER-BROLSMA, E. M. et al. Vitamin D: do we get enough? A discussion between vitamin D experts in order to make a step towards the harmonisation of dietary reference intakes for vitamin D across Europe. *Osteoporosis International*. v. 24, n. 5, p. 1567-1577, May 2013.

BURNETT, A. L. et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *The Journal of Urology*. v. 150, n. 1, p. 73-76, July 1993.

CABRINI, M. R. et al. Fibrotic protein expression profiles in penile tissue of patients with erectile dysfunction. *Urology*. v. 82, n. 4, p. 975.e1-975.e6, October 2013.

CANGUVEN, O. et al. Vitamin D treatment improves levels of sexual hormones, metabolic parameters and erectile function in middle-aged vitamin D deficient men. *The Aging Male*. v. 20, n. 1, p. 9-16, January 2017.

CARETTA, N. et al. Hypovitaminosis D is associated with erectile dysfunction in type 2 diabetes. *Endocrine*. v. 53, n. 3, p. 831-838. January 2016.

CHEN, S., LAW, C. S., GARDNER, D. G. Vitamin D-dependent suppression of endothelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through inhibition of CDK2 activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 118, n. 3, p. 135-141, February 2010.

CHEN, Y. P. et al. Fetal and maternal angiotensin (1-7) are associated with preterm birth. *Journal of Hypertension*. v. 32, n. 9, p. 1833-1841, September 2014.

- CHENG, Q., BOUCHER, B. J., LEUNG, P. S. Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. *Diabetologia*. v. 56, n. 3, p. 553-562, March 2013.
- CHIEN, C.Y. et al. Maternal vitamin A deficiency during pregnancy affects vascularized islet development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. v. 36, p. 51-59, October 2016.
- CHUN, R. F. et al. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 144 Pt A, p. 132-137, October 2014.
- CIANFARANI, S., GERMANI, D., BRANCA, F. Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. v. 81, n. 1, p. F71-73, July 1999.
- CLEMENS, T. L. et al. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet*. v. 1, n. 8263, p. 74-76, January 1982.
- COSTA, W. S. et al. Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction. *BJU International*. v. 97, n. 3, p. 567-569, March 2006.
- CROZIER, S. R. et al. Maternal vitamin D status in pregnancy is associated with adiposity in the offspring: findings from the Southampton Women's Survey. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 96, n. 1, p. 57-63, July 2012.
- DAMM, P. et al. Gestational diabetes mellitus and long-term consequences for mother and offspring: a view from Denmark. *Diabetologia*. v. 59, n. 7, p. 1396-1399, July 2016.
- DARLEY-USMAR, V., WISEMAN, H., HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*. v. 369, n. 2-3, p. 131-135, August 1995.
- DEAN, R. C., LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urologic Clinics of North America*. v. 32, n. 4, p. 379-395, November 2005.
- DIBONA, G. F. Physiology in perspective: the wisdom of the body. Neural control of the kidney. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. v. 289, n. 3, p. R633-641, September 2005.
- DOMINGUEZ-SALAS, P. et al. Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nature Communications*. v. 5, p. 3746, April 2014.
- DONERAY, H. et al. Serum vitamin D and vitamin D-binding protein levels in mother-neonate pairs during the lactation period. *Italian Journal of Pediatrics*. v. 44, n. 1, p. 15, January 2018.
- DUSSO, A. S. BROWN, A. J., SLATOPOLSKI, E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiology*. v. 289, n. 1, p. F8-F28, July 2005.
- EVANS, K. N. et al. Vitamin D and placental-decidual function. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. v. 11, n. 5, p. 263-271, July 2004.

EYLES, D. et al. Vitamin D3 and DONG, H. P. et al. The study on the effect of hyperglycemia on offspring fatty tissue metabolism during pregnancy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. v. 21, n. 16, p. 3658-3664, August 2017.

DROR, D. K., ALLEN, L.H. Vitamin D inadequacy in pregnancy: biology, outcomes, and interventions. *Nutrition Reviews*. v. 68, n.8, p.465-477, August 2010.

DUPONT, C. et al. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology*. v. 78, n. 7, p. 1405-1414, October 2012.

DURAN FERNANDEZ-FEIJOO, C. et al. Influence of catch up growth on spatial learning and memory in a mouse model of intrauterine growth restriction. *PLOS ONE*. v. 12, n. 5, p. e0177468, May 2017.

DUSSO, A.S., BROWN, A.J., SLATOPOLSKI, E. Viatmain D. *Am J Physiol Renal Physiology*. v. 289, n.1, p.F8-F28, July 2005.

EYLES, D. et al. Vitamin D and brain development. *Neuroscience*. v. 118, n. 3, p. 641- 653, January 2003.

FARAG, Y. M. K. et al. Vitamin D deficiency is independently associated with greater prevalence of erectile dysfunction: The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2004. *Atherosclerosis*.v. 252, p. 61- 67, September 2016.

FELIX-PATRÍCIO, B. et al. Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: a comparison with normotensive and untreated hypertensive rats. *The Journal of Sexual Medicine*. v. 12, n. 1, p. 39-47, January 2015.

FERNANDES-LIMA, F. et al. Effects of vitamin D restricted diet administered during perinatal and postnatal periods on the penis of Wistar rats. *BioMed Research International*. v. 2018, n. 2018, p. 1-9, April 2018.

FETAHU, I. S., HÖBAUS, J., KÁLLAY, E. Vitamin D and the epigenome. *Frontiers in Physiology*. v. 5, p. 164, April 2014.

FUDGE, N. J., KOVACS, C. S. Pregnancy up-regulates intestinal calcium absorption and skeletal mineralization independently of the vitamin D receptor. *Endocrinology*. v. 151, n. 3, p. 886-895, March 2010.

GAMBLING, L. et al. Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. *The Journal of Physiology*. v. 552, n. 2, p. 603-610, October 2003.

GAO, Q. et al. Epigenetic code and potential epigenetic-based therapies against chronic diseases in developmental origins. *Drug Discovery Today*.v. 19, n.11, p.1744-1750, May 2014.

GAZZARUSO, C. et al. Erectile dysfunction can improve the effectiveness of the current guidelines for the screening for asymptomatic coronary artery disease in diabetes. *Endocrine*. v. 40, n. 2, p. 273-279, October 2011.

GEZMISH, O., BLACK, M. J. Vitamin D deficiency in early life and the potential programming of cardiovascular disease in adulthood. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. v. 6, n. 4, p. 588-603, August 2013.

GINDE, A. A. et al. Vitamin D insufficiency in pregnant and nonpregnant women of childbearing age in the United States. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. v. 202, n. 5, p. 436.e1-e8, May 2010.

GLUCKMAN, P. D. et al. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 104, n. 31, p. 12796-12800, July 2007.

GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A. The consequences of being born small - an adaptive perspective. *Hormone Research*. v. 65 Suppl 3, p. 5-14, January 2006.

GOLDSTEIN, A. M. et al. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. *Urology*. v. 20, n. 3, p. 259-266, September 1982.

GONZALEZ, P. N. et al. Chronic protein restriction in mice impacts placental function and maternal body weight before fetal growth. *PLOS ONE*. v. 11, n. 3, p. e0152227, March 2016.

GREER, F. R. et al. Mineral homeostasis during lactation- relationship to serum 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone and calcitonin. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 36, n. 3, p. 431-437, September 1982.

HAIMI, M., KREMER, R. Vitamin D deficiency/insufficiency from childhood to adulthood: insights from a sunny country. *World Journal of Clinical Pediatrics*. v. 6, n. 1, p. 1-9, February 2017.

HALES, C. N., BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*. v. 60, p. 5-20, January 2001.

HAUSSLER, M. R. et al. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *The Journal of Endocrinology*. v. 154 Suppl, p. S57-S73, September 1997.

HAUSSLER, M. R. et al. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 25, n. 4, p. 543-559, August 2011.

HAWES, J. E. et al. Maternal vitamin D deficiency alters fetal brain development in the BALB/c mouse. *Behavioural Brain Research*. v. 286, p. 192-200, June 2015.

HENRY, H. L. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 25, n. 4, p. 531-41, August 2011.

HILGER, J. et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *British Journal of Nutrition*. v. 111, n. 1, p. 23-45, January 2014.

HITOMI, H. et al. Angiotensin II shifts insulin signaling into vascular remodeling from glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Hypertension*. v. 24, n. 10, p. 1149-1155, October 2011.

HOCHBERG, Z. et al. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocrine Reviews*. v. 32, n. 2, p. 159-224, October 2011.

HOFER, D. et al. Testicular synthesis and vitamin D action. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v. 99, n. 10, p. 3766-3773, October 2014.

HOLICK, M. F. et al. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *Science*. v. 210, n. 4466, p. 203-205, October 1980.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 79, n. 3, p. 362-371, March 2004.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*. v. 357, n. 3, p. 266-281, July 2007.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 96, n. 7, p. 1911-1930, July 2011a.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 96, n. 7, p. 1911-1930, July 2011b.

HOLICK, M. F. The D-lightful vitamin D for child health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. v. 36, n. 1suppl, p. 9S-19S, January 2012a.

HOLICK, M. F. Vitamin D: extraskelatal health. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. v. 38, n. 1, p. 141-160, February 2012b.

HOLICK, M. F. et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v. 97, n. 4, p. 1153-1158, April 2012.

HOLICK, M. F. Nutrition: D-iabetes and D-eath D-efying vitamin D. *Nature Reviews Endocrinology*. v. 8, n. 7, p. 388-390, May 2012c.

HOLICK, M. F. Ultraviolet B radiation: the vitamin D connection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 996, p. 137-154, November 2017.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. v. 18, n. 2, p. 153-165, June 2017b.

HOLICK, M. F., MACLAUGHLIN, J. A., DOPPELT, S. H. Regulation of cutaneous previtamin D3 photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science*. v. 211, n. 4482, p. 590-593, February 1981.

HOLICK, M. F., MATSUOKA, L. Y., WORTSMAN, J. Age, vitamin D, and solar ultraviolet. *Lancet*. v. 2, n. 8671, p. 1104-1105, November 1989.

HOLLIS, B. W. et al. Vitamin D supplementation during pregnancy: Double-blind, randomized clinical trial of safety and effectiveness. *Journal of Bone and Mineral Research*. v. 26, n. 10, p. 2341-2357, October 2011.

HOLLIS, B. W., WAGNER, C. L. Assessment of dietary vitamin D requirements during pregnancy and lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 79, n. 5, p. 717-726, May 2004.

HOLLIS, B. W., WAGNER, C. L. New insights into the vitamin D requirements during pregnancy. *Bone Research*. v. 5, p. 17030, August 2017a.

HOLLIS, B. W., WAGNER, C. L. Vitamin D supplementation during pregnancy: Improvements in birth outcomes and complications through direct genomic alteration. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 453, p. 113-130, September 2017b.

HORWITZ, M. J. et al. Continuous PTH and PTHrP infusion causes suppression of bone formation and discordant effects on 1,25(OH)₂ vitamin D. *Journal of Bone and Mineral Research*. v. 20, n. 10, p. 1792-1803, October 2005.

HOSSEIN-NEZHAD, A., HOLICK, M. F. Optimize dietary intake of vitamin D. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. v. 15, n. 6, p. 567-579, November 2012a.

HOSSEIN-NEZHAD, A., HOLICK, M. F. Optimize dietary intake of vitamin D. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. v. 15, n. 6, p. 567-579, November 2012b.

HOSSEIN-NEZHAD, A., HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clinic Proceedings*. v. 88, n. 7, p. 720-755, July 2013.

HUANG, Y. et al. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. *Journal of Biosciences*. v. 42, n. 2, p. 311-319, June 2017.

IBGE. 2010. *Pesquisa de Orçamentos Familiares POF 2008-2009. Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, p150, 2010.

JAMES, J. L., WHITLEY, G. S., CARTWRIGHT, J. E. Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. *Journal of Pathology*. v. 221, n. 4, p. 363-378, August 2010.

JARJOU, L. M. et al. Effect of calcium supplementation in pregnancy on maternal bone outcomes in women with a low calcium intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 92, n. 2, p. 450-457, August 2010.

JUNGE, K. M. et al. Increased vitamin D levels at birth and in early infancy increase offspring allergy risk-evidence for involvement of epigenetic mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 137, n. 2, p. 610-613, February 2016.

JUNIEN, C., NATHANIELSZ, P. Report on the IASO Stock Conference 2006: early and lifelong environmental epigenomic programming of metabolic syndrome, obesity and type II diabetes. *Obesity reviews*. v. 8, n. 6, p. 487-502, November 2007.

KALKWARF, H. J., SPECKER, B. L., HO, M. Effects of calcium supplementation on calcium homeostasis and bone turnover in lactating women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v. 84, n. 2, p. 464-470, February 1999.

KALUDJEROVIC, J., VIETH, R. Relationship Between Vitamin D during perinatal development and health. *Journal of Midwifery & Women's Health*. v. 55, n. 6, p. 550-560, November 2010.

KELISHADI, R. et al. Low birthweight or rapid catch-up growth: which is more associated with cardiovascular disease and its risk factors in later life? A systematic review and cryptanalysis. *Paediatrics and International Child Health*. v. 35, n. 2, p. 110-123, May 2015.

KERELIUK, S., BRAWERMAN, G., DOLINSKY, V. Maternal macronutrient consumption and the developmental origins of metabolic disease in the offspring. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 18, n. 7, p. 1451, July 2017.

KHOUSHABI, F. et al. Determination of maternal serum zinc, iron, calcium and magnesium during pregnancy in pregnant women and umbilical cord blood and their association with outcome of pregnancy. *Materia Socio-Medica*. v. 28, n. 2, p. 104-107, April 2016.

KOVACS, C. S. Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 88, n. 2, p. 520S-528S, August 2008.

KOVACS, C. S. Calcium and bone metabolism disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. v. 40, n. 4, p. 795-826, December 2011.

KOVACS, C. S. The role of vitamin D in pregnancy and lactation: insights from animal models and clinical studies. *Annual Review of Nutrition*. v. 32, n. 1, p. 97-123, August 2012.

KOVACS, C. S. Maternal mineral and bone metabolism during pregnancy, lactation, and post-weaning recovery. *Physiological Reviews*. v. 96, n. 2, p. 449-547, April 2016.

KOVACS, C. S., KRONENBERG, H. M. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocrine Reviews*. v. 18, n. 6, p. 832-872, December 1997.

KOVANECZ, I. et al. Implanted muscle-derived stem cells ameliorate erectile dysfunction in a rat model of type 2 diabetes, but their repair capacity is impaired by their prior exposure to the diabetic milieu. *Journal of Sexual Medicine*. v. 13, n. 5, p. 786-797, May 2016.

KRANE, R. J., GOLDSTEIN, I., DE TEJADA, I. S. Impotence. *New England Journal of Medicine*. v. 321, n. 24, p. 1648-1659, December 1989.

LANGLEY-EVANS, S. C., GARDNER, D. S., JACKSON, A. A. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Nutrition*. v. 126, n. 6, p. 1578-1585, June 1996.

LAPILLONNE, A. Vitamin D deficiency during pregnancy may impair maternal and fetal outcomes. *Medical Hypotheses*. v. 74, n. 1, p. 71-75, January 2010.

LIBON, F. et al. Sunscreens block cutaneous vitamin D production with only a minimal effect on circulating 25-hydroxyvitamin D. *Archives of Osteoporosis*. v. 12, n. 1, p. 66, December 2017.

LIPS, P. Worldwide status of vitamin D nutrition. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 121, n. 1-2, p. 297-300, July 2010.

LIU, N. Q. et al. Vitamin D and the regulation of placental inflammation. *Journal of Immunology*. v. 186, n. 10, p. 5968-5974, May 2011.

LOBAUGH, B. et al. Regulation of serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in lactating rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. v. 259, n. 5, p. E665-E671, November 1990.

LOBAUGH, B. et al. Intensity of lactation modulates renal 1 alpha-hydroxylase and serum 1,25(OH)₂D in rats. *American Journal of Physiology*. v. 262, n. 6 Pt 1, p. E840-E844, June 1992.

LOBAUGH, B. et al. Parathyroidectomy abolishes the increase of renal 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase in lactating rats. *American Journal of Physiology*. v. 264, n. 6 Pt 1, p. E981-E985, June 1993.

LU, M. et al. Association between vitamin D status and the risk of gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. v. 293, n. 5, p. 959-966, May 2016.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium*. v. 156, p. 38-50, January 1991.

LUTTRELL, I. P. et al. Erectile dysfunction in the type II diabetic db/db mouse: impaired venoocclusion with altered cavernosal vasoreactivity and matrix. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. v. 294, n. 5, p. H2204-2211, May 2008.

MAIA-CECILIANO, T. C. et al. Maternal vitamin D-restricted diet has consequences in the formation of pancreatic islet/insulin-signaling in the adult offspring of mice. *Endocrine*. v. 54, n. 1, p. 60-69, October 2016.

MAJOR, G. C. et al. Recent developments in calcium-related obesity research. *Obesity Reviews*. v. 9, n. 5, p. 428-445, September 2008.

MAKA, N. et al. Vitamin D deficiency during pregnancy and lactation stimulates nephrogenesis in rat offspring. *Pediatric Nephrology*. v. 23, n. 1, p. 55-61, January 2008.

MANDARINO, N. R. et al. Is vitamin D deficiency a new risk factor for cardiovascular disease? *The Open Cardiovascular Medicine Journal*. v. 9, p. 40-49, January 2015.

MARCHESI, C., PARADIS, P., SCHIFFRIN, E. L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 29, n. 7, p. 367-374, July 2008.

MARTIN-GRONERT, M. S., OZANNE, S. E. Mechanisms linking suboptimal early nutrition and increased risk of type 2 diabetes and obesity. *The Journal of Nutrition*. v. 140, n. 3, p. 662-666, March 2010.

MARTÍNEZ-SALAMANCA, J. I. et al. Physiology of erection. *Archivos Espanoles de Urologia*. v. 63, n. 8, p. 581-588, October 2010.

MARWAHA, R. et al. Role of parathyroid hormone in determination of fat mass in patients with Vitamin D deficiency. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. v. 21, n. 6, p. 848-853, November 2017.

MASON, R. S., SEQUEIRA, V. B., GORDON-THOMSON, C. Vitamin D: the light side of sunshine. *European Journal of Clinical Nutrition*. v. 65, n. 9, p. 986-993, September 2011.

MATSUOKA, L. Y. et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v. 64, n. 6, p. 1165-1168, June 1987.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. v. 28, n. 7, p. 412-419, July 1985.

MCCANCE, R. A. Food, growth, and time. *Lancet*. v. 2, n. 7258, p. 671-676, October 1962.

MCKAY, J. A. et al. Maternal folate depletion during early development and high fat feeding from weaning elicit similar changes in gene expression, but not in DNA methylation, in adult offspring. *Molecular Nutrition & Food Research*. v. 61, n. 4, p. 1600713, April 2017.

MCMILLEN, I. C., ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological Reviews*. v. 85, n. 2, p. 571-633, April 2005.

MEAS, T. Fetal origins of insulin resistance and the metabolic syndrome: A key role for adipose tissue? *Diabetes & Metabolism*. v. 36, n. 1, p. 11-20, February 2010.

MEEMS, L. M. G. et al. Parental vitamin D deficiency during pregnancy is associated with increased blood pressure in offspring via Panx1 hypermethylation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. v. 311, n. 6, p. H1459-H1469, December 2016.

MELDRUM, D. R. et al. The link between erectile and cardiovascular health: the canary in the coal mine. *American Journal of Cardiology*. v. 108, n. 4, p. 599-606, August 2011.

- MILMAN, N., HVAS, A. M., BERGHOLT, T. Vitamin D status during normal pregnancy and postpartum. A longitudinal study in 141 Danish women. *Journal of Perinatal Medicine*. v. 40, n. 1, p. 57-61, November 2011.
- MITHAL, A. et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*. v. 20, n. 11, p. 1807-1820, November 2009.
- MOLINARI, C. et al. $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. v. 27, n. 6, p. 661-668, January 2011.
- MØLLER, U. K. et al. Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. *European Journal of Clinical Nutrition*. v. 66, n. 7, p. 862-868, July 2012.
- MØLLER, U. K. et al. Changes in calcitropic hormones, bone markers and insulin-like growth factor I (IGF-I) during pregnancy and postpartum: a controlled cohort study. *Osteoporosis International*. v. 24, n. 4, p. 1307-1320, April 2013.
- MOSEKILDE, L. Vitamin D and the elderly. *Clinical Endocrinology*. v. 62, n. 3, p. 265-281, March 2005.
- MOSTAFA, M. E., SENBEL, A. M., MOSTAFA, T. Effect of Chronic Low-dose Tadalafil on Penile Cavernous Tissues in Diabetic Rats. *Urology*. v. 81, n. 6, p. 1253-1260, June 2013.
- MULLIGAN, M. L. et al. Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. v. 202, n. 5, p. 429.e1-e9, May 2010.
- MUSICKI, B. et al. Basic science evidence for the link between erectile dysfunction and cardiometabolic dysfunction. *The Journal of Sexual Medicine*. v. 12, n. 12, p. 2233-2255, December 2015.
- NARCHI, H. et al. Maternal vitamin D status throughout and after pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. v. 30, n. 2, p. 137-142, February 2010.
- NASCIMENTO, F. A. M. et al. Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring. *PloS One*. v. 7, n. 8, p. e41740, January 2012.
- NASCIMENTO, F. A. M. et al. Transgenerational effects on the liver and pancreas resulting from maternal vitamin D restriction in mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. v. 59, n. 5, p. 367-374, January 2013.
- NAVARRO, E. et al. Prenatal nutrition and the risk of adult obesity: Long-term effects of nutrition on epigenetic mechanisms regulating gene expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*. v. 39, p. 1-14, January 2017.
- NEED, A. G. et al. Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *The American journal of Clinical Nutrition*. v. 58, n. 6, p. 882-885, December 1993.

NI, W. et al. Elimination of vitamin D receptor in vascular endothelial cells alters vascular function. *Hypertension*. v. 64, n. 6, p. 1290-1298, December 2014.

NIMPTSCH, K. et al. Association between plasma 25-OH vitamin D and testosterone levels in men. *Clinical Endocrinology*. v. 77, n. 1, p. 106-112, July 2012.

NOVAKOVIC, B. et al. Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. *Journal of Biological Chemistry*. v. 284, n. 22, p. 14838-14848, May 2009.

NOVAKOVIC, B. et al. Maternal vitamin D predominates over genetic factors in determining neonatal circulating vitamin D concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 96, n. 1, p. 188-195, July 2012.

NUNES, K. P., LABAZI, H.; WEBB, R. C. New insights into hypertension-associated erectile dysfunction. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. v. 21, n. 2, p. 163-170, March 2012.

OLMOS-ORTIZ, A. et al. Regulation of calcitriol biosynthesis and activity: focus on gestational vitamin D deficiency and adverse pregnancy outcomes. *Nutrients*. v. 7, n. 1, p. 443-480, January 2015.

PACURARI, M. et al. The renin-angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *International Journal of Inflammation*. v. 2014, p. 689360, January 2014.

PAINTER, R. C. et al. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 84, n. 2, p. 322-327, August 2006.

PALMER, R. M., FERRIGE, A. G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. v. 327, n. 6122, p. 524-526, January 1987.

PEREIRA-SANTOS, M. et al. Epidemiology of vitamin D insufficiency and deficiency in a population in a sunny country: geospatial meta-analysis in Brazil. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v. 2018, n.8, p. 1-8, February 2018.

PIKE, J. W. et al. Dynamic changes in circulating 1,25-dihydroxyvitamin D during reproduction in rats. *Science*. v. 204, n. 4400, p. 1427-1429, June 1979.

PILZ, S. et al. Effect of vitamin D supplementation on testosterone levels in men. *Hormone and Metabolic Research*. v. 43, n. 3, p. 223-225, March 2011.

PINHEIRO, A. C. et al. Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis. *The Journal of Urology*. v. 164, n. 5, p. 1802-1806, November 2000.

PINTO-FOCHI, M. E. et al. A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. *Reproduction*. v. 152, n. 6, p. 795-808, December 2016.

PLUDOWSKI, P. et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality- a review of recent evidence. *Autoimmunity Reviews*. v. 12, n. 10, p. 976-989, August 2013.

POURSHAHIDI, L. K. Vitamin D and obesity: current perspectives and future directions. *Proceedings of the Nutrition Society*. v. 74, n. 2, p. 115-124, May 2015.

PUECH-LEÃO, P. et al. Leakage through the crural edge of corpus cavernosum. Diagnosis and treatment. *European Urology*. v. 13, n. 3, p. 163-165, 1987.

PYTLOWANCIV, E. Z. et al. Differential ontogenetic exposure to obesogenic environment induces hyperproliferative status and nuclear receptors imbalance in the rat prostate at adulthood. *The Prostate*. v. 76, n. 7, p. 662-678, May 2016.

RAFIQ, R. et al. Associations of vitamin D status and vitamin D-related polymorphisms with sex hormones in older men. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 164, p. 11-17, November 2016a.

RAFIQ, R. et al. Associations of vitamin D status and vitamin D-related polymorphisms with sex hormones in older men. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 164, p. 11-17, November 2016b.

RAMOS, C. da F. et al. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian Journal of Andrology*. v. 12, n. 2, p. 180-185, March 2010.

RAVELLI, A. C. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*. v. 351, n. 9097, p. 173-177, January 1998.

RAVELLI, A. C. et al. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 70, n. 5, p. 811-816, November 1999.

RAVELLI, G. P., STEIN, Z. A., SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England Journal of Medicine*. v. 295, n. 7, p. 349-353, August 1976.

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*. v. 123, n. 11, p. 1939-1951, November 1993.

REICHETZEDER, C. et al. Maternal vitamin D deficiency and fetal programming - lessons learned from humans and mice. *Kidney and Blood Pressure Research*. v. 39, n. 4, p. 315-329, January 2014.

REICHETZEDER, C. et al. Developmental origins of disease-crisis precipitates change. *Cellular Physiology and Biochemistry*. v. 39, n. 3, p. 919-938, August 2016.

REMACLE, C. et al. Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 94, n. 6 Suppl, p. 1846S-1852S, December 2011.

RITCHIE, L. D. et al. A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 67, n. 4, p. 693-701, April 1998.

ROBEY, R. B., CRANE-GODREAU, M. A. "Does sunscreen promote hypertension?" and other questions. Novel interactions between vitamin D and the renin-angiotensin axis. Focus on "The world pandemic of vitamin D deficiency could possibly be explained by cellular inflammatory response activity induced by renin-angiotensin system". *American Journal of Physiology Cell Physiology*. v. 304, n. 11, p. C1040-C1041, June 2013.

ROBINSON, P. D. et al. The re-emerging burden of rickets: a decade of experience from Sydney. *Archives of Disease in Childhood*. v. 91, n. 7, p. 564-568, July 2006.

ROCHEL, N. et al. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Molecular Cell*. v. 5, n. 1, p. 173-179, January 2000.

ROSARIO, J. F., GOMEZ, M. P., ANBU, P. Does the maternal micronutrient deficiency (copper or zinc or vitamin E) modulate the expression of placental 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase-2 per se predispose offspring to insulin resistance and hypertension in later life? *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 52, n. 4, p. 355-365, October-December 2008.

ROSS, A.C., TAYLOR, C. L., YAKITINE, A.L., D. V. H. *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

SAFADI, F. F. et al. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *Journal of Clinical Investigation*. v. 103, n. 2, p. 239-251, January 1999.

SARAF, R. et al. Global summary of maternal and newborn vitamin D status - a systematic review. *Maternal & Child Nutrition*. v. 12, n. 4, p. 647-668, October 2016.

SCHLEICHER, R. L. et al. National estimates of serum total 25-hydroxyvitamin D and metabolite concentrations measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the US population during 2007-2010. *Journal of Nutrition*. v. 146, n. 5, p. 1051-1061, May 2016.

SHEN, Z. J. et al. Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian Journal of Andrology*. v. 5, n. 1, p. 33-36, March 2003.

SHIN, J. S. et al. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. v. 31, n. 12, p. 1027-1034, December 2010.

SHOELSON, S. E., LEE, J., GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. v. 116, n. 7, p. 1793-17801, July 2006.

SIMMONDS, C. S., KOVACS, C. S. Role of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) in regulating mineral homeostasis during fetal development. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. v. 20, n. 3, p. 235-273, 2010.

SOMJEN, D. et al. 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation*. v. 111, n. 13, p. 1666-1671, April 2005.

SORENSEN, M. B., GRANT, W. B. Does vitamin D deficiency contribute to erectile dysfunction? *Dermato-Endocrinology*. v. 4, n. 2, p. 128-136, April 2012.

SPRINGBETT, P., BUGLASS, S., YOUNG, A. R. Photoprotection and vitamin D status. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 101, n. 2, p. 160-168, November 2010.

STANNER, S. A. et al. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ*. v. 315, n. 7119, p. 1342-1348, November 1997.

STANNER, S. A., YUDKIN, J. S. Fetal programming and the Leningrad Siege study. *Twin Research*. v. 4, n. 5, p. 287-292, October 2001.

STEFANSKA, B. et al. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components-the implications in cancer prevention. *British Journal of Pharmacology*. v. 167, n. 2, p. 279-297, September 2012.

SUN, X.; ZEMEL, M. B. 1Alpha, 25-dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *International Journal of Obesity*. v. 32, n. 8, p. 1305-1311, August 2008.

SUSIC, D. Cross-link breakers as a new therapeutic approach to cardiovascular disease. *Biochemical Society Transactions*. v. 35, n. Pt 5, p. 853-856, November 2007.

TAIN, Y. L., CHAN, J., HSU, C. N. Maternal fructose intake affects transcriptome changes and programmed hypertension in offspring in later life. *Nutrients*. v. 8, n. 12, p. E757, November 2016.

TAK, Y. J. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and testosterone deficiency in middle-aged Korean men: a cross-sectional study. *Asian Journal of Andrology*. v. 17, n. 2, p. 324-328, March-April 2015.

TALIB, R. A., KHALAFALLA, K., CANGUVEN, O. The role of vitamin D supplementation on erectile function. *Turkish Journal of Urology*. v. 43, n. 2, p. 105-111, May 2017.

THORVE, V. S. et al. Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. *Journal of Diabetes and its Complications*. v. 25, n. 2, p. 129-136, January 2011.

TRAISH, A. M., GOLDSTEIN, I., KIM, N. N. Testosterone and erectile function: from basic research to a new clinical paradigm for managing men with androgen insufficiency and erectile dysfunction. *European Urology*. v. 52, n. 1, p. 54-70, July 2007.

TRIUNFO, S., LANZONE, A., LINDQVIST, P. G. Low maternal circulating levels of vitamin D as potential determinant in the development of gestational diabetes mellitus. *Journal of Endocrinological Investigation*. v. 40, n. 10, p. 1049-1059, October 2017.

VAN ABEELLEN, A. F. M. et al. Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes*. v. 61, n. 9, p. 2255-2260, September 2012.

VAN BALLEGOOIJEN, A. J. et al. Serum parathyroid hormone in relation to all-cause and cardiovascular mortality: the Hoorn study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v. 98, n. 4, p. E638- E645, April 2013.

VAN SCHOOR, N. M., LIPS, P. Worldwide vitamin D status. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 25, n. 4, p. 671-680, August 2011.

VIEYRA-REYES, P. et al. An iron-deficient diet during development induces oxidative stress in relation to age and gender in Wistar rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. v. 73, n. 1, p. 99-110, February 2017.

VILMANN, H., VILMANN, A. Os penis of the rat. II. Morphology of the mature bone. *Anatomischer Anzeiger*. v. 146, n. 5, p. 483-493, 1979.

VON WEBSKY, K. et al. Impact of vitamin D on pregnancy-related disorders and on offspring outcome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 180, p. 51-64, June 2018.

WACKER, M., HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D. *Dermato-Endocrinology*. v. 5, n. 1, p. 51-108, January 2013.

WAGNER, C. L. et al. Vitamin D and its role during pregnancy in attaining optimal health of mother and fetus. *Nutrients*. v. 4, n. 3, p. 208-230, March 2012a.

WAGNER, C. L. et al. Vitamin D and its role during pregnancy in attaining optimal health of mother and fetus. *Nutrients*. v. 4, n. 12, p. 208-230, March 2012b.

WAGNER, C. L. et al. The role of vitamin D in pregnancy and lactation: emerging concepts. *Women's Health*. v. 8, n. 3, p. 323-340, May 2012c.

WANG, H. et al. Maternal zinc deficiency during pregnancy elevates the risks of fetal growth restriction: a population-based birth cohort study. *Scientific Reports*. v. 5, n. 1, p. 11262, June 2015a.

WANG, H. et al. Maternal early pregnancy vitamin D status in relation to low birth weight and small-for-gestational-age offspring. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 175, p. 146-150, January 2018.

WANG, L. et al. Antioxidant icariside II combined with insulin restores erectile function in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. v. 19, n. 5, p. 960-969, May 2015b.

- WEBB, A. R., KLINE, L., HOLICK, M. F. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: Exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 67, n. 2, p. 373-378, August 1988.
- WEISMAN, Y. et al. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in vitro synthesis by human decidua and placenta. *Nature*. v. 281, n. 5729, p. 317-319, September 1979.
- WENTZ, L. M. et al. Vitamin D Correlation with Testosterone Concentration in Male US Soldiers and Veterans. *FASEB Journal 29.1 Supplement (2015)*: 733-735, v. 24, n. 3, July 2016.
- WILLIAMS, S. B. et al. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*. v. 27, n. 3, p. 567-574, March 1996.
- WILSON, S. G. et al. Serum free 1,25-dihydroxyvitamin D and the free 1,25-dihydroxyvitamin D index during a longitudinal study of human pregnancy and lactation. *Clinical Endocrinology*. v. 32, n. 5, p. 613-622, May 1990.
- WOOD, R. J. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutrition Reviews*. v. 66, n. 1, p. 40-46, January 2008.
- WORTSMAN, J. et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 72, n. 3, p. 690-693, September 2000.
- WU, L. et al. High sucrose intake during gestation increases angiotensin II type 1 receptor-mediated vascular contractility associated with epigenetic alterations in aged offspring rats. *Peptides*. v. 86, p. 133-144, December 2016.
- YIN, G. N. et al. The pericyte as a cellular regulator of penile erection and a novel therapeutic target for erectile dysfunction. *Scientific Reports*. v. 5, n. 1, p. 10891, June 2015.
- YIN, G. N. et al. Penile neurovascular structure revisited: immunohistochemical studies with three-dimensional reconstruction. *Andrology*. v. 5, n. 5, p. 964-970, September 2017.
- YOUNG, B. E. et al. Placental vitamin D receptor (VDR) expression is related to neonatal vitamin D status, placental calcium transfer, and fetal bone length in pregnant adolescents. *FASEB Journal*. v. 28, n. 5, p. 2029-2037, May 2014.
- YUDKIN, J. S., STANNER, S. Prenatal exposure to famine and health in later life. *Lancet*. v. 351, n. 9112, p. 1361-1362, May 1998.
- ZEHNDER, D. et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 86, n. 2, p. 888-894, February 2001.
- ZEHNDER, D. et al. The ontogeny of 25-hydroxyvitamin D(3) 1 α -hydroxylase expression in human placenta and decidua. *American Journal of Pathology*. v. 161, n. 1, p. 105-114, July 2002.

ZHANG, H. et al. Maternal vitamin D deficiency during pregnancy results in insulin resistance in rat offspring, which is associated with inflammation and *I κ b α* methylation. *Diabetologia*. v. 57, n. 10, p. 2165-2172, July 2014.

ZHANG, M. X. et al. Vitamin D deficiency increases the risk of gestational diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients*. v. 7, n. 10, p. 8366-8375, October 2015.

ZHONG, M. et al. Neural and vascular alterations in the penis of diabetic rats with erectile dysfunction. *Life Science Journal*. v. 10, n. 2, p. 2792-2797, 2013.

ZHOU, Y. et al. DNA methylation levels of CYP2R1 and CYP24A1 predict vitamin D response variation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 144 Pt A, p. 207-214, October 2014.

ZITTERMANN, A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. v. 92, n. 1, p. 39-48, September 2006.

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/034/2014 sobre "Deficiência de vitamina D no período perinatal e/ou pós-natal sobre o sistema urogenital de ratos Wistar" sob a responsabilidade de Fernanda Amorim de Moraes Nascimento, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 30/09/2014. Este certificado expira em 30/09/2018.

Rio de Janeiro, 30 de Setembro de 2014.

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Elaine de Oliveira
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Dr. Sylvio Claudio Neto
CEUA/IBRAG/UERJ

/ass

ANEXO B - Comprovação de submissão do 1º artigo científico

BioMed Research International <mariam.youssef@hindawi.com>

para manogallo.c, bm.gregorio, fernanda.amorim, wscosta, sampaio.uerj, mim

20/11/2017 ☆



Dear Dr. GALLO,

The Research Article titled "EFFECTS OF VITAMIN D RESTRICTED DIET ADMINISTERED DURING PERINATAL AND POSTNATAL PERIODS ON THE PENIS OF WISTAR RATS," by Flavia Fernandes-Lima, Bianca Martins Gregorio, Fernanda Braga, Waldemar S. Costa, CARLA GALLO and francisco sampaio has been received and assigned the number 6030646.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to BioMed Research International.

ANEXO C - Formato final do 1^o artigo científico submetido

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2018, Article ID 6030646, 9 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/6030646>



Research Article

Effects of Vitamin D Restricted Diet Administered during Perinatal and Postnatal Periods on the Penis of Wistar Rats

Flávia Fernandes-Lima,¹ Bianca M. Gregório,¹ Fernanda A. M. Nascimento,^{1,2}
Waldemar S. Costa,¹ Carla B. M. Gallo,¹ and Francisco J. B. Sampaio¹

¹Urogenital Research Unit, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Carla B. M. Gallo; marogallo@gmail.com

Received 21 November 2017; Accepted 19 March 2018; Published 23 April 2018

Academic Editor: Marlene Benchimol

Copyright © 2018 Flávia Fernandes-Lima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Vitamin D deficiency is common in pregnant women and infants. The present study aimed to investigate the effects of vitamin D restricted diet on the Wistar rats offspring penis morphology. Mother rats received either standard diet (SC) or vitamin D restricted (VitD) diet. At birth, offspring were divided into SC/SC (from SC mothers, fed with SC diet) and VitD/VitD (from VitD mothers, fed with VitD diet). After euthanasia the penises were processed for histomorphometric analysis. The VitD/VitD offspring displayed metabolic changes and reduction in the cross-sectional area of the penis, corpus cavernosum, tunica albuginea, and increased area of the corpus spongiosum. The connective tissue, smooth muscle, and cell proliferation percentages were greater in the corpus cavernosum and corpus spongiosum in the VitD/VitD offspring. The percentages of sinusoidal spaces and elastic fibers in the corpus cavernosum decreased. The elastic fibers in the tunica albuginea of the corpus spongiosum in the VitD/VitD offspring were reduced. Vitamin D restriction during perinatal and postnatal periods induced metabolic and structural changes and represented important risk factors for erectile dysfunction in the penis of the adult offspring. These findings suggest that vitamin D is an important micronutrient in maintaining the cytoarchitecture of the penis.

1. Introduction

Vitamin D deficiency in pregnant women and infants is a global health problem [1]. Low maternal serum vitamin D levels is associated with adverse outcomes of pregnancy such as intrauterine growth restriction and neonatal low birth weight [2].

Micronutrients such as many vitamins regulate the expression of key genes involved in growth and proliferation and in the functional attributes of specific organs [3]. The literature points out that the micronutrient imbalance may also affect the development of the androgen-dependent organs, such as penis [4].

The formation of the penis is dependent on androgens hormones during the development of the reproductive system. In addition, androgens must act during the late fetal period and/or postnatal period to foster growth of the penis [5].

Vit D acts on calcium and phosphorus homeostasis, as well as on bone metabolism, and performs other extra bone functions [6–8]. The active form of vit D is produced primarily in the kidneys and circulates in the blood and binds to its receptor present in the cells of almost all tissues [9]. Currently, vit D is considered a potent steroid hormone that promotes effects on the various organs, including the penis [10, 11].

The biological activities of vit D are mediated by its receptor (VDR). VDR and the enzymes that metabolize vit D are expressed in the testis, sperm, epididymis, seminal vesicle, prostate, and kidney, which indicates the importance of this vitamin in the urogenital system and in reproduction [12, 13]. Vit D is considered an essential micronutrient, important for maintaining vital functions, including penile erection [14].

Vit D deficiency is associated with atherogenic dyslipidemia, diabetes mellitus, and reduced serum testosterone levels that are associated with endothelial dysfunction and are

classic risk factors for the onset of erectile dysfunction [15]. These metabolic changes are associated with venous leakage of the corpus cavernosum, with damage to endothelial cells, and with decreased production of nitric oxide (NO), which is essential for maintaining erection [15, 16]. Vit D deficiency stimulates the renin-angiotensin system, which may increase the expression of angiotensin II. This induces inflammatory response and vascular smooth muscle hypertrophy. In addition, vit D regulates the synthesis of endothelial nitric oxide synthase and NO [16].

Reduction of NO production prevents vasodilation and causes atherosclerosis by promoting vasoconstriction, vascular smooth muscle growth, decreased fibrinolysis, and thrombosis [17, 18].

Hypovitaminosis D accentuates risk factors for cardiovascular diseases and may lead to erectile dysfunction (ED) [19, 20]. It is possible to make an association of ED with the first symptoms of atherosclerosis and to even point ED as one of the possible predictors of cardiovascular diseases [21, 22].

Barassi et al. (2014) showed that patients with ED have vit D deficiency and that this condition is more frequent in patients with atherogenic etiology for ED [23]. Low levels of vit D may increase the risk of ED by promoting endothelial dysfunction [23].

Vit D has antiproliferative influence on smooth muscle cells which indicates antiatherosclerotic properties, protecting from ED [24, 25].

Vit D deficiency is associated with reduced serum levels of testosterone. Individuals with vit D deficiency presented reduced serum testosterone, increased thickness of the cavernous artery tunica, decreased artery flow, and decreased erectile function [15].

With regard to the rodent penis, used for our study, it is known that they present different morphology from the human penis. The trabeculae of the corpora cavernosa are the main tissue structures of the penis involved in erection. They are composed of smooth and endothelial muscle cells, an extracellular matrix composed of collagen, elastic system fibers, and sinusoidal spaces [26, 27]. These spaces are filled by blood for intumescence and penile rigidity during erection.

The corpus cavernosum of the rat differs from that of humans by having smaller amounts of smooth muscle cells and elastic system fibers and larger amounts of collagen [27]. The smooth muscle of the rat's penis is located in the perisinusoidal region, while in man the smooth muscle is mixed with connective and elastic system fibers to form the trabeculae of the corpora cavernosa [28].

Although the rat penis presents these differences when compared to the penis of humans, several studies consider a suitable model to investigate the morphological changes resulting from pathological conditions [29, 30].

Vitamin D is an essential factor for a normal development; however, little is known regarding how vitamin D restriction during the perinatal and postnatal periods affects the growth of the offspring's penises. Therefore, the aim of this study was to evaluate the changes in morphology of the penis caused by restriction in vitamin D during the perinatal and postnatal periods in adult Wistar rats.

2. Material and Methods

The protocol was approved by the Ethics Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the State University of Rio de Janeiro (Protocol CEUA/034/2014). The animals were placed in an environment with incandescent light, with no ultraviolet radiation, to prevent vitamin D synthesis in the skin.

Female Wistar rats, aged six weeks, were split into two groups: standard diet (SC, with vitamin D3, 0.25 g/kg, $n = 8$) and vitamin D restricted diet (VitD, without vitamin D3, 0.00 g/kg, $n = 9$). The diets were prepared in accordance with the nutritional recommendations for rodents by the American Institute of Nutrition (Table 1) [31].

The females had received the diets for six weeks before gestation, and, hence, vitamin D insufficiency or deficiency was achieved throughout gestation and lactation [32]. SC and VitD females were mated with males who received the SC diet. Females were fasting for 4 h for glucose assessment in the last gestational week [33]. An incision on the animal's tail was made, and its blood was obtained by milking. The measurement of serum glucose was obtained with a glucometer (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brazil).

The diets were administered to the mothers until the end of the weaning. Body mass (BM) was evaluated weekly. Food and energy intake were recorded during pregnancy and lactation daily. Further, daily energy intake was estimated by multiplying the amount of feed intake in grams by the total energy of the diet in kilojoules.

The litter size at birth was randomly adjusted to six pups (three males and three females) per lactating mother to ensure adequate nutrition. The pups were divided into two groups: SC/SC (from SC mothers, fed SC diet from weaning (21 days) to 4 months of age, $n = 8$) and VitD/VitD (from VitD mothers, maintaining a weaning VitD diet to 4 months of age, $n = 9$).

The BM and nasoanal length were recorded weekly from birth to 4 months of age. Food and energy intake were monitored daily. The energy intake was calculated as previously described.

Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly from the third to the fourth month of age, using plethysmography of the caudal artery (Insight, São Paulo, SP, Brazil).

At the end of the lactation period, euthanasia of mothers ($n = 5$ per group) was performed in a carbon dioxide gas chamber. Blood samples were collected from the right atrium for biochemical evaluations.

At birth, the pups ($n = 5$ per group) were sacrificed by decapitation and serum glucose was measured using a glucometer.

At 4 months of age, the offspring were fasted for 12h, and they were placed in the carbon dioxide gas chamber. The blood samples were collected as previously described for biochemical analysis. A fasting blood glucose was measured with a glucometer (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brazil); the penis was collected; and cross sections of the mid shaft were made to conduct histological procedures.

Following blood collection, plasma was separated by centrifugation (12,000 rpm for 15 min) at room temperature

TABLE 1: Composition of the diets.

Nutrient (g/Kg)	SC AIN93G	VitD AIN93G	SC AIN93M	VitD AIN93M
Corn starch	397.48	397.48	465.69	465.69
Casein	200.00	200.00	140.00	140.00
Dextrinized starch	132.00	132.00	155.00	155.00
Sucrose	100.00	100.00	100.00	100.00
Soya bean oil	70.00	70.00	40.00	40.00
Fiber	50.00	50.00	50.00	50.00
L cystine	3.00	3.00	1.80	1.80
Choline	2.50	2.50	2.50	2.50
Antioxidant	0.014	0.014	0.008	0.008
Mineral mix	35.00	35.00	35.00	35.00
Calcium carbonate	357.00	357.00	357.00	357.00
Vitamin mix	10.00	10.00	10.00	10.00
Vitamin D3	0.25	0.00	0.25	0.00

All the nutrients corresponded to the recommendations of American Institute of Nutrition for rodents. SC, standard diet; Vit D, vitamin D restricted diet; AIN93G, diet for growth, pregnancy, and lactation; AIN93M, diet for adult maintenance.

and stored at -80°C . The serum analyses of 25 hydroxyvitamin D3 (25 OHD3) and insulin were performed in duplicate by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ($n = 8$ animals per group). The 25 OHD3 serum level was evaluated with a CEA915Ge test kit (Cloud Clone Corp., Houston, Texas, USA). The serum insulin was analysed with a Rat/Mouse Insulin Kit (Rat/Mouse Insulin Kit, catalog, Millipore EZRM113 K, St. Charles, Missouri, USA).

The samples of the mid shaft of the penis were fixed in 4% buffered formalin, and they were processed for being embedded in paraffin and $5\ \mu$ thick histological cuts were obtained. The cuts were stained with Weigert's resorcin-fuchsin technique with previous oxidation to evaluate the elastic system fibers. Masson's Trichrome was used to detect the connective tissue and sinusoidal spaces. The smooth muscle and cell proliferation were evidenced by immunohistochemical analysis using an anti-alpha smooth muscle actin and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibodies, respectively.

For immunohistochemistry stain, tissue sections were subjected to antigen retrieval with Tris-EDTA buffer, pH 9.0, overnight at 60°C . Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the slides with 3% H_2O_2 in methanol for 15 min followed by applying a protein block (10% goat serum at 60°C for 10 minutes). After draining this solution from the tissue section, the slides were incubated for 1 hour at 37°C with mouse monoclonal primary antibodies to alpha smooth muscle actin (18-0106, dilution 1:100, Invitrogen, Camarillo, USA) and PCNA (18-0110, dilution 1:100, Invitrogen, Camarillo, USA). Next, sections were treated with biotinylated secondary antibodies and the reaction was detected with the biotin-streptavidin-peroxidase complex (Kit Invitrogen, 859643, Frederick, USA) for 20 min and 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (859643, Invitrogen, Frederick, USA) was used as the chromogen. After incubation, the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Control tissue sections were obtained from the replacement of the primary antibody with 1% phosphate-buffered saline/bovine

serum albumin. The stained tissues were observed with an Olympus BX51 optical microscope and photographed with an Olympus DP71 digital camera.

The cross sections of the penis were photographed with a Zeiss Axio Cam ERc5s camera in a Carl Zeiss optical microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). The following areas were measured: cross section of the penis (A), corpus cavernosum with tunica albuginea (CC with TA) and without tunica albuginea (CC without TA), tunica albuginea (TA), and corpus spongiosum (CS). The TA area was estimated by the difference between CC with TA and CC without TA. We evaluated 20 photomicrographs per animal and all quantifications were performed with a final magnification of $\times 18.9$. These parameters were measured with the ImageJ software (Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, USA), with the freehand selection tool.

The percentages of connective tissue, smooth muscle, sinusoidal spaces, and elastic fibers were estimated using the point-counting method with a grid of 99 points superimposed on the magnified images using the grid tool of ImageJ software [34]. The cell counter tool of ImageJ software was used for counting separately each structure. The results were expressed as percentage. For each animal, 25 photomicrographs of the corpus cavernosum were obtained under $\times 400$ magnification and 25 photomicrographs of the corpus spongiosum were captured at $\times 1000$ magnification in different fields. To quantify the elastic fibers in corpus cavernosum were captured images at a final magnification of $\times 1000$ and 25 fields per animal.

The immunostained nuclei with anti-PCNA antibody were quantified. The cell proliferation in the CC was quantified by the number of cells per mm^2 . The cell proliferation was measured at a final magnification of $\times 400$ in 25 different fields per animal. The percentages and cell proliferation were estimated with the ImageJ software and the cell counter tool.

The digital images of the cuts were obtained using an Olympus DP70 camera (Tokyo, Japan) attached to an Olympus BX51 microscope (Tokyo, Japan).

TABLE 2: Parameters from offspring at 4 months of age.

Parameters	SC/SC	VitD/VitD	<i>p</i>
Food intake (g/animal/dia)	19.09 ± 3.98	18.91 ± 4.38	ns
Energy intake (kJ/animal/dia)	309.80 ± 62.46	306.30 ± 64.69	ns
Systolic blood pressure (mmHg)	164.00 ± 11.11	189.30 ± 8.08	<0.0001
Glucose (mmol/L)	6.04 ± 2.08	11.26 ± 4.15	0.0096
Insulin (μU/L)	21.50 ± 8.75	33.76 ± 3.52	0.0072
25 OHD3 (ng/ml)	73.71 ± 8.86	28.74 ± 0.20	<0.0001
Penile parameters			
	SC/SC	VitD/VitD	<i>p</i>
Morphometry			
A (mm ²)	6.51 ± 1.35	6.15 ± 1.02	0.0083
CC with TA (mm ²)	4.51 ± 0.95	4.19 ± 0.69	0.0007
CC without TA (mm ²)	2.17 ± 0.54	2.05 ± 0.32	0.0133
TA (mm ²)	2.54 ± 0.45	2.13 ± 0.45	0.0001
CE (mm ²)	0.97 ± 0.12	1.02 ± 0.13	0.0015
Percentage in corpus cavernosum			
Connective tissue (%)	62.58 ± 13.81	68.54 ± 12.31	<0.0001
Smooth muscle (%)	8.35 ± 3.49	10.70 ± 3.70	<0.0001
Sinusoidal space (%)	22.24 ± 16.57	17.45 ± 8.33	0.0002
Elastic fibers (%)	5.09 ± 1.72	4.33 ± 1.93	0.0009
PCNA (cells/mm ²)	4.63 × 10 ⁻⁴ ± 2.72 × 10 ⁻⁴	5.41 × 10 ⁻⁴ ± 2.58 × 10 ⁻⁴	0.0601
Percentage in corpus spongiosum			
Connective tissue (%)	59.04 ± 15.40	68.62 ± 14.79	<0.0001
Smooth muscle (%)	4.85 ± 2.61	5.87 ± 3.30	0.0074
Elastic fibers (%)	19.40 ± 9.42	19.73 ± 8.30	ns
Elastic fibers in tunica albuginea (%)	24.39 ± 6.79	21.00 ± 6.48	<0.0001

Data are presented as mean ± standard deviation and the differences were tested with an unpaired *t* test (*p* < 0.05). A, penile cross sectional area; CC with TA, corpus cavernosum area with tunica albuginea; CC without TA, corpus cavernosum area without tunica albuginea; TA, tunica albuginea; CE, corpus spongiosum; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; ns, not significant.

Data were expressed as mean ± standard deviation. The differences between groups were evaluated by the unpaired Student's *t*-test. The level of significance was *p* < 0.05, and all analyses were conducted with the GraphPad Prism software, version 6.02, for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3. Results

No significant differences were observed in BM gain, energy intake, fasting glucose, and insulin in the mothers.

Serum levels of 25 OHD3 were significantly lower in VitD mothers (28.50 ± 2.20 ng/ml) compared with SC mothers (67.64 ± 12 ng/ml; *p* < 0.0001).

At the end of the experimental period, the BM were similar in animals fed with SC diet (414.20 ± 17.57 g) and VitD diet (432.60 ± 24.77 g). No difference with regard to food intake and energy was found between the offspring of both experimental groups. However, the animals in the VitD/VitD group showed a 15% increase in SBP at 4 months of age compared with the SC/SC group. An 87% increase in fasting blood glucose and 54% increase in serum insulin in relation to the SC/SC group were observed. In addition, the VitD/VitD group showed a reduction of 60% in the

serum levels of 25 OHD3 compared with SC/SC. The data are presented in Table 2.

A 5% decrease of the cross-sectional area of the penis was found in the VitD/VitD compared with the animals in the SC/SC group. The CC areas with TA, and CC without TA were 7% and 6% lower in the VitD/VitD group compared with the SC/SC group, respectively. The TA area was 9% lower in the VitD/VitD group compared with the SC/SC group. Nevertheless, the area of the CS was 10% greater in the VitD/VitD group in relation to the SC/SC group (Table 2).

The percentage of connective tissue increased 10% in the CC and 16% in the CS, in the VitD/VitD group compared with the SC/SC group (Figures 1(a) and 1(b), resp.).

The percentage of smooth muscle was 25% greater in the CC and 21% greater in the CS in the animals of the group VitD/VitD in relation to the SC/SC group (Figures 1(c) and 1(d), resp.). Nonetheless, the percentages of the sinusoidal spaces and elastic fibers in the CC of the animals in the VitD/VitD group were 21% and 15% lower, respectively, compared with the SC/SC group (Figures 1(a) and 2(b)).

The assessment of the TA of the CS revealed that the percentage of elastic fibers was 12% lower in the VitD/VitD group compared with the SC/SC group (Figure 2(c)). The data are presented in Table 2.

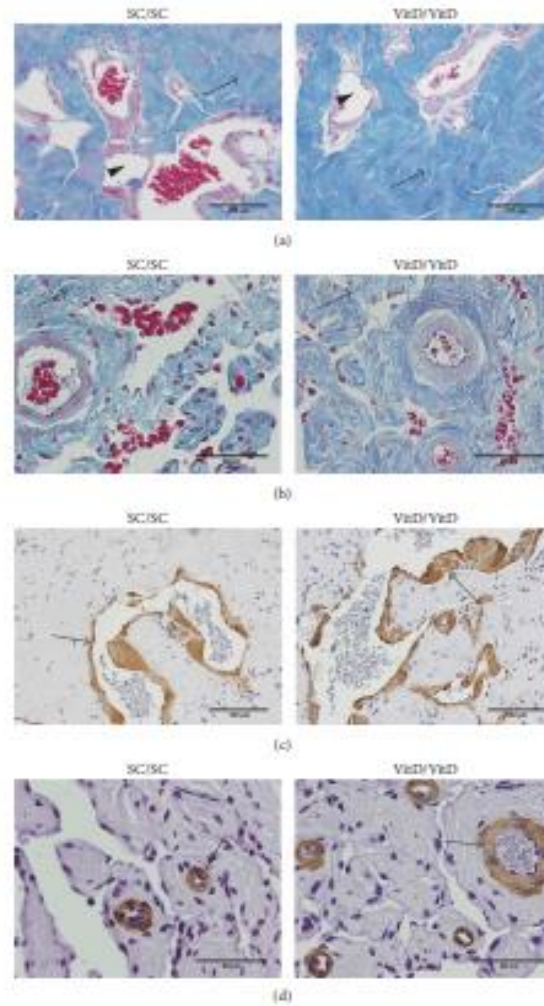


FIGURE 1: Photomicrographs of connective tissue, sinusoidal spaces, and smooth muscle in corpus cavernosum and corpus spongiosum of offspring penis at 4 months of age. (a) Corpus cavernosum; arrows indicate an increase of percentage of connective tissue and arrow head shows a reduction of sinusoidal spaces in VitD/VitD. Masson's trichrome, $\times 400$. (b) Corpus spongiosum; arrows demonstrate an increase of percentage of connective tissue in VitD/VitD. Masson's trichrome, $\times 1000$; arrows show an increased percentage of smooth muscle in corpus cavernosum (c) and in corpus spongiosum (d) in VitD/VitD. Immunostaining for anti-alpha smooth muscle actin, (c) $\times 400$ and (d) $\times 1000$, respectively.

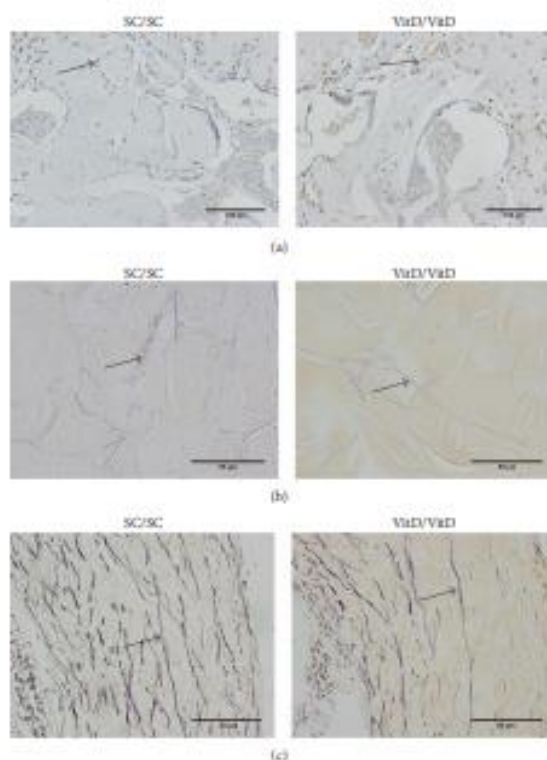


FIGURE 2: Photomicrographs of cell proliferation and elastic fibers in corpus cavernosum and corpus spongiosum of offspring penis at 4 months of age. (a) Corpus cavernosum; arrows show that the cell proliferation was greater in VitD/VitD. PCNA immunostaining, $\times 400$. Arrows indicate a reduction of elastic fibers in (b) corpus cavernosum and (c) tunica albuginea of corpus spongiosum in VitD/VitD. Weigert's resorcin-fuchsin staining, $\times 1000$.

The cell proliferation was 17% greater in the CC of the animals in the VitD/VitD group in relation to the SC/SC group (Figure 2(a)).

4. Discussion

Vitamin D is stored in the liver and adipose tissue. In rodents, a six-week restriction leads to a significant reduction in their serum levels [35]. In this study, the VitD diet, consumed during six weeks before mating, during pregnancy, and during lactation, reduced the 25 OHD3 serum levels in the mothers. Consequently, their offspring were also affected, and they displayed a significant reduction of serum vitamin D levels. This was due to both the maternal diet and the diet received from weaning to 4 months of age.

The metabolic and histomorphologic alterations in the penis of adult offspring were consequences of vitamin D restriction in the perinatal and postnatal periods. This was due to the fact that no differences were observed in BM, glucose, insulin, or total energy intake between SC and VitD mothers. In addition, the BM, nasoanal length, and blood glucose of the offspring of both experimental groups were similar at birth.

Barassi et al. (2014) showed in a study that a significant proportion of ED patients have a vitamin D deficiency and low levels of vitamin D might increase the ED risk by promoting endothelial dysfunction [23]. Endothelial dysfunction plays an important role in pathogenesis of ED and vitamin D deficiency promotes endothelial dysfunctions [16]. The animals in the VitD/VitD group had fasting hyperglycemia,

hyperinsulinemia, and elevated SBP. These metabolic changes are associated with endothelial vascular dysfunction, and they are risk factors for the onset of ED. This signals the importance of investigating the effects of vitamin D restriction on the morphology of the penis [36].

Vitamin D levels during pregnancy influence the fetal reserves. The offspring of mothers with hypovitaminosis D have deficiency of this vitamin during development [37]. Furthermore, testosterone levels decrease if there is vitamin D deficiency [38, 39]. Vitamin D metabolizing enzymes and receptors have been identified in the testes, indicating that vitamin D may play a role in regulating testosterone production [12]. The offspring that had low serum levels of vitamin D have, consequently, low serum levels of testosterone in adulthood.

Vitamin D restriction during the perinatal and postnatal periods resulted in a decrease in the A, CC with TA, CC without TA, and TA. A positive association was found between vitamin D levels and testosterone [40, 41].

Hofer and colleagues (2014) showed a possible action of vitamin D on the regulation of expression of steroidogenic genes and key enzymes to sex hormone biosynthesis [42]. Therefore, reduction of the A, CC with TA, CC without TA, and TA may be associated with vitamin D deficiency.

An increase in the amount of connective tissue in the CC and CS is related to fibrosis and ED [43]. The main event in the development of fibrosis is the increase in the expression of the transforming growth factor beta (TGF β) [43]. The animals of VitD/VitD group displayed an increase in SBP. Studies have shown that hypertension was associated with a decrease in elastic fibers and a thinning of the tunica albuginea in the penis of hypertensive animals which corroborates the results observed in the VitD/VitD group [44].

Since vit D reduces inflammatory and fibrogenic activity, vitamin D deficiency also led to an increase in fibrogenesis. This is related to an increase in TGF β expression, which is characterized by an increase in connective tissue in the CC and CS observed in the VitD/VitD group [45].

Fibroblasts are the most numerous cells in the CC of the rats, and the increase of the number of cells observed in the VitD/VitD is probably due to its proliferation [27]. Vitamin D is an antiproliferative hormone [7]. Restriction of this vitamin in the diet led to an increase in cell proliferation, which was observed in the VitD/VitD group. This corroborates an increase in the percentage of connective tissue in the CC and CS observed in animals of the VitD/VitD group.

Hyperglycemia has been observed in animals of the VitD/VitD group, and it induces glycosylation and degradation of elastin. This explains the decrease of elastic fibers in the VitD/VitD group [46, 47].

The decrease of elastic fibers in the CC and TA of the CS makes them less resistant to expansion during erection, reducing the pressure that causes ED [48]. Decrease in elastin in the penis of patients with severe ED has been documented in a previous study [49].

Vitamin D deficiency stimulates renin-angiotensin-aldosterone system, which may increase angiotensin II expression. This induces inflammatory response and vascular smooth muscle hypertrophy. In addition, vitamin

D regulates the synthesis of endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) [16]. Inadequate levels of vitamin D affect availability of NO. NO inhibits the growth of smooth muscle cells. This effect is mediated by the inhibition of proteins involved in regulation of the cell cycle [50]. These two factors explain the increase in area of the smooth muscles in the CC and CS found in the VitD/VitD group [16].

The growth of elements constituting the CC, such as the connective tissue and smooth muscle, may have resulted in a reduction of the area of the sinusoidal spaces in the VitD/VitD group. The changes in these elements lead to trabecular rigidity and alterations in the mechanical properties, which also result in ED [49].

5. Conclusion

Our study showed the influence of vit D as a remarkable micronutrient in the protection of penile cytoarchitecture. The results showed that vit D restriction in the perinatal and postnatal periods alters the penile morphology of adult offspring, indicating the importance of adequate serum levels of vit D during gestation, lactation, and postnatal life, to maintain the integrity of the penile morphology in the offspring.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

This study was funded by the Foundation for Research Support of the Rio de Janeiro State (FAPERJ, <http://www.faperj.br>), the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq, <http://www.cnpq.br>), and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, <http://www.capes.gov.br>), Brazil.

References

- [1] M. Abbasian, R. Chaman, M. Amiri et al., "Vitamin D Deficiency in Pregnant Women and Their Neonates," *Global Journal of Health Science*, vol. 8, no. 9, p. 83, 2015.
- [2] N. Khalassi, M. Kalani, M. Araghi, and et al., "The relationship between maternal vitamin D deficiency and low birth weight neonates," *Journal of Family & Reproductive Health*, vol. 9, no. 3, pp. 113-117, 2015.
- [3] C. J. Ashworth and C. Antipatis, "Micronutrient programming of development throughout gestation," *Reproduction*, vol. 122, no. 4, pp. 527-535, 2001.
- [4] K. Yamada, N. Maeda, J. Noguchi et al., "Influences of maternal B12 and methionine intake during gestation and lactation on testicular development of offspring in rats," *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 59, no. 3, pp. 238-242, 2013.
- [5] M. Welsh, P. T. K. Saunders, M. Finken et al., "Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and

- cryptorchidism," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 4, pp. 1479-1490, 2008.
- [6] A. S. Dusso, A. J. Brown, and E. Slatopolsky, "Vitamin D," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 289, no. 1, pp. F8-F28, 2005.
- [7] P. Pludowski, M. F. Holick, and S. Pilz, "Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—a review of recent evidence," *Autoimmunity Reviews*, vol. 12, no. 10, pp. 976-989, 2013.
- [8] M. R. Hausler, P. W. Jurutka, M. Mizwicki, and A. W. Norman, "Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$: genomic and non-genomic mechanisms," *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 25, no. 4, pp. 543-559, 2011.
- [9] A. Zittermann, "Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 92, no. 1, pp. 39-48, 2006.
- [10] S. Pilz, S. Frisch, H. Koertke et al., "Effect of vitamin D supplementation on testosterone levels in men," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 43, no. 3, pp. 223-225, 2011.
- [11] O. Cangüven, R. A. Talib, W. El Ansari, D.-J. Younis, and A. Al Naimi, "Vitamin D treatment improves levels of sexual hormones, metabolic parameters and erectile function in middle-aged vitamin D deficient men," *The Aging Male*, vol. 20, no. 1, pp. 9-16, 2017.
- [12] M. Blomborg Jensen, J. E. Nielsen, A. Jørgensen et al., "Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract," *Human Reproduction*, vol. 25, no. 5, pp. 1303-1311, 2010.
- [13] R. Bouillon, G. Carmeliet, L. Verlinden et al., "Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice," *Endocrine Reviews*, vol. 29, no. 6, pp. 726-776, 2008.
- [14] R. A. Talib, K. Khalafalla, and Ö. Cangüven, "The role of vitamin D supplementation on erectile function," *Türk Uroloji Dergisi*, vol. 43, no. 2, pp. 105-111, 2017.
- [15] N. Carretta, S. V. de Kreutzenberg, U. Valente et al., "Hypovitaminosis D is associated with erectile dysfunction in type 2 diabetes," *Endocrine Journal*, vol. 53, no. 3, pp. 831-838, 2016.
- [16] O. Andrukhova, S. Slavic, U. Zeitz et al., "Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice," *Molecular Endocrinology*, vol. 28, no. 1, pp. 53-64, 2014.
- [17] S. B. Williams, J. A. Casco, M.-A. Roddy, M. T. Johnstone, and M. A. Creager, "Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 27, no. 3, pp. 567-574, 1996.
- [18] J. A. Beckman, M. A. Creager, and P. Libby, "Diabetes and atherosclerosis epidemiology, pathophysiology, and management," *Journal of the American Medical Association*, vol. 287, no. 19, pp. 2570-2581, 2002.
- [19] I. Al Mheid, R. Patel, J. Morrow et al., "Vitamin D status is associated with arterial stiffness and vascular dysfunction in healthy humans," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 58, no. 2, pp. 186-192, 2011.
- [20] M. B. Sorenson and W. B. Grant, "Does vitamin D deficiency contribute to erectile dysfunction?" *Dermato-Endocrinology*, vol. 4, no. 2, pp. 128-136, 2012.
- [21] D. R. Meldrum, J. C. Gambone, M. A. Morris, D. A. N. Meldrum, K. Esposito, and L. J. Ignarro, "The link between erectile and cardiovascular health: The canary in the coal mine," *American Journal of Cardiology*, vol. 108, no. 4, pp. 599-606, 2011.
- [22] C. Gazzaruso, A. Coppola, T. Montalcini et al., "Erectile Dysfunction can improve the effectiveness of the current guidelines for the screening for asymptomatic coronary artery disease in diabetes," *Endocrine Journal*, vol. 40, no. 2, pp. 273-279, 2011.
- [23] A. Barasi, R. Pezzilli, G. M. Colpi, M. M. Corsi Romanelli, and G. V. Melzi d'Eril, "Vitamin D and erectile dysfunction," *The Journal of Sexual Medicine*, vol. 11, no. 11, pp. 2792-2800, 2014.
- [24] S. Chen, C. S. Lase, and D. G. Gardner, "Vitamin D-dependent suppression of endothelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through inhibition of CDK2 activity," *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 118, no. 3, pp. 135-141, 2010.
- [25] D. Sonjen, Y. Weisman, E. Kohen et al., "25-Hydroxyvitamin D $_3$ -1 α -hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds," *Circulation*, vol. 111, no. 13, pp. 1666-1671, 2005.
- [26] A. M. B. Goldstein and H. Padma-Nathan, "The microarchitecture of the intracavernosal smooth muscle and the cavernosal fibrous skeleton," *The Journal of Urology*, vol. 144, no. 5, pp. 1144-1146, 1990.
- [27] A. C. A. D. Pinheiro, W. S. Costa, L. E. M. Cardoso, and F. J. B. Sampaio, "Organization and relative content of smooth muscle cells, collagen and elastic fibers in the corpus cavernosum of rat penis," *The Journal of Urology*, vol. 164, no. 5, pp. 1802-1806, 2000.
- [28] A. M. B. Goldstein, J. P. Mechan, R. Zakhary, P. A. Buckley, and F. A. Rogers, "New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection," *Urology*, vol. 20, no. 3, pp. 259-266, 1982.
- [29] I. Kovancec, D. Vernet, M. Masouminis et al., "Implanted Muscle-Derived Stem Cells Ameliorate Erectile Dysfunction in a Rat Model of Type 2 Diabetes, but Their Repair Capacity Is Impaired by Their Prior Exposure to the Diabetic Milieu," *The Journal of Sexual Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 786-797, 2016.
- [30] B. Felix-Patricio, J. L. Medeiros, D. B. De Souza, W. S. Costa, and F. J. Sampaio, "Penile histomorphometrical evaluation in hypertensive rats treated with sildenafil or enalapril alone or in combination: a comparison with normotensive and untreated hypertensive rats," *The Journal of Sexual Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 39-47, 2015.
- [31] P. G. Reeves, F. H. Nielsen, and G. C. Fahey Jr., "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet," *Journal of Nutrition*, vol. 123, no. 11, pp. 1939-1951, 1993.
- [32] N. Maki, J. Makrakis, H. C. Parkington, M. Tare, R. Morley, and M. J. Black, "Vitamin D deficiency during pregnancy and lactation stimulates nephrogenesis in rat offspring," *Pediatric Nephrology*, vol. 23, no. 1, pp. 55-61, 2008.
- [33] F. A. M. Nascimento, T. C. Ceciliano, M. B. Aguilã, and C. A. Mandarin-de-Lacerda, "Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturation in F1 and F2 offspring," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, Article ID e41740, 2012.
- [34] B. Felix-Patricio, D. B. De Souza, R. M. Gregório, W. S. Costa, and F. J. Sampaio, "How to quantify penile corpus cavernosum structures with histomorphometry: Comparison

- of two methods," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 832156, 2015.
- [35] D. Eyles, J. Brown, A. Mackay-Sim, J. McGrath, and F. Ferns, "Vitamin D3 and brain development," *Neuroscience*, vol. 118, no. 3, pp. 641-653, 2003.
- [36] B. Musicki, A. J. Bella, T. J. Bivalacqua et al., "Basic Science Evidence for the Link Between Erectile Dysfunction and Cardiometabolic Dysfunction," *The Journal of Sexual Medicine*, vol. 12, no. 12, pp. 2233-2255, 2015.
- [37] M. L. Mulligan, S. K. Felton, A. E. Riek, and C. Bernal-Mizrachi, "Implications of vitamin D deficiency in pregnancy and lactation," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 202, no. 5, pp. 429.e1-429.e9, 2010.
- [38] Y. J. Tak, I. G. Lee, Y. J. Kim et al., "Serum 25-hydroxyvitamin D levels and testosterone deficiency in middle-aged Korean men: A cross-sectional study," *Asian Journal of Andrology*, vol. 17, no. 2, pp. 324-328, 2015.
- [39] L. M. Wentz, C. S. Berry-Cabán, Q. Wu, and J. D. Eldred, "Vitamin D correlation with testosterone concentration in male US soldiers and veterans," *Journal of Military and Veterans' Health*, vol. 24, no. 3, pp. 17-23, 2016.
- [40] K. Nimptsch, E. A. Platz, W. C. Willett, and E. Giovannucci, "Association between plasma 25-OH vitamin D and testosterone levels in men," *Clinical Endocrinology*, vol. 75, no. 1, pp. 106-112, 2012.
- [41] A. J. Van Ballejoijen, I. Reinders, M. Visser et al., "Serum parathyroid hormone in relation to all-cause and cardiovascular mortality: The hoorn study," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 98, no. 4, pp. E638-E645, 2013.
- [42] D. Hofer, J. Münzker, V. Schwetz et al., "Testicular synthesis and vitamin D action," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 99, no. 10, pp. 3766-3773, 2014.
- [43] M. R. Cabrini, S. F. Sezen, G. Lagoda et al., "Fibrotic protein expression profiles in penile tissue of patients with erectile dysfunction," *Urology*, vol. 82, no. 4, pp. 975-98, 2013.
- [44] K. P. Nimes, H. Labazi, and R. C. Webb, "New insights into hypertension-associated erectile dysfunction," *Current Opinions in Nephrology and Hypertension*, vol. 21, no. 2, pp. 163-170, 2012.
- [45] I. Szymczak and R. Pawliczak, "The active metabolite of vitamin D3 as a potential immunomodulator," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 83, no. 2, pp. 83-91, 2006.
- [46] D. Susic, "Cross-link breakers as a new therapeutic approach to cardiovascular disease," *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, part 3, pp. 853-856, 2007.
- [47] M. E. Mostafa, A. M. Serbel, and T. Mostafa, "Effect of chronic low-dose tadalafil on penile cavernous tissues in diabetic rats," *Urology*, vol. 81, no. 6, pp. 1253-1259, 2013.
- [48] I. P. Luttrell, M. Swoe, B. Starcher, W. C. Parks, and K. Chitale, "Erectile dysfunction in the type II diabetic db/db mouse: Impaired vasoconstriction with altered cavernosal vasoreactivity and matrix," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 294, no. 3, pp. H2204-H2211, 2008.
- [49] W. S. Costa, F. B. Carrerete, W. G. Horta, and F. J. B. Sampaio, "Comparative analysis of the penis corpora cavernosa in controls and patients with erectile dysfunction," *BJU International*, vol. 97, no. 3, pp. 567-569, 2006.
- [50] R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, and S. Moncada, "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor," *Nature*, vol. 327, no. 6022, pp. 524-526, 1987.

ANEXO D - Comprovação de aceite do 1^o artigo científico

6030646: Your manuscript has been accepted

Entrada x



Marlene Benchimol bmri@hindawi.com orcid.org/amazonases.com

para [manogallo.c](#), [marlenebenchim.](#), [mim](#), [bm.gregorio](#), [fernanda.amorim](#), [wscosta](#), [sampaio.uerj](#)

19 de mar

Dear Dr. GALLO,

The review process of Research Article 6030646 titled "Effects of Vitamin D Restricted Diet Administered During Perinatal And Postnatal Periods on The Penis of Wistar Rats" by Flavia Fernandes-Lima, Bianca Martins Gregorio, Fernanda Braga, Waldemar S. Costa, CARLA GALLO and francisco sampaio submitted to BioMed Research International has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

http://mts.hindawi.com/author/6030646/upload_files/

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to BioMed Research International.

Best regards,

ANEXO E - Comprovação de submissão do 2^o artigo científico

Track your recent Co-Authored submission to URL >> Caixa de entrada x

UROLOGY <eesserver@eesmail.elsevier.com> 4 de set de 2018 14:19 (Há 5 dias) ☆ ↶
para eu ▾

inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Flavia Fernandes-Lima,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Urology
Title: DEFICIENCY OF VITAMIN D AND ITS INFLUENCE IN THE PENIS OF WISTAR RATS VESSELS AND NERVES DURING GESTATION, LACTATION AND POSTNATAL LIFE
Corresponding Author: CARLA GALLO
Co-Authors: Flavia Fernandes-Lima; Bianca Gregorio, Ph.D.; Fernanda Nascimento, Ph.D.; Waldemar Costa, Ph.D.; Luciano Favorito, Ph.D.; Francisco Sampaio, Ph.D.;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: https://ees.elsevier.com/url/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Flavia&lname=Fernandes-Lima&email=delima_ff@gmail.com

ANEXO F - Formato final do 2^o artigo científico submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Urology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: DEFICIENCY OF VITAMIN D AND ITS INFLUENCE IN THE PENIS OF WISTAR RATS VESSELS AND NERVES DURING GESTATION, LACTATION AND POSTNATAL LIFE

Article Type: Basic and Translational Science

Section/Category: Adult

Keywords: Vitamin D, Penis, Vessels, Nerves, Fetal Programming

Corresponding Author: Dr. CARLA GALLO, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: STATE UNIVERSITY OF RIO DE JANEIRO

First Author: Flavia Fernandes-Lima

Order of Authors: Flavia Fernandes-Lima; Bianca Gregorio, Ph.D.; Fernanda Nascimento, Ph.D.; Waldemar Costa, Ph.D.; Luciano Favorito, Ph.D.; Francisco Sampaio, Ph.D.; CARLA GALLO, Ph.D.



STATE UNIVERSITY of RIO de JANEIRO
Biomedical Center - School of Medicine
Urogenital Research Unit

Av. 28 de Setembro, 97 - fundos - POM - 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
 Tel. + 55 21 2965-8021

www.urogenitalresearch.org

September 04, 2018

EDITOR-IN-CHIEF

Eric A. Klein, MD

Dear Prof. Eric A. Klein,

Please find enclosed the manuscript entitled "DEFICIENCY OF VITAMIN D AND ITS INFLUENCE IN THE PENIS OF WISTAR RATS VESSELS AND NERVES DURING GESTATION, LACTATION AND POSTNATAL LIFE" by Flavia Fernandes-Lima, Bianca M. Gregorio, Fernanda A.M. Nascimento, Waldemar S. Costa, Luciano A. Favorito, Francisco J.B. Sampaio, and Carla B.M. Gallo, which we submit for publication in *Urology*. All the authors made substantial contributions to the material submitted herein.

We have read and approved the final manuscript and have no substantial direct or indirect financial support in conjunction with this publication. We further add that the manuscript or portion thereof has not been previously published or submitted for action in reviewing and editing this submission, the authors hereby transfer, assign or otherwise convey all copyright ownership in the event that such work is publish in that Journal. We have all read and comply with the requirement set forth in "Information for Authors"

Sincerely,

Carla Braga Mano Gallo

Flavia Fernandes-Lima

Bianca Martins Gregorio

Fernanda Amorim de M. Nascimento

Waldemar S. Costa

Luciano A. Favorito

**DEFICIENCY OF VITAMIN D AND ITS INFLUENCE IN THE PENIS OF
WISTAR RATS VESSELS AND NERVES DURING GESTATION, LACTATION
AND POSTNATAL LIFE**

Flávia Fernandes-Lima, Bianca M. Gregório, Fernanda A.M. Nascimento¹,
Waldemar S. Costa, Luciano A. Favorito, Francisco J.B. Sampaio, Carla B.M.
Gallo

State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

¹ Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Flávia Fernandes-Lima: delima_ff@gmail.com

Bianca M. Gregório: bm.gregorio@gmail.com

Fernanda A. M. Nascimento: fernanda.amorim@gmail.com

Waldemar S. Costa: wscosta@gmail.com

Luciano Alves Favorito: lufavorito@yahoo.com.br

Francisco J.B. Sampaio: sampaio.uerj@gmail.com

Carla B. M. Gallo: manoqallo.c@gmail.com

Corresponding Author:

Carla Braga Mano Gallo, BSc, PhD,

Urogenital Research Unit,

State University of Rio de Janeiro,

Av. 28 de Setembro, 87, Fds, Vila Isabel, Rio de Janeiro

CEP: 20551-030, Brazil. Tel: +55-21-2868-8399

E-mail: manoqallo.c@gmail.com

Key words: Vitamin D, Penis, Vessels, Nerves, Fetal Programming

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments:

This study was funded by the Foundation for Research Support of the Rio de Janeiro State (FAPERJ - www.faperj.br), the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq - www.cnpq.br), and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES - www.capes.gov.br), Brazil.

*C. Abstract

ABSTRACT

Introduction and Objectives: Vitamin D deficiency is associated with a number of health problems, which compromised systems and organs. This study aimed to investigate the effects of diet restricted on vitamin D administered during gestation, lactation and postnatal life on the vessels and nerves of the penis of Wistar rats.

Materials and Methods: We studied the offspring of mothers who received the diets: SC (standard diet) or VitD (diet restricted in vitamin D). After weaning the offspring were fed the same maternal diet until four months of age. After euthanasia the penises were removed and processed for inclusion in paraffin. We performed histomorphometric and immunohistochemical analyzes of the vessels and nerves.

Results: The vitamin D restricted diet induced structural and quantitative alterations in the vessels and nerves of the penis in the adult offspring. The VitD / VitD group presented hypertrophy of the tunica media and reduction of the lumen area of the dorsal artery. In addition, pups fed the vitamin D restricted diet showed reduction of the elastic system fibers and decreased height of the internal limiting elastic layer of the dorsal artery. The area of the deep dorsal vein was smaller in the VitD / VitD group. The area of the deep dorsal vein was smaller in the VitD / VitD group. The percentage of vessels was higher in the corpora cavernosa and corpus spongiosum in the VitD / VitD group. However, a diet restricted in vitamin D reduced the percentage of vessels and nerves in the dorsal region of the penis.

Conclusion: Vitamin D restricted diet promoted structural and quantitative changes in the vessels and nerves of the penis in the adult offspring, which could be related to erectile dysfunction.

INTRODUCTION

Vitamin D (vitD) acts on calcium metabolism and bone formation in addition to influencing the development of the nervous, renal and immune systems.^{1,2-4}

Maternal vitD restriction can affect androgen-dependent organs since maternal nutritional status is capable of influencing the development of these organs⁵. Studies indicate that vitD is important for bone health, and also for other organs, and its deficiency may even compromise the penis morphologically^{6,7}.

Maternal vitD deficiency is associated with chronic diseases in offspring, including cardiovascular disease (CVD)⁸. Studies have shown a strong association between hypovitaminosis D, systemic arterial hypertension (SAH), metabolic syndrome, diabetes mellitus and atherosclerosis, thus, representing a marker of cardiovascular risk⁹.

Chronic diseases, such as CVD, are related to structural changes in the penis that cause impairment of hemodynamics and mechanical alterations responsible for erectile dysfunction (ED)¹⁰. The CVD and ED have a similar functional and morphological basis¹¹.

In the cardiovascular system, it is already well established that vitD deficiency stimulates the renin angiotensin system (RAS)¹². Li and coworkers (2002) have shown that in rats without vitamin D receptors (VDR) there is a high production of renin and Angiotensin II (ANG II) causing SAH and cardiac hypertrophy¹³. In addition, vitD regulates the production of nitric oxide (ON) and nitric oxide synthases (ON synthetases) from L-arginine¹⁴. ON causes vascular smooth muscle relaxation and the reduction of its bioavailability can cause damage to the smooth muscle and nerves of the penis¹⁵.

Hypovitaminosis D also stimulates RAS in the pancreas inducing hyperglycemia and insulin resistance (IR)¹⁶. Hyperglycemia promotes tissue damage by increasing the formation of advanced glycosylation final products, oxidative stress, and also decreases NO synthesis¹⁷.

Low serum levels of vitD are related to decreased serum testosterone concentration in humans and rats, which may alter penile morphology and

erectile physiology^{18, 19}. A recent cross-sectional analysis showed that vitD deficiency is associated with a higher prevalence of ED²⁰. It has also been shown that vitD supplementation improves testosterone levels, metabolic syndrome and erectile function in men with vitD deficiency^{7, 21}.

Erection is a neurovascular phenomenon that requires a well-coordinated and functional interaction between the vascular and nervous systems of the penis²². Therefore, the structural and functional integrity of the penis is essential for the maintenance of normal erectile function. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of vitD restriction during gestation, lactation and postnatal life on the vessels and nerves of the offspring penis at four months of age.

MATERIALS AND METHODS

Six-week-old female Wistar rats were divided into two groups: SC (standard diet, fed diet according to AIN-93G recommendations, 1000 IU / kg vitamin D3, n = 8); and VitD (diet restricted in vitamin D, fed the same diet AIN-93G, without vitamin D3, n = 9)²³, (Table 1). The diets were produced by PragSolutions (Jau, SP, Brazil) and were administered for six weeks. After this six-week period females mated with males that received only the SC diet. The pregnant females were fasted for 4 hours to assess the glycoemia of the last gestational week²⁴. The glycoemia of the last gestational week was measured with a glucose meter (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brazil). The diets were administered to the mothers until the weaning of the pups. In mothers, food and energy intakes were evaluated daily and body mass (BM) recorded weekly.

At birth, litter number was randomly adjusted to six animals per lactating mother to ensure adequate nutrition. One male from each litter of SC mothers and VitD mothers were randomly selected to form the groups. At the end of the lactation period, after a 12-hour fast, mothers were euthanized (n = 5 per group) in a carbon dioxide gas chamber. Blood samples were collected from the right atrium for biochemical analyses.

The offspring were divided into two groups: SC / SC (SC mothers, fed SC diet from weaning to 4 months of age, n = 8) and VitD / VitD (VitD mothers, fed VitD diet from weaning to 4 months of age, n = 9). From birth to 4 months of age BM and nasoanal length were recorded weekly. Food and energy intakes were monitored daily. The daily energy intake of mothers and offspring was estimated by multiplying the amount of feed consumed in grams (g) by the energetic value of the diet in kilojoules (kJ).

Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly from the third to the fourth month of age. The method used was plethysmography of the caudal artery (Insight, São Paulo, SP, Brazil). The Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) was performed on the pups in the week prior to euthanasia. The animals were fasted for 12 hours and the glycemia was measured with a glucose meter (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brazil). Subsequently, hypertonic glucose serum (50% glucose) was administered by orogastric gavage at the dosage of 2g/kg BM. Blood was obtained by milking from the tail of the animal after the times 15, 30, 60 and 120 minutes for determination of glycemia at the indicated times. The area under the curve (AUC), measured with GraphPad Prism software (version 6.0 for Windows, GraphPad Prism software, San Diego, CA, USA) was used to evaluate glucose intolerance.

At four months of age, the pups were fasted for 12 hours and subjected to the carbon dioxide gas chamber. Blood samples were collected as described above for biochemical analysis. Fasting glycemia was measured with a glucose meter (Accu-Chek, Roche, São Paulo, SP, Brazil).

Serum vitD and insulin concentrations of mothers and offspring were evaluated. The serum was separated by centrifugation (12000 rpm for 15 minutes) at room temperature and stored at -80°C. Serum 25-hydroxyvitamin D3 (25-OHD3) and insulin analyzes were performed in duplicates and dosed by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (n = 8 animals per group). 25-OHD3 serum level was evaluated with CEA915Ge assay kit (Cloud-Clone Corp., Houston, Texas, USA). Serum insulin was evaluated with the kit (Rat / mouse insulin kit, Millipore Catalog EZRMI-13K-St Charles, Missouri, USA). IR was estimated by the homeostasis evaluation model (HOMA-IR) defined as: $[\text{fasting glucose}] \times (\text{fasting insulin}) / 22.5$ ²⁵.

The penises were removed and the middle third was separated to perform the histological procedures. The middle third of the penis was fixed in 4% formaldehyde in phosphate buffered saline for 48 hours. The samples of the middle third of the penis were processed, included in paraffin and cross sections were made with 5- μ m thickness. Epididymal, perirenal and subcutaneous fat deposits were collected and weighed. The pup's adiposity index was calculated by dividing the sum of the fat masses (epididymal, perirenal and subcutaneous) by the BM and presented in percentage²⁶.

Histological slides were previously silanized for immunohistochemistry. The sections were dewaxed and hydrated. Subsequently, antigenic recovery with ethylenediaminetetraacetic acid buffer (TRIS-EDTA, pH 9.0) was performed for 12 hours (overnight) at 60°C. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) in methanol for 15 minutes. Sequentially, sections were washed in phosphate buffered saline (PBS), and then the sections were incubated with 10% goat serum at 60°C for 10 minutes to block non-specific binding. Then, the sections were simultaneously incubated with smooth muscle anti- α -actin monoclonal antibodies (18-0106, 1: 100 dilution, Invitrogen, Camarillo, USA) and anti-tubulin- β 3 (ab78078, 1: 100 dilution, Abcam, Cambridge, UK) at 37°C for 1 hour.

Consecutively, the sections were washed in PBS and incubated with biotinylated secondary antibodies for 20 minutes and the reaction was detected with the biotin-streptavidin-peroxidase complex (Kit Invitrogen, 859643, Frederick, USA). The sections were then washed with PBS and positive immunoreaction was identified after incubation with 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride-DAB (859643, Invitrogen, Frederick, USA) and the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. Simultaneously, the sections of the negative control were obtained with the primary antibodies replaced with 1% PBS / BSA. The digital images of the immunolabelled sections were obtained using an Olympus DP70 camera (Tokyo, Japan) coupled to an OlympusBX51 (Tokyo, Japan) optical microscope with a resolution of 2040 x 1536 pixels and stored in the TIFF format.

Immunohistochemical anti-alpha actin of smooth muscle was performed to identify smooth muscle cells (SMC) and to measure the areas of the dorsal artery (DA), tunica media, and lumen of the DA. The area of the tunica media of the DA was estimated by the difference between the DA area and the lumen area. The ratio between the tunica media area and the lumen area of the DA was calculated. Measurements were obtained using the ImageJ software (Image Processing and Analysis in Java, NIH, Bethesda, Maryland, USA). The Freehand selections tool was selected to measure the DA and DA lumen areas.

The photomicrographs obtained from the sections submitted to the anti-alpha actin smooth muscle immunohistochemistry were also used to quantify the nuclear density in the tunica media of the DA. This parameter was quantified with the ImageJ software using the plugin cell counter. All these parameters were evaluated in 5 histological slides, one section per slide, 2 fields in each section, making a total of 10 fields evaluated per animal in photomicrographs with X600 of magnification. The sections stained by Weigert's fuchsin-resorcin technique with previous oxidation by oxone were used to measure the height of the internal elastic lamina of the DA. In each photomicrograph eight measurements were performed in the area of the internal elastic lamina. The result was given by the mean of the measurements, thus determining the height of the internal elastic lamina of the DA. The height of the internal elastic lamina of the DA was measured using the ImageJ software using the straight line tool.

The percentage of elastic fibers in the DA was quantified using the technique based on color segmentation. ImageJ software loaded with its own plugin color segmentation was used to quantify the percentage of elastic fibers. The areas were determined according to the range of colors selected and expressed in percentage. The evaluations of the height of the internal elastic lamina and the percentage of elastic fibers in the DA were performed in photomicrographs with an X600 magnification, obtained from 5 histological slides of each animal. One field was evaluated on each slide, making a total of 5 fields evaluated per animal.

Immunohistochemical anti-alpha actin of smooth muscle was performed to identify smooth muscle cells (SMC) and photomicrographs were used to measure the DDV area. The DDV area was measured using the ImageJ Freehand selections tool. This parameter was measured in photomicrographs captured with a magnification of X100 obtained from 5 histological slides, one section slide, 1 field in each section, for a total of 5 fields per animal.

Immunohistochemical anti-alpha actin smooth muscle was also used to locate and identify vessels. The percentage of vessels was quantified in CC, CS and Dorsal Region (DR). The photomicrographs were captured with increases of X400, X1000 and X600, respectively. The anti-tubulin- β 3 immunohistochemistry was performed to estimate the percentage of nerves in CC, CS and DR. For the evaluation of this parameter, photomicrographs with X600 magnification were used.

Quantification of vessels and nerves were performed using the point counting method that was performed with the ImageJ software. A 99-point grid was superimposed on the images and the number of points that intercept the analyzed structure was divided by the number of total points of the test system- 99 points [Pp / Pt (%)]. The cell counter tool was used to count the points. Five histological slides of each animal were obtained for these analyzes. Five fields were evaluated on each slide, making a total of 25 fields evaluated per animal.

The protocol of this study was approved by the Ethics Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the State University of Rio de Janeiro (Protocol CEUA / 034/2014).

The animals were allocated in an environment with incandescent light, without ultraviolet radiation, to avoid vitamin D synthesis in the skin.

Data were expressed as mean \pm standard deviation of the mean (SD). The differences between the groups were assessed by the unpaired Student t-test. The significance level was set at $p < 0.05$ and all analyzes were performed with GraphPad Prism software version 6.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

There was no difference in energy intake, body mass gain, glycemia and serum insulin among the mothers of the SC and VitD groups (Table 2). The mothers of the VitD group presented lower serum levels of 25-OHD3 when compared to the mothers of the SC group (Table 2).

At the end of the experimental period, the animals of the SC / SC group (431g \pm 52g) presented body mass similar to the VitD / VitD group (433g \pm 42g). The animals that received a diet without vitamin D showed an increase in the adiposity index, however, with no difference in BM. The adiposity index was more pronounced in the VitD / VitD group (+ 40.90%, $p = 0.0025$) when compared to the SC / SC group (Table 3).

The vitamin D restricted diet induced a 15% increase in SBP in the VitD / VitD group compared to the SC / SC group ($p = 0.0022$), observed at the end of the experimental period (Table 3).

There was glucose intolerance in the animals that received the diet restricted in vitD, evidenced by the greater area under the curve in the OGTT, when compared to the SC/SC group (+ 12.02%, $p = 0.0180$) (Table 3). The VitD/VitD group presented an 86.42% increase in fasting glucose and a 53.80% increase in serum insulin levels. This change in glucose homeostasis resulted in an increase of 87.51% of HOMA-IR in the VitD/VitD group when compared to the SC/SC group (Table 3).

Regarding the parameters evaluated in the penis, there was no difference in the area of the DA between the SC/SC and VitD/VitD groups. The area of the tunica media the DA was 45.82% higher in the VitD/VitD group when compared to the SC/SC group. The DA lumen area was 47.28% lower in the VitD/VitD group, when compared to the SC/SC group (Figure 1). Consequently the ratio between the area of the tunica and the DA lumen area was 164.69% higher in VitD/VitD group. Nuclear density in the tunica media of the DA was similar in both experimental groups. The DDV area was 58.26% lower in the VitD/VitD group, when compared to the SC/SC group (Figure 1).

The percentage of vessels was 43.44% higher in CC and 20.82% higher in CS in the VitD/VitD group than in the SC/SC group. A reduction of 26.47% in the percentage of vessels in DR was observed in VitD / VitD group (Figure 2).

There was no difference in the percentage of nerves in CC and CS between SC/SC and VitD/VitD groups. However, the percentage of nerves was 24.43% lower in DR in the VitD/VitD group when compared to SC/SC group (Figure 3).

The height of the internal elastic lamina of the DA was 28.11% lower in the VitD/VitD group than in the SC/SC group. The VitD/VitD group showed a 30.26% reduction in the percentage of elastic fibers in DA when compared to the SC/SC group (Figure 4 and Table 4).

DISCUSSION

Animals that received the vitamin D-restricted diet had increased adiposity, hyperglycemia, hyperinsulinemia, HOMA-IR elevation, and glucose intolerance. These results are in agreement with previously published studies^{24,27}. These morbidities are associated with increased pancreatic beta cell mass due to hypertrophy of these cells²⁴. This hypertrophy possibly explains the hyperinsulinemia observed in VitD/VitD animals as a compensatory effect in the attempt to maintain glycemic homeostasis. Restriction of vitamin D also stimulates RAS in the pancreas. As a result it leads to hyperglycemia, IR and glucose intolerance¹⁶.

Vitamin D restriction increases the activity of RAS causing an increase in the production of ANGII that promotes IR and hypertrophy in SMC, contributing to vascular remodeling²⁸. The hyperinsulinemia observed in the VitD/VitD group also has a hypertrophic effect in the SMCs²⁹. These factors certainly contributed to hypertrophy the tunica media of the DA. The increase in the area of the tunica media resulted in a decrease in lumen and an increase in the ratio between the tunica media area and the lumen area. The nuclear density in the tunica media of the DA was similar in both experimental groups, which corroborates the hypertrophy of the tunica media of the DA observed in the VitD/VitD group.

The physiological effects of ANGII are mediated primarily by the AT1-type receptor (RAT1). Activation of RAT1 stimulates vasoconstriction, elevation of blood pressure and hypertrophy of muscle cells³⁰. Vitamin D restriction

contributed to the elevation of SBP, as observed in the VitD/VitD group. According to Ni et al. (2014), the selective elimination of vitamin D receptor (VDR) in endothelial cells promotes a decrease in the expression of endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) enzyme, in addition to increase collagen deposition and decrease of elastic fibers in the rodent aorta showing that vitamin D regulates the relaxation of SMC and blood pressure³¹. It is known that in SAH there is a thickening of the tunica media and an increase in the ratio tunica media/lumen in the small arteries³², as observed in the VitD/VitD group.

Increased ANGII expression is associated with vitamin D deficiency and stimulates the inflammatory response. The inflammatory response, in turn, activates the degradation of elastin in the tunica media by the action of extracellular matrix metalloproteinases³³. The result was the lower percentage of elastic fibers and the decrease in the height of the internal elastic lamina observed in the DA of VitD/VitD animals. Modifications in the elastic fibers of the arteries affect the elasticity and can cause mechanical alterations in the penis, reducing its elasticity and compliance³⁴.

In vitamin D deficiency testosterone levels are decreased³⁵. In rats submitted to vitamin D restriction diet in the perinatal and postnatal periods, a decrease in the cross-sectional area of the penis was observed³⁶. Reduced serum testosterone levels are associated with morphological changes in the penis³⁷. Reduction of DDV area is, therefore, associated with changes in serum testosterone levels and is a consequence of restricted vitamin D intake.

Vitamin D deficiency increases the production of ANG II which is a growth factor that regulates cell proliferation, hypertrophy and apoptosis³⁸⁻⁴⁰.

Vitamin D is considered a potent inhibitor of angiogenesis by reducing the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), a promoter of angiogenesis that inhibit the expression of interleukin-8, with pro-angiogenic action^{41,42}. Restriction of vitamin D inducing angiogenesis may explain the increase in the percentage of vessels in CC and in CS.

The result observed in the VitD/VitD group showed a reduction of the area occupied by the nerves in the DR. Restriction of vitamin D may have induced these changes in the penis of adult offspring because their deficiency leads to a decrease in neurotrophic and neuroprotective factors. These factors

support the growth, survival and differentiation of both developing and mature neurons, which may explain the reduction of the area occupied by the nerves in the DR observed in the VitD/VitD group^{43,44}.

A previous study showed that rodents from mothers who were submitted to vitamin D restriction in the prenatal period and/or during pregnancy, presented reduced expression of neurotrophic factors⁴³. The reduction of the area occupied by nerves in DR may also be related to the reduction of serum levels of testosterone associated with vitamin D restricted diet⁴⁵. Armagan et al. (2008) showed that testosterone deprivation promotes changes in the myelin sheath and axons of the dorsal nerve of the penis, indicating nerve degeneration⁴⁶. These data show the neuroprotective role of testosterone in the peripheral nerves⁴⁶. Baba et al. (2000) also showed that the reduction of serum levels of testosterone alters the area occupied by nerve fibers and induces a decrease in the number of nerve fibers containing neuronal nitric oxide synthetase (nNOS) in the dorsal nerves⁴⁷.

Vitamin D deficiency promotes changes in the isoforms of endothelial nitric oxide synthase and nNOS that compromise NO production. NO is an important vasodilator and antioxidant. The reduction of NO availability can cause oxidative damage and nerve destruction, explaining the reduction of the area occupied by the nerves in RD in VitD/VitD group⁴⁸. Animals fed a vitamin D restricted diet showed hyperglycemia and IR that are metabolic changes associated with increased oxidative stress. Hyperglycemia induces increased formation of advanced glycosylation end products and decreases NO synthesis¹⁷. It has been observed that hyperglycemia reduces the expression of nNOS in the dorsal nerves of the penis in diabetic rats⁴⁹. IR also induces oxidative stress, nerve fiber lesions, and nerve reduction in rodents⁴⁸. These data corroborate the reduction of the percentage of nerves observed in the DR in the VitD/VitD group, which presented hyperglycemia. All these factors compromise the transmission of sexual stimuli from the penis to the brain, the transmission of neurological responses, as well as the velocity of conduction, promoting erectile dysfunction⁴⁶.

CONCLUSION

The vitamin D restricted diet caused significant structural and quantitative modifications in the vascular bed and the neural network of the rat's penis. These alterations may impair penile hemodynamic properties and compromise the neural activity, causing erectile dysfunction.

REFERENCES

1. Ginde AA, Sullivan AF, Mansbach JM, Camargo CA. Vitamin D insufficiency in pregnant and nonpregnant women of childbearing age in the United States. *Am J Obstet Gynecol*. 2010, 202(5):436.e1-8.
2. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2008, 295(6):R1941–52.
3. Grecksch G, Rüttrich H, Höllt V, Becker A. Transient prenatal vitamin D deficiency is associated with changes of synaptic plasticity in the dentate gyrus in adult rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2009, 34:S258–64.
4. Nascimento FAM, Ceciliano TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring. *PLoS One*, 7(8):e41740, 2012.
5. Ramos C da F, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJB. The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl*. 12(2):180–5, 2010.
6. Talib RA, Khalafalla K, Canguven O. The role of vitamin D supplementation on erectile function. *Türk Üroloji Dergisi/Turkish J Urol*. 2017, 31;43(2):105–11.
7. Fernandes-Lima F, Gregório BM, Nascimento FAM, Costa WS, Gallo CBM, Sampaio FJB. Effects of Vitamin D Restricted Diet Administered during Perinatal and Postnatal Periods on the Penis of Wistar Rats. *BioMed Research International*. 2018, Article ID 6030646, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/6030646>.

8. Gezmish O, Black MJ. Vitamin D Deficiency in Early Life and the Potential Programming of Cardiovascular Disease in Adulthood. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013, 30;6(4):588–603.
9. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 2004, 79(3):362–71.
10. Mirono V, Imbimbo C, Fusco F, Verze P, Creta M, Tajana G. Androgens and Morphologic Remodeling at Penile and Cardiovascular Levels: A Common Piece in Complicated Puzzles? *Eur Urol.* 2009, 56(2):309–16.
11. Meluzin J, Vasků A, Kincí V, Panovský R, Srámková T. Association of coronary artery disease, erectile dysfunction, and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms. *Heart Vessels.* 2009, 24(3):157–63.
12. Vaidya A, Williams JS. The relationship between vitamin D and the renin-angiotensin system in the pathophysiology of hypertension, kidney disease, and diabetes. *Metabolism.* 2012, 61(4):450–8.
13. Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu SQ, Cao L-P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002, 110(2):229–38.
14. Molinari C, Uberti F, Grossini E, Vacca G, Carda S, Invernizzi M, et al. 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2011, 27(6):661–8.
15. Thorve VS, Kshirsagar AD, Vyawahare NS, Joshi VS, Ingale KG, Mohite RJ. Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. *J Diabetes Complications.* 2011, 25(2):129–36.
16. Cheng Q, Boucher BJ, Leung PS. Modulation of hypovitaminosis D-induced islet dysfunction and insulin resistance through direct suppression of the pancreatic islet renin-angiotensin system in mice. *Diabetologia.* 2013, 56(3):553–62.
17. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 1995, 7; 369(2–3):131–5.
18. Tak YJ, Lee JG, Kim YJ, Park NC, Kim SS, Lee S, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and testosterone deficiency in middle-aged Korean men: a cross-sectional study. *Asian J Androl.* 2015, 17(2):324–8.

19. Rafiq R, van Schoor NM, Sohi E, Zillikens MC, Oosterwerff MM, Schaap L, et al. Associations of vitamin D status and vitamin D-related polymorphisms with sex hormones in older men. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016, 21; 164:11–7.
20. Farag YMK, Guallar E, Zhao D, Kalyani RR, Blaha MJ, Feldman DI, et al. Vitamin D deficiency is independently associated with greater prevalence of erectile dysfunction: The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001–2004. *Atherosclerosis*. 2016, 252:61–7.
21. Canguven O, Talib RA, El Ansari W, Yassin D-J, Al Naimi A. Vitamin D treatment improves levels of sexual hormones, metabolic parameters and erectile function in middle-aged vitamin D deficient men. *Aging Male*. 2017, 2; 20(1):9–16.
22. Yin GN, Park S-H, Choi M-J, Limanjaya A, Ghatak K, Minh NN, et al. Penile neurovascular structure revisited: immunohistochemical studies with three-dimensional reconstruction. *Andrology*. 2017, 5(5):964–70.
23. 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-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993 ,123(11):1939–51.
24. Nascimento FAM, Ceciliano TC, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational effects on the liver and pancreas resulting from maternal vitamin D restriction in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013, 59(5):367–74.
25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985, 28(7):412–9.
26. Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilá MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One*. 2012, 7(7):e39837.
27. Maia-Ceciliano TC, Barreto-Vianna ARC, Barbosa-da-Silva S, Aguilá MB, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal vitamin D-restricted diet has

- consequences in the formation of pancreatic islet/insulin-signaling in the adult offspring of mice. *Endocrine*. 2016, 3;54(1):60–9.
28. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflamm*. 2014, 2014:689360.
29. Hitomi H, Kaifu K, Fujita Y, Sofue T, Nakano D, Moriwaki K, et al. Angiotensin II Shifts Insulin Signaling Into Vascular Remodeling From Glucose Metabolism in Vascular Smooth Muscle Cells. *American journal of hypertension*. 2011, 24(10):1149-1155. doi:10.1038/ajh.2011.114.
30. Pernomian L, Pernomian L, Baraldi Araujo Restini C. Counter-regulatory effects played by the ACE - Ang II - AT1 and ACE2 - Ang-(1-7) - Mas axes on the reactive oxygen species-mediated control of vascular function: perspectives to pharmacological approaches in controlling vascular complications. *Vasa*. 2014, 43(6):404–14.
31. Ni W, Watts SW, Ng M, Chen S, Glenn DJ, Gardner DG. Elimination of vitamin D receptor in vascular endothelial cells alters vascular function. *Hypertension*. 2014, 64(6):1290–8.
32. Mulvany MJ. Small Artery Remodelling in Hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012, 110(1):49–55.
33. Fan LM, Douglas G, Bendall JK, McNeill E, Crabtree MJ, Hale AB, et al. Endothelial cell-specific reactive oxygen species production increases susceptibility to aortic dissection. *Circulation*. 2014, 24;129(25):2661–72.
34. Zhou F, Xin H, Liu T, Li G-Y, Gao Z-Z, Liu J, et al. Effects of Icariside II on Improving Erectile Function in Rats With Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Androl*. 2012, 1;33(5):832–44.
35. Rafiq R, van Schoor NM, Sohl E, Zillikens MC, Oosterwerff MM, Schaap L, et al. Associations of vitamin D status and vitamin D-related polymorphisms with sex hormones in older men. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016, 164:11–7.
36. Miranda AF, Gallo CBM, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJB. Effects of castration and late hormonal replacement in the structure of rat corpora cavernosa. *J Androl*. 2012, 33(6):1224–32.

37. Shen Z-J, Zhou X-L, Lu Y-L, Chen Z-D. Effect of androgen deprivation on penile ultrastructure. *Asian J Androl.* 2003, 5(1):33–6.
38. EJ F. The angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells involves a phospholipase D-mediated signalling mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 2000, 372(2):363–70.
39. Forman JP, Williams JS, Fisher NDL. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Regulation of the Renin-Angiotensin System in Humans. *Hypertension.* 2010, 1;55(5):1283–8.
40. Weng S, Sprague JE, Oh J et al. Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice. *PLoS One.* 2013, vol. 8(1):e54625.
41. Mocellin S. Vitamin D and cancer: deciphering the truth. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1816(2):172–8.
42. Jamali N, Sorenson CM, Sheibani N. Vitamin D and regulation of vascular cell function. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2017, ajpheart.00319.2017.
43. Eyles D, Brown J, Mackay-Sim A, McGrath J, Feron F. Vitamin D3 and brain development. *Neuroscience.* 2003, 118(3):641–53.
44. Hawes JE, Tesic D, Whitehouse AJ, Zosky GR, Smith JT, Wyrwoll CS. Maternal vitamin D deficiency alters fetal brain development in the BALB/c mouse. *Behav Brain Res.* 2015, 286:192–200.
45. Nimptsch K, Platz EA, Willett WC, Giovannucci E. Association between plasma 25-OH vitamin D and testosterone levels in men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012, 77(1):106–12.
46. Armagan A, Hatsushi K, Toselli P. The effects of testosterone deficiency on the structural integrity of the penile dorsal nerve in the rat. *Int J Impot Res.* 2008, 27;20(1):73–8.
47. Baba K, Yajima M, Carrier S, Morgan DM, Nunes L, Lue TF, et al. Delayed testosterone replacement restores nitric oxide synthase-containing nerve fibres and the erectile response in rat penis. *BJU Int.* 2000, 85(7):953–8.
48. Zhong M, Wwang W, Hu J, Li F, Ding W. Neural and vascular alterations in the penis of diabetic rats with erectile dysfunction. *Life Sci J.* 2013, 10(2):2792-2797.

49. Wang L, Xu Y, Li H, Lei H, Guan R, Gao Z, et al. Antioxidant icariside II combined with insulin restores erectile function in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Cell Mol Med*. 2015, 19(5):960-9.

Legends - Figures

Figure 1 - Photomicrographs of histological slides.

A (SC/SC group) and B (VitD/VitD group): Area of the tunica media and area of the lumen of the dorsal artery (DA), X600. Note that the area of the tunica media of the DA was 45% higher in the VitD/VitD group when compared to the SC/SC group. Also, the DA lumen area was 47% lower in the VitD/VitD group, when compared to the SC/SC group.

C (SC/SC group) and D (VitD/VitD group): Deep dorsal vein area (DDV), X100. Note that the DDV area was 58% lower in the VitD/VitD group, when compared to the SC/SC group.

Immunohistochemistry for anti-alpha-smooth muscle actin.

Figure 2 - Photomicrographs of histological slides.

A (SC/SC group) and B (VitD/VitD group): Percentage of vessels in the corpus cavernosus (CC), X400. Note that the percentage of vessels was 43% higher in CC in the VitD/VitD group.

C (SC/SC group) and D (VitD/VitD group): Percentage of vessels in the corpus spongiosum (CS), X1,000. Note that the percentage of vessels was 21% higher in CS in the VitD/VitD group.

E (VitD/VitD group) and F (VitD/VitD group): Percentage of vessels in the dorsal region (DR), X600. Note a reduction of 26% in the percentage of vessels in the DR in VitD/VitD group.

Immunohistochemistry for anti-alpha-actin smooth muscle.

Figure 3 - Photomicrographs of histological slides.

A (SC/SC group) and B (VitD/VitD group): Percentage of nerves in the corpus cavernosus (CC), X600. There was no difference in the percentage of nerves in CC between SC/SC and VitD/VitD groups.

C (SC/SC group) and D (VitD/VitD group): Percentage of nerves in the corpus spongiosum (CS), X600. There was no difference in the percentage of nerves in CS between SC/SC and VitD/VitD groups.

E (SC/SC group) and **F** (VitD/VitD group): Percentage of nerves in the dorsal region (DR). The percentage of nerves was 24% lower in DR in the VitD/VitD group.

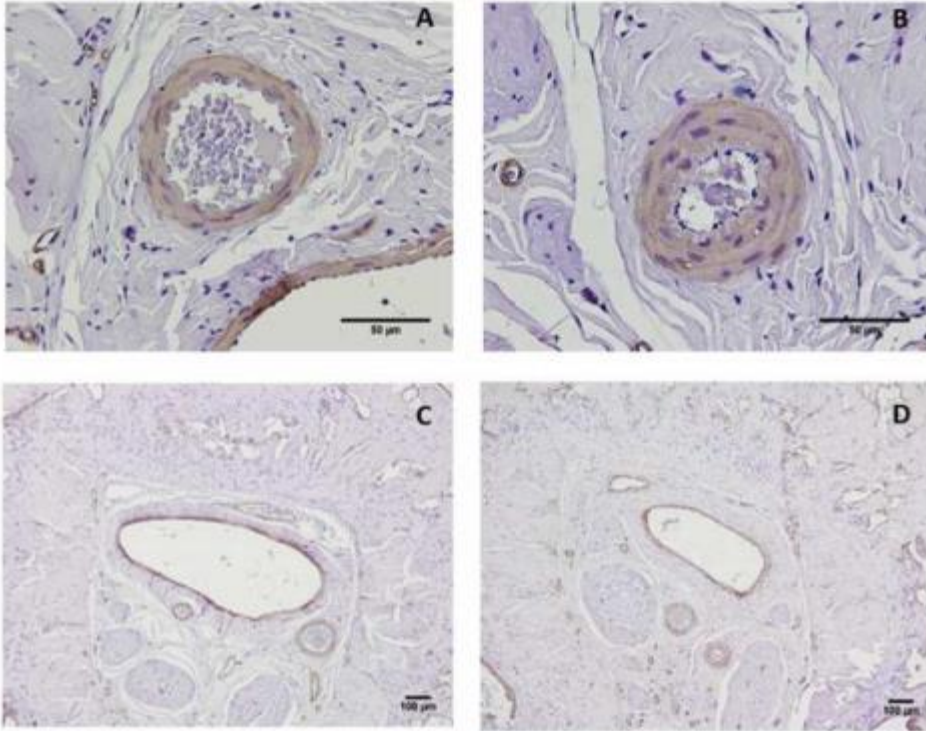
Immunohistochemistry for anti-tubulin- β 3

Figure 4 - Photomicrographs of histological slides

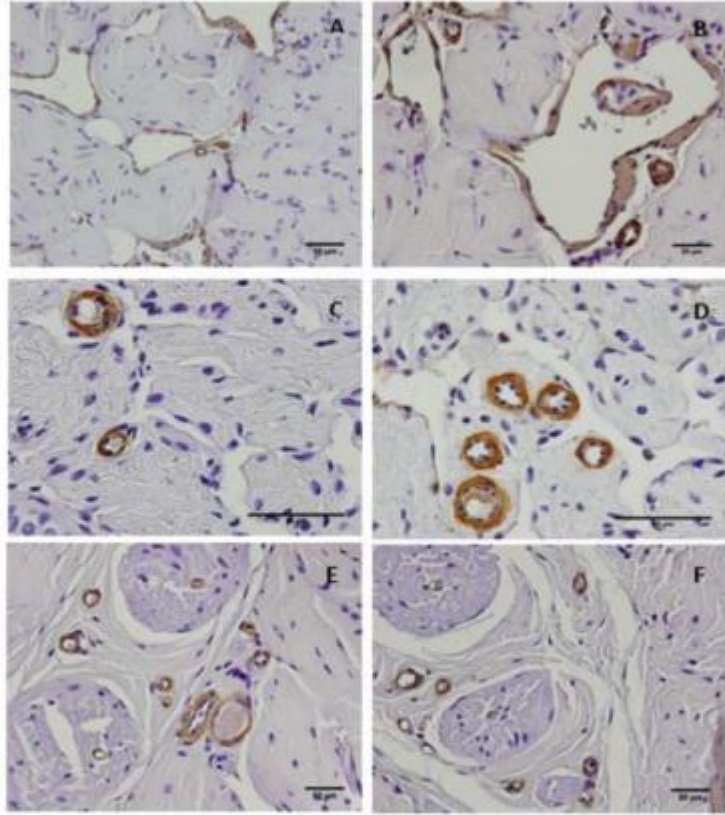
A (SC/SC group) and **B** (VitD/VitD group): Percentage of elastic system fibers in the dorsal artery (DA), X600. The VitD/VitD group showed a 30% reduction in the percentage of elastic fibers in DA when compared to the SC/SC group.

Wiegert's fucsin-resorcin technique with previous oxidation by oxone.

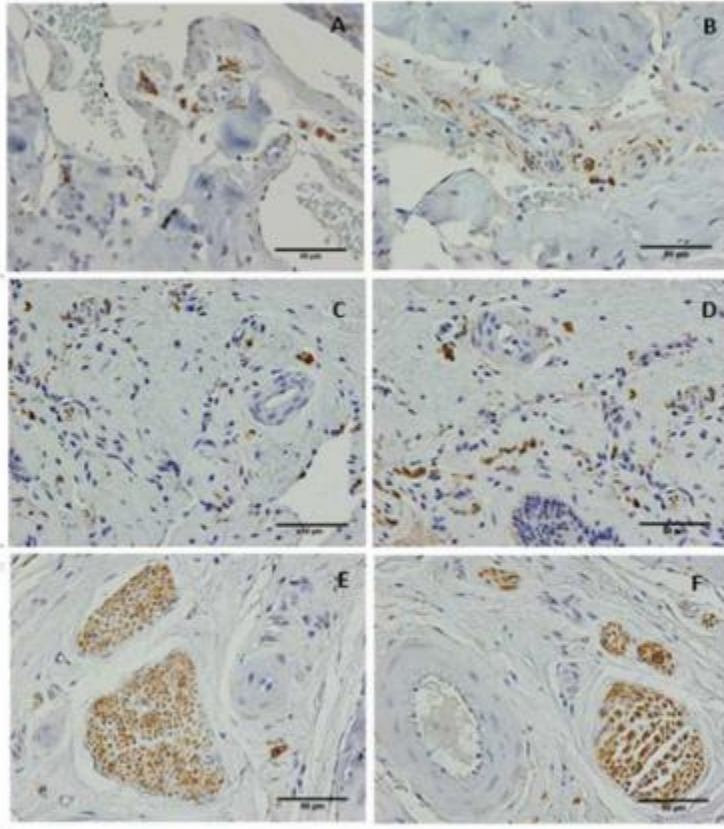
E. Figure(s): #_Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)



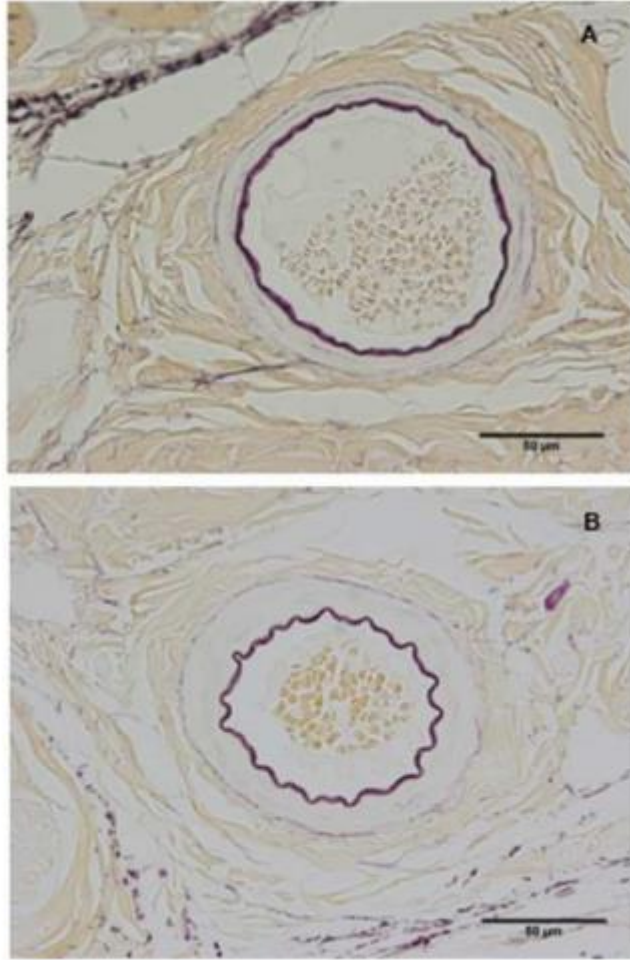
E. Figure(s): #_Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



E. Figure(s): #_Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)



E. Figure(s): #_Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)



F. Table(s): #_Table1

TABLE 1

Table 1- Composition of the diets.

Nutrient (g/Kg)	SC AIN93G	VID AIN93G	SC AIN93M	VID AIN93M
Corn starch	397.48	397.48	465.69	465.69
Casein	200.00	200.00	140.00	140.00
Dextrinized starch	132.00	132.00	155.00	155.00
Sucrose	100.00	100.00	100.00	100.00
Soya bean oil	70.00	70.00	40.00	40.00
Fiber	50.00	50.00	50.00	50.00
L cystine	3.00	3.00	1.80	1.80
Choline	2.50	2.50	2.50	2.50
Antioxidant	0.014	0.014	0.008	0.008
Mineral mix	35.00	35.00	35.00	35.00
Calcium carbonate	357.00	357.00	357.00	357.00
Vitamin mix	10.00	10.00	10.00	10.00
Vitamin D3 (400.00 UI/g) - (g/Kg Mix)	0.25	0.00	0.25	0.00
Total	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Energy (Kcal)	3950.00	3950.00	3803.00	3803.00
Glycogen (%)	64.00	64.00	76.00	76.00
Proteins (%)	19.00	19.00	14.00	14.00
Lipids (%)	17.00	17.00	10.00	10.00

SC-AIN93G, standard diet; VID-AIN93G, vitamin D restricted diet; SC-AIN93M, diet for adult maintenance; VID-AIN93M vitamin D restricted diet for adult maintenance. All the nutrients corresponded to the recommendations of American Institute of Nutrition for rodents (AIN93G e AIN93M).

F. Table(s): #_Table2

TABLE 2

Table 2- Biometric and biochemical parameters, mothers of the SC and VitD groups.

Parameters	SC	VitD	p
Food intake (g/animal/day)	22.40 ± 2.17	22.02 ± 2.03	ns
Energy intake (KJ/animal/day)	376.50 ± 48.73	364.00 ± 33.79	ns
Total weight (g)	55.10 ± 12.33	52.50 ± 20.17	ns
Food intake in lactation (g/day/animal)	41.62 ± 8.59	40.85 ± 5.87	ns
Energy intake in lactation (KJ/day/animal)	687.90 ± 142.10	675.10 ± 97.03	ns
Glycemia in the last gestational week (mmol/L)	5.30 ± 0.56	5.10 ± 0.58	ns
Glycemic weaving (mmol/L)	6.52 ± 1.61	6.97 ± 2.31	ns
Insulin (µU/L)	19.17 ± 14.13	27.96 ± 7.69	ns
25-OHD3 (ng/ml)	67.64 ± 12.00	28.50 ± 2.20	< 0.0001

25-OHD3, 25-hydroxy vitamin D3; ns, not significant. Data were presented as mean ± standard deviation. Significant differences between groups are indicated in the table, as determined by unpaired t-test, p<0.05.

F. Table(s): #_Table3

TABLE 3

Table 3 - Parameters of animals (pups) at 4 months of age.

Parameters	SC/SC	VitD/VitD	<i>p</i>
Food intake (g/animal/day)	19.09 ± 3.98	18.91 ± 4.18	ns
Energy intake (KJ/animal/day)	309.8 ± 62.46	306.3 ± 64.69	ns
Food Efficiency (g/KJ)	1.17 ± 0.12	1.15 ± 0.10	ns
SBP (mmHg)	164.00 ± 11.11	189.1 ± 8.08	< 0.0001
Glucose (mmol/L)	6.04 ± 2.08	11.26 ± 4.15	0.0096
AUC of OGTT (arbitrary units)	836.5 ± 61.15	933.7 ± 49.79	0.0248
Insulin (μU/L)	21.50 ± 8.75	33.76 ± 3.52	0.0072
HOMA-IR	8.28 ± 1.39	15.53 ± 0.54	<0.0001
25 OH D3 (ng/ml)	73.71 ± 8.86	28.74 ± 0.20	<0.0001
Epididymal Fat (g)	5.93 ± 1.05	7.69 ± 1.75	0.0228
Perirenal fat (g)	6.80 ± 1.00	8.61 ± 1.96	0.0489
Subcutaneous Fat (g)	4.11 ± 1.11	5.90 ± 1.40	0.0075
Adiposity index (%)	3.96 ± 0.62	5.58 ± 1.16	0.0025

SC/SC standard diet group in the perinatal and postnatal periods; VitD/VitD, diet restricted group in vitamin D in the perinatal and postnatal periods; SBP, systolic blood pressure; AUC, area under the OGTT curve; OGTT, Oral Glucose Tolerance Test; HOMA-IR, homeostasis evaluation model; 25-OH D3, 25-hydroxyvitamin D3; ns, not significant. Data were presented as mean ± SD. Significant differences between the groups are indicated with the symbols (*p* < 0.05) as determined by the unpaired *t*-test.

F. Table(s): #_Table4

TABLE 4

Table 4. Offspring's penis parameters at 4 months of age

Parameters	SC/SC	VitD-/VitD-	p
Morphometry			
Area DA (μm^2)	7398.00 \pm 1617.00	7654.00 \pm 954.30	ns
TM DA (μm^2)	3263.00 \pm 742.00	4758.00 \pm 801.70	0.0156
Lumen of DA (μm^2)	4632.00 \pm 1533.00	2442.00 \pm 628.30	0.004
TM of DA / Lumen DA	0.91 \pm 0.05	2.41 \pm 0.15	<0.0001
Nuclear density TM DA (nuclei/ μm^2)	0.007 \pm 0.002	0.004 \pm 0.001	ns
Elastic fibers DA (%)	24.93 \pm 5.90	19.05 \pm 7.39	0.0073
Height of internal elastic lamina DA (μm)	2.17 \pm 0.70	1.56 \pm 0.48	<0.0001
DDV (μm^2)	281608.00 \pm 123697.00	117532.00 \pm 25959.00	0.0010
Vessels CC (%)	2.44 \pm 1.19	3.50 \pm 2.26	0.0061
Vessels CS (%)	3.08 \pm 1.08	4.73 \pm 1.12	<0.0001
Vessels DR (%)	12.58 \pm 9.84	9.25 \pm 5.78	0.047
Nerves CC (%)	7.37 \pm 4.28	8.01 \pm 3.07	ns
Nerves CS (%)	10.92 \pm 5.27	12.27 \pm 5.14	ns
Nerves DR (%)	22.22 \pm 8.51	16.79 \pm 7.73	<0.0001

SC / SC standard diet group; VitD / VitD, diet restricted group in vitamin D; DA, dorsal artery; TM of DA, tunica media of the dorsal artery; DDV, deep dorsal vein; CC, corpus cavernosum; SC, corpus spongiosum; DR, dorsal region; ns, not significant. Data were presented as mean \pm SD. Differences between groups were tested with unpaired t-test. The level of significance was set at $p < 0.05$.