

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ADRIANA DE ASSIS DAMASCENO

**“REPERCUSSÕES DO DIABETES GESTACIONAL NO
DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA DE RATOS:
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA, PERFIL DE PROLIFERAÇÃO E
REMODELAÇÃO ESTROMAL”**

Uberlândia- MG

2013

ADRIANA DE ASSIS DAMASCENO

**“REPERCUSSÕES DO DIABETES GESTACIONAL NO
DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA DE RATOS:
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA, PERFIL DE PROLIFERAÇÃO E
REMODELAÇÃO ESTROMAL”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso

Uberlândia- MG

2013

Aos meus pais Francisco e Regina e aos meus irmãos Juliana, Samanta e Tiago, sempre presentes na minha vida.

Ao meu esposo Rafael, pelo apoio, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dra. Rejane Maira Góes, Dra. Maria Etelvina Pinto, Dr. Ricardo Alexandre Fochi e Dr. Renato Simões Cordeiro pela disponibilidade de participação na banca avaliadora e contribuição à qualidade deste trabalho.

À Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro que como orientadora foi uma pessoa muito importante neste caminho de aprendizagem, sempre me auxiliando nas dificuldades encontradas. Além disso, agradeço pela paciência e compreensão em relação a diversos aspectos.

À estudante Camila Perdoncini Carvalho pela sua disponibilidade e carinho no auxílio com muitos experimentos.

Aos técnicos do laboratório de Histologia Fabrício, Ester e Rosiane pelo auxílio.

À Profa. Dra. Ana Paula Balbi pela colaboração e fornecimento dos animais dos grupos experimentais.

À Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho e seu orientado Erickson Bezerra dos Santos pelas análises das enzimas de controle do estresse oxidativo.

À Marina Guimarães Gobbo pela colaboração na realização do método de TUNEL.

RESUMO

O diabetes gestacional é definido como qualquer grau de redução da tolerância à glicose, cujo início ou detecção ocorre durante a gravidez, podendo ou não persistir após o parto. Estudos indicam que a prole de mães diabéticas exibe mudanças anormais no desenvolvimento, bem como desordens metabólicas. A próstata é uma glândula andrógeno-dependente e altamente sensível aos distúrbios hormonais e também às variações de glicemia. Estudos recentes mostram que o diabetes causa drástica atrofia na próstata de roedores, interfere na proliferação e apoptose de células epiteliais, altera a expressão de receptores androgênicos e leva à importante remodelação estromal. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos efeitos posteriores do diabetes no desenvolvimento embrionário da próstata. Este estudo é relevante pelo fato de não existirem trabalhos que evidenciem os efeitos do diabetes no desenvolvimento da próstata de ratos cujas mães eram diabéticas. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a próstata de ratos adultos cujo desenvolvimento embrionário ocorreu sob influência do diabetes materno. O diabetes foi induzido em ratos Wistas fêmeas prenhas com uso de injeção intraperitoneal de aloxana (100mg/kg de peso corporal). Os ratos machos proles de mães diabéticas (PD) ou normais (PC) foram mortos com 12 semanas de idade e a próstata ventral foi removida, pesada e fixada. A próstata foi avaliada para histologia geral, freqüência de fibras colágenas, morte celular (TUNEL), imunohistoquímica (fibroblastos, fibronectina, células musculares lisas, proliferação celular - PCNA); western blotting (PCNA, metaloproteinases - MMP-2 e -9, receptores de andrógeno, AKT), zimografia e atividade antioxidante total e catalase. A próstata dos animais PD apresentou menor peso em relação ao grupo PC e esses animais também apresentaram hiperglicemia e redução significativa de testosterona. A proliferação celular, bem como os níveis de AR e AKT, foram maiores nos ratos proles de mães diabéticas. A avaliação dos componentes estromais mostrou que o grupo PD apresentou redução de α -actina, enquanto a vimentina e fibronectina não apresentaram alteração. A zimografia detectou que a atividade de MMP-2 está aumentada nos animais PD, embora a distribuição dessa MMP tenha sido menor nesse grupo. Esse dado esteve associado à significativa diminuição de colágeno. A próstata da prole de ratas diabéticas apresentou ainda reduzida atividade de catalase e atividade antioxidante total. Os resultados indicam que os ratos que passaram por um ambiente diabético durante o seu desenvolvimento apresentam alterações glicêmicas e hormonais que impactam em modificações estruturais na próstata ventral. Dentre elas, destaca-se maior proliferação celular desencadeada por AR e AKT e reorganização estromal, que foi caracterizada por maior atividade de MMP-2 e degradação de

colágeno, podendo interferir na arquitetura tecidual e na homeostase glandular. Além disso, o estroma é afetado negativamente pela diminuição de células musculares lisas, podendo prejudicar a contração da glândula bem como nas interações epitélio-estromais estimuladas por essas células. Esse trabalho mostra ainda que o diabetes gestacional pode aumentar o estresse oxidativo através da redução na atividade de enzimas de controle.

Palavras-chave: Diabetes. Próstata. Proliferação celular. Metaloproteinase.

ABSTRACT

Gestational diabetes is defined as any degree of reduction of glucose tolerance, whose early detection occurs during pregnancy and may or may not persist after delivery. Studies indicate that the offspring of diabetic mothers display abnormal changes in development as well as metabolic disorders. The prostate gland is androgen-dependent and highly sensitive to hormonal disorders as well as to changes in blood glucose. Recent studies have shown that diabetes causes drastic atrophy in the prostate of rodents, interferes with the proliferation and apoptosis of epithelial cells, alters expression of androgen receptor and leads to significant stromal remodeling. However, little is known about the effects of diabetes later in embryonic development of the prostate. This study was important because there are no studies that show the effects of diabetes on the development of prostate rats whose mothers were diabetic. The aim of this study was to evaluate the organization of epithelial and stromal prostate of adult rats whose embryonic development was under the influence of gestational diabetes. Diabetes was induced in Wistar pregnant females rats by intraperitoneal injection of alloxan (100mg/kg body weight). Male rats offspring of diabetic (PD) and normal mothers (PC) were killed at 12 weeks of age and the ventral prostate was removed, weighed and fixed. The prostate was evaluated for general histology, frequency of collagen fibers, cell death (TUNEL), immunohistochemistry (fibroblasts, fibronectin, smooth muscle cells, cell proliferation - PCNA), western blotting (PCNA, metalloproteinases - MMP-2 and -9, androgen receptors, AKT), zymography and total antioxidant activity and catalase. The prostate of PD animals showed lower weight compared to the PC group and these animals also exhibited hyperglycemia and a significant reduction of testosterone. Cell proliferation as well as the levels of AKT and AR were higher in the offspring of diabetic mothers. The stromal analysis showed that the PD group showed a reduction of α -actin, while vimentin and fibronectin did not change. The activity of MMP-2 is increased in PD animals, although the distribution of this MMP was lower in this group. This finding was associated with a significant decrease in collagen distribution. The prostate of the offspring of diabetic rats also showed reduced activity of catalase and total antioxidant activity. The results indicate that rats that developed in a diabetic environment have glycemic and hormonal changes that impact on structural changes in the ventral prostate. Among them, there is greater cell proliferation triggered by AR and AKT and stromal remodeling, which was characterized by increased activity of MMP-2 and collagen degradation. This situation may interfere with tissue architecture and homeostasis glandular. Moreover, the stroma is negatively affected by a decrease in smooth

muscle cells, possibly impairing the contraction of the gland as well as the epithelium-stroma interaction stimulated by these cells. This work also shows that gestational diabetes may increase oxidative stress by reducing the activity of enzymes control.

Keywords: Diabetes. Prostate. Cell proliferation. Metalloproteinase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Parâmetros biométricos (média ± desvio padrão) referentes ao peso corporal, glicemia e frequência relativa (%) dos componentes teciduais da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD).	32
Figura 1 - Diagrama da seção frontal e sagital do trato genital masculino ilustrando a posição anatômica da próstata adulta e sua subdivisão em zonas.	20
Figura 2 - Interação parácrina epitélio-estroma na próstata.	23
Figura 3 - Gráfico de análise do peso da próstata (mg) e das dosagens plasmáticas de testosterona (ng/dL) e estrógeno (mg/dL) em ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD).	33
Figura 4 - Cortes histológicos da próstata ventral em ratos filhotes de mães controle e diabéticas após coloração de Hematoxilina-Eosina, Picrossirius-Hematoxilina e imunohistoquímica para PCNA.	34
Figura 5 - Frequência relativa (%) de áreas estromais contendo α -actina de músculo liso, vimentina e fibronectina na próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD).	35
Figura 6 - Cortes histológicos da próstata ventral em ratos filhotes de mães controle e diabéticas após imunohistoquímica para α -actina de músculo liso, fibronectina e imunofluorescência para vimentina.	36
Figura 7 - Cortes histológicos da próstata ventral em ratos filhotes de mães controle e diabéticas após imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9.	37
Figura 8 - Western blotting para quantificação de α -actina de músculo liso e vimentina em extratos proteicos da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD).	38
Figura 9 - Western blotting para quantificação de PCNA, AR e AKT em extratos proteicos da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD).	39
Figura 10 - Western blotting (A) e zimografia (B) de MMP-2 e MMP-9 em extratos proteicos da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD).	39
Figura 11 - Análise do sistema de controle do estresse oxidativo através da atividade da enzima catalase e da atividade antioxidante total na próstata ventral de animais filhotes de ratas controle (PC) e diabéticas (PD).	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína Quinase B
AR	Receptores de Andrógeno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFU
CML	Células Musculares Lisas
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CY3	Fluorocromo Cianina 3
DAB	Diaminobenzidina
DHEA	Dihidroepiandrosterona
DHT	5-alfa-dihidrotestosterona
DMI	<i>Diabetes mellitus</i> tipo I
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etlenodiamino Tetra-Acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto Férrico
FGF-7	Fator de Crescimento de Fibroblasto - 7
FGF-10	Fator de Crescimento de Fibroblasto - 10
GST	Enzima Glutationa-S-Transferase
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IOD	Densidade Óptica Integrada
LA	Lobo Anterior

LD	Lobo Dorsal
LH	Hormônio Luteinizante
LL	Lobo Lateral
LV	Lobo Ventral
MMP	Metaloproteinase de Matriz Extracelular
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz tipo 2
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz tipo 9
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Cloreto de Sódio
NOD	Non-Obese Diabetic mice
PBS	Tampão fosfato
PC	Ratos machos proles de mães normais (grupo controle)
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PD	Ratos machos proles de mães diabéticas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIA	Atrofia Inflamatória Proliferativa
PIN	Neoplasia Intra-epitelial Prostática
Pi3K	Fosfoinositídeo 3 Quinase
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Gel de Dodecil Sulfato de Sódio e Poliacrilamida
TA	Temperatura Ambiente
TACs	Células amplificadoras em trânsito
TBST	Tampão Tris-salina acrescido de Tween 20
TdT	Enzima Deoxinucleotidil Terminal Transferase
TGF β	Fator de Transformação do Crescimento tipo Beta

TIFF Tagged Image File Format (Formato de Arquivo de Imagem Rotulado)
TPTZ Complexo Ferro-Tripiridiltiazina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. <i>Diabetes mellitus</i>	17
2.2. Estrutura da próstata	19
2.3. Fisiologia da próstata	22
2.4. Desenvolvimento da próstata	23
2.5. Diabates e próstata	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Animais e delineamento experimental	26
3.2. Processamento para microscopia de luz e estereologia	26
3.3. Análise imunohistoquímica e imunofluorescência	27
3.4. Análise da apoptose pelo método do TUNEL	28
3.5. Determinação do Índice de proliferação celular e apoptose	28
3.6. Western blotting	29
3.7. Extração de MMP e zimografia de gelatina	29
3.8. Dosagens hormonais	30
3.9. Avaliação do sistema de controle do estresse oxidativo	30
3.10. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Analise biométrica, hormonal e estereológica	32
4.2. Ensaio imunohistoquímico	35
4.3. Western blotting e gel de zimografia	38
4.4. Estresse oxidativo	40
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) ...	61

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* é considerado um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo em função de sua crescente incidência e dos prejuízos para a qualidade de vida das pessoas afetadas. A prevalência desta doença tem aumentado dramaticamente nos últimos anos (YE et al., 2011). De acordo com estimativa da Federação Internacional de Diabetes (2012), estima-se que a prevalência mundial de diabetes aumente de 371 milhões em 2012 para 500 milhões em 2030. No Brasil, estima-se que há aproximadamente 13 milhões de diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012).

Existem diversos trabalhos indicando que o diabetes altera o sistema reprodutor masculino tanto em seres humanos quanto em animais de laboratório (BURKE et al., 2007). Os problemas na função sexual masculina relacionam-se com a diminuição da libido, impotência sexual e diminuição da qualidade do sêmen, associado com alterações morfológicas nas glândulas sexuais acessórias, dentre elas, a próstata (FRENKEL et al., 1978; SCARANO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008; DAUBRESSE et al., 1978 apud FONTÃO et al., 2009).

Considerando que a próstata é uma glândula dependente de andrógenos, o diabetes interfere na fisiologia desse órgão, promovendo mudanças hormonais que causam prejuízos à função reprodutora masculina. Além disso, o diabetes afeta o sistema imunológico do indivíduo, que fica vulnerável ao desenvolvimento de inflamação crônica, como a prostatite (CALLE; FERNANDES, 2012). O aumento de citocinas decorrente das inflamações e também a hiperglicemia intermitente podem causar ou estimular lesões benignas como a neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) que podem evoluir para neoplasias malignas (RIBEIRO et al., 2006, 2008; GROSSMANN; WITTERT, 2012). Embora o impacto negativo do diabetes na próstata seja bem descrito na literatura, não se sabe os efeitos que o diabetes gestacional pode exercer durante o desenvolvimento intrauterino da glândula e se o ambiente hiperglicêmico prejudica a formação e maturação pós-natal da próstata.

Tendo em vista a alta incidência de diabetes na população mundial, em especial o diabetes gestacional, é importante avaliar os efeitos desta desordem no organismo, principalmente na próstata, uma vez que uma redução drástica nos níveis de testosterona está associada ao diabetes. Existem diversos estudos que analisam o efeito do diabetes na próstata de animais adultos, demonstrando alterações no epitélio e no estroma, alguns inclusive relatam também aumento na incidência de neoplasias nesta glândula em roedores diabéticos (RIBEIRO et al., 2006, 2008; GROSSMANN; WITTERT, 2012). Porém não existem

trabalhos que evidenciem os efeitos desta doença no desenvolvimento da próstata de ratos cujas mães eram diabéticas.

Desta forma, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a próstata de ratos adultos cujo desenvolvimento embrionário ocorreu sob influência do diabetes materno. Para alcançar esses objetivos foram abordadas as seguintes estratégias:

- Analisar o impacto do diabetes no desenvolvimento epitelial e estromal da próstata;
- Determinar os níveis de proliferação, morte celular e receptores androgênicos na formação epitelial prostática.
- Avaliar o comportamento estromal da glândula frente a essa condição diabética no desenvolvimento embrionário, investigando fibras colágenas, fibroblastos, fibronectina, células musculares lisas, MMP-2 e MMP-9.
- Avaliar o sistema de controle do estresse oxidativo na próstata.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Diabetes mellitus*

O diabetes é uma doença de etiologia múltipla que afeta o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, decorrente de lesões nas ilhotas de Langerhans do pâncreas (MIGLIORINI; KETTELHUT, 1999). Segundo Robbins (1989 apud RIBEIRO et al., 2008), a característica básica do diabetes é a hiperglicemia crônica, consequência da secreção anormal de insulina no pâncreas ou da ineficiente ação da insulina nos tecidos alvos, ou seja, da incapacidade da insulina exercer adequadamente suas ações (TAVARES et al., 2011).

De forma geral, a glicemia é controlada pela ação oposta dos hormônios insulina e glucagon. A insulina é liberada no sangue pelas células beta (células- β) do pâncreas em resposta aos níveis crescentes de glicemia como, por exemplo, após uma refeição (ANDERSON; SULEIMAN; GARRET, 1994). A ação mais conhecida da insulina é a de aumentar a captação de glicose na maioria dos tecidos periféricos, principalmente fígado, tecido adiposo e células musculares e, por conseguinte, reduzir o nível de glicose no sangue. Além disso, ela aumenta a síntese protéica e lipídica, garantindo energia para utilização futura (FUCHS; WANNMACHER, 1992). De forma oposta, o glucagon estimula a produção de glicose através da glicogenólise hepática ou da gliconeogênese, contribuindo assim para manter a glicemia durante estados de utilização de glicose rápida ou jejuns, respectivamente (WOODS et al., 2006).

Há dois principais tipos de diabetes. O tipo 1 é caracterizado por um déficit de insulina devido à destruição das células beta do pâncreas por processos autoimunes ou idiopáticos. Esta doença geralmente é diagnosticada em indivíduos jovens, sendo necessárias injeções diárias de insulina como tratamento (LERNMARK, 1985). Por outro lado, no diabetes tipo 2 a insulina é produzida normalmente, porém sua ação é ineficiente, o que é conhecido como resistência insulínica. Esta resistência é uma condição na qual “um nível normal de insulina provoca uma resposta subnormal” (KIM et al., 2011), ou seja, os tecidos periféricos não conseguem responder adequadamente à insulina gerando uma menor captação de glicose. Em consequência dessa resistência tecidual e hiperglicemia, há um aumento compensatório da secreção de insulina pelo pâncreas, com o objetivo de manter a glicemia dentro dos valores normais. (HANSEN, 1999; SCHINNER et al., 2005). Porém, como afirma Bell e Polonsky (2001), se essas células falham na adaptação à nova demanda de insulina ocorre piora no quadro de resistência à insulina e, consequentemente, desenvolvimento do

diabetes tipo 2. Esse tipo de diabetes é a forma mais comum, representando cerca de 90% dos casos de diabetes, e resulta de uma complexa interação gene/ambiente, havendo vários fatores de risco, tais como: idade, sexo, etnia, história familiar, obesidade, sedentarismo e hipertensão (NOBLE et al., 2011).

Os principais sintomas do *diabetes mellitus* são hiperglicemia, polidipsia (sede aumentada), poliúria (aumento do volume urinário), perda de peso às vezes associado à polifagia (fome excessiva) e visão turva (MIRANZI et al., 2008; AMORIM et al., 2011). Em longo prazo, há disfunção e falência de vários órgãos, incluindo complicações como retinopatia com potencial perda de visão; neuropatia periférica, principal causa não traumática de amputação de membros inferiores; hipertensão; aterosclerose e risco de infarto do miocárdio; manifestações de disfunção do sistema nervoso autônomo e disfunção sexual (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010). Além desses efeitos sistêmicos bem descritos para o diabetes, destacam-se também prejuízos no sistema genital masculino. Tem sido demonstrado que o diabetes diminui o número de células de Leydig e também diminui a síntese de andrógenos por elas. Juntos, esses efeitos causam um prejuízo da libido masculina (FOGLIA et al., 1969). Além disso, o número de espermatozoides está reduzido bem como o peso das glândulas sexuais acessórias, fato que certamente está relacionado à baixa fertilidade observada em indivíduos que apresentam diabetes descompensada (OKSANEN, 1975; CARVALHO et al., 2003).

Além desses dois tipos de diabetes, há também o diabetes materno, também conhecido como diabetes gestacional, definido como qualquer grau de redução da tolerância à glicose, cujo início ou detecção ocorre durante a gravidez, podendo ou não persistir após o parto (WEINERT et al., 2011; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). A prevalência desta doença situa-se entre 1% e 14%, variando de acordo com a população estudada e com os critérios diagnósticos utilizados (DETSCH et al., 2011). No Brasil, estima-se que aproximadamente 7,6% das gestantes desenvolvam este tipo de diabetes (PADILHA et al., 2010; DETSCH et al., 2011).

De maneira similar ao diabetes tipo 2, o diabetes gestacional é associado tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β pancreáticas, que são incapazes de satisfazer as necessidades orgânicas crescentes de insulina (KRZYZANOWSKA et al., 2008). Este tipo de diabetes implica aumento do risco de complicações durante a gestação, tanto para a mãe quanto para o feto. As complicações mais freqüentes para a gestante são a ruptura prematura de membranas, o parto pré-maturo e a pré-eclâmpsia (DETSCH et al., 2011; WEINERT et al., 2011). Além disso, o diabetes gestacional representa

um aumento no risco de diabetes tipo 2 posterior à gestação. Para o feto, há maior risco de macrossomia, hiperglicemia, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, policitemia, distocia de ombro, síndrome de desconforto respiratório e morte perinatal (LIRA; DIMENSTEIN, 2010). Alguns estudos apontam que filhotes de ratas diabéticas exibem mudanças anormais em seu perfil lipídico bem como desordens metabólicas (BARBALHO et al., 2011). Além disso, a prole de mulheres com diabetes durante a gravidez possui risco aumentado de desenvolver hipertensão e outras doenças cardiovasculares (VAMBERGUE; FAJARDY, 2011). As consequências do diabetes durante a gravidez não são confinadas à vida fetal e neonatal. Dados epidemiológicos mostram que as consequências se estendem para a vida adulta e até mesmo para a próxima geração (JELODAR; KHAKSAR; POURAHMADI, 2009). Adaptações nutricionais precoces, como na vida intrauterina, podem trazer mudanças permanentes ao metabolismo dos carboidratos, resultando em um distúrbio no adulto. O alto peso ao nascimento é um fator predisponente para a resistência insulínica, obesidade e diabetes tipo 2 (SILVA et al., 2009).

Estudos anteriores sugerem que a exposição pré-natal ao ambiente diabético intrauterino está associada com a diminuição da tolerância à glicose e ao diabetes tipo 2 nos filhotes (BERGMAN; FINEGOOD; KAHN, 2002; SILVERMAN et al., 1995 apud BADR et al., 2013). Além disso, os fetos de mães com diabetes gestacional possuem um risco de maior estresse oxidativo, que subsequentemente induz a produção de radicais de oxigênio altamente reativos, os quais são tóxicos para as células (KAMATH et al., 1998).

Embora os efeitos negativos do diabetes gestacional na prole já sejam bem descritos na literatura recente, tanto em humanos quanto em roedores, o impacto dessa desordem no desenvolvimento intrauterino da próstata ainda é desconhecido.

2.2. Estrutura da próstata

A próstata é uma glândula acessória exócrina, componente do trato genital masculino de mamíferos e situa-se abaixo da bexiga, circundando a parte proximal da uretra pélvica (PRICE, 1963). A principal função desta glândula, de acordo com Hayward e Cunha (2000), é secretar as proteínas e íons que formam a maior parte do fluido seminal, que fornece aos espermatozóides condições ideais de sobrevivência e viabilidade durante e após a ejaculação (PRICE, 1963).

A próstata humana é subdividida em zonas segundo denominação proposta por McNeal (1988), através de estudos anatômicos e histológicos (Figura 1). Desta forma, há três

regiões prostáticas bastante distintas designadas zona de transição, zona central e zona periférica. A zona central consiste de uma porção de tecido glandular circundando os dutos ejaculatórios, constituindo aproximadamente 25% da próstata normal. A zona periférica é a maior região da próstata humana, abrangendo aproximadamente 70% do volume desta glândula. Os outros 5% de tecido prostático remanescentes formam a zona de transição. Já em roedores, esta glândula é formada por quatro pares de lobos bilateralmente simétricos designados de anterior (LA), ventral (LV), lateral (LL) e dorsal (LD) (PRICE, 1963; JESIK; HOLLAND; LEE, 1982). Observa-se considerável heterogeneidade quanto à histologia e sensibilidade androgênica entre os diferentes lobos, sendo o lobo ventral o que apresenta resposta mais semelhante à próstata humana (PRINS, 1992).

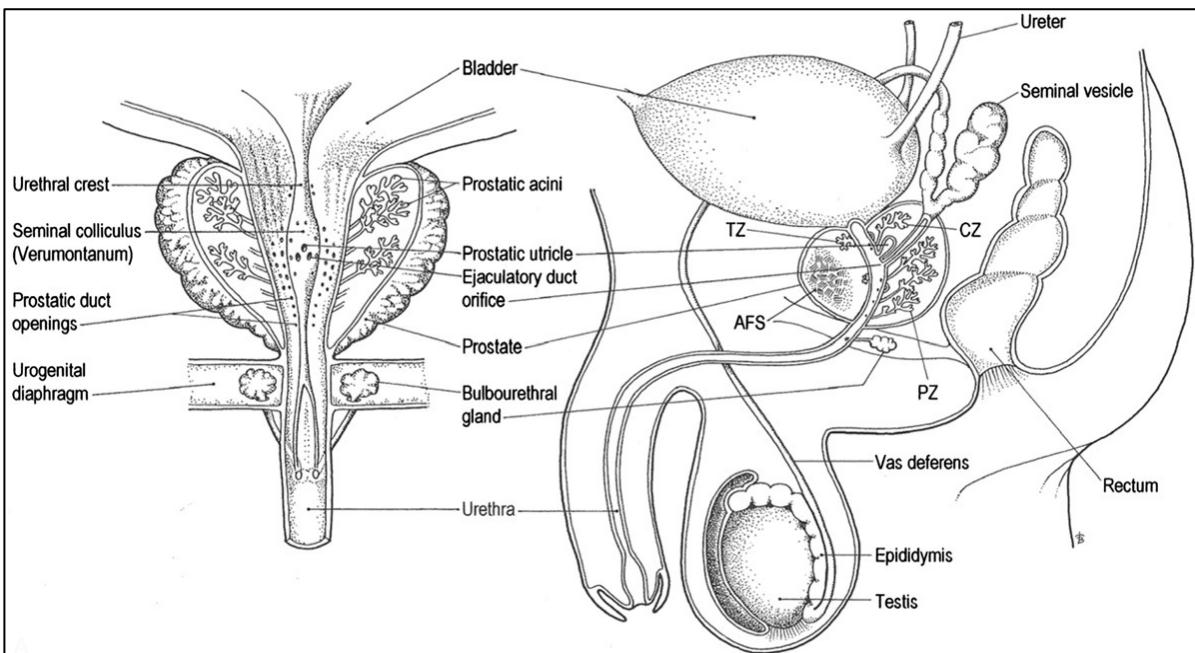


Figura 1. Diagrama da seção frontal e sagital do trato genital masculino ilustrando a posição anatômica da próstata adulta e sua subdivisão em zonas (CZ - zona central; PZ - zona periférica e TZ - zona de transição). Fonte: Timms e Hofkamp, 2011.

A próstata é composta por túbulos e ácinos secretores, possuindo um componente epitelial e outro estromal (MCNEAL, 1988). No epitélio secretor, há ao menos seis tipos de células, que apresentam fenótipo distinto e função específica: células-tronco, células basais, células transit-amplify (TACs), células intermediárias, células luminais secretoras e células neuroendócrinas (ISAACS; COFFEY, 1989; DE MARZO et al., 1998; SCHALKEN; VAN LEENDERS, 2003; SINGH et al., 2006). As células basais e as células-tronco são aquelas que funcionam como pool de renovação celular do epitélio (LANG; FRAME; COLLINS, 2009). Já as células intermediárias e as TACs exibem uma intensa capacidade de proliferação e são

responsáveis pela amplificação celular e diferenciação em células luminais. As principais células do epitélio prostático são as luminais secretoras (MIKI, 2010). Em roedores, estas são células colunares altas, com núcleo alongado e abundante retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, sendo as responsáveis pela secreção do fluido prostático (HUDSON, 2003).

O estroma é formado por uma região subepitelial que possui fibroblastos e fibras colágenas localizadas continuamente em uma ou duas camadas, seguida de uma região rica em células musculares lisas rodeando os ácinos secretores (AUMULLER; SEITZ, 1990; LIN; BISSEL, 1993). Os fibroblastos sintetizam os componentes da matriz extracelular, enquanto as células musculares lisas são responsáveis pela contração da glândula e pela interação epitélio-estromal (CUNHA; COOKE; KURITA, 2004). A matriz extracelular é um ambiente dinâmico formado por um complexo arranjo de proteínas fibrilares, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, como a laminina e a fibronectina (TUXHORN et al., 2002). Associados a esses elementos da matriz encontram-se também fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias das atividades celulares. Dessa forma, ao sintetizar a matriz extracelular, as células influenciam a morfogênese, maturação e homeostase do órgão (OKAMURA et al., 2008; WONG; TAM, 2002 apud RIBEIRO; TABOGA; GÓES, 2009). Os fibroblastos, por exemplo, sintetizam várias moléculas da matriz, cuja sinalização é de fundamental importância na manutenção da homeostase e também na invasão celular maligna (AUMULLER; SEITZ, 1990; GOBBO et al., 2012a).

A remodelação estromal é um evento desencadeado pela degradação e síntese de componentes da matriz extracelular. As metaloproteinases (MMPs) compreendem uma família de enzimas que degradam a matriz extracelular com uma ampla gama de substratos e desempenham um papel crucial nos processos fisiológicos normais e estados de patologia, incluindo angiogênese e metástase (GRANT et al., 1999; VELASCO et al., 1999; PARK; REIZES; BERNFIELD, 2000; MARCHENKO; STRONGIN, 2001). A clivagem proteolítica de componentes da matriz extracelular pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento pós-natal da próstata e também no desenvolvimento de patologias na glândula, não apenas por resultar em remodelação estromal, mas também pela liberação de sinais que estimulam a angiogênese, migração e proliferação/diferenciação celular (XU et al., 2001). Um exemplo disso é a expressão aumentada das enzimas MMP-2 e MMP-9 em muitos tumores. Atualmente, tem sido demonstrada uma correlação positiva entre o aumento da produção de MMPs e a progressão do câncer de próstata (NAGAKAWA et al., 2000 apud BRUNI-CARDOSO et al., 2008).

2.3. Fisiologia da próstata

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente altamente sensível aos distúrbios hormonais e que apresenta alta capacidade de resposta a hormônios, principalmente aos andrógenos (CUNHA; COOKE; KURITA, 2004). Andrógenos são cruciais para a proliferação celular, a diferenciação e o funcionamento normal da próstata (SIMANAINEN et al., 2009). Além disso, sua ação mediada pelos receptores de andrógeno (AR) é essencial para indução da diferenciação epitelial prostática durante o desenvolvimento embrionário e maturação pós-natal (VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO et al., 2006). Corroborando estas informações, Hayward e Cunha (2000) mostraram que o desenvolvimento do tecido prostático não é determinado somente pelo sexo genético fetal, mas sim por exposição embrionária a andrógenos.

O principal andrógeno circulante no homem é a testosterona (KIM et al., 2011), sendo a sua maior porção produzida pelos testículos e apenas 5% gerados pelo precursor de andrógenos, a dihidroepiandrosterona (DHEA) nas adrenais (LABRIE et al., 2001). Na próstata, o andrógeno biologicamente ativo é a 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT), que é produzida pela conversão local da testosterona pela enzima 5-alfa-redutase (HAYWARD; CUNHA, 2000). Foram descritas duas formas desta enzima, que são designadas tipo 1 e tipo 2, sendo esta última considerada a mais específica para as células epiteliais prostáticas (THOMAS et al., 2005). Tanto a testosterona quanto a DHT podem se ligar ao receptor de andrógeno, localizado no núcleo das células epiteliais e estromais, porém a DHT forma um complexo mais estável com o receptor, sendo sua ação mais potente que a da testosterona (HUANG; TINDALL, 2002). A conversão da testosterona em DHT representa um mecanismo de amplificação androgênica dentro da próstata (SIMANAINEN et al., 2009).

Em condições fisiológicas normais, a secreção das células epiteliais é estimulada diretamente pela ligação dos andrógenos aos receptores epiteliais. Assim, a ação direta de receptores de andrógeno nas células epiteliais resulta na diferenciação de células epiteliais luminais e regula a transcrição de produtos protéicos que são requeridos para a função secretora da próstata, tais como o antígeno prostático específico (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986; GAO; ISAACS, 1998; YUAN; BALK, 2009; CUNHA et al., 1998 apud ARCOLINO et al., 2010). Já a proliferação no epitélio acinar é indiretamente controlada via estimulação androgênica de células estromais, que secretam fatores de crescimento tais como EGF, FGF-7, FGF-10 e IGF-1. Essas andromedinas atuam no epitélio, ativando a proliferação de TAC e sendo também essenciais para a sobrevivência de células luminais

(UZGARE et al., 2004 apud ARCOLINO et al., 2010). Esse mecanismo, que ocorre desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta, é chamado de interação epitélio-estroma (Figura 2).

Ao lado de andrógenos, outros hormônios como insulina, glicocorticóides e estrogênio também têm impacto nesta glândula, sendo importantes na sua regulação fisiológica (CLEUTJENS, 1997 apud RIBEIRO et al., 2008).

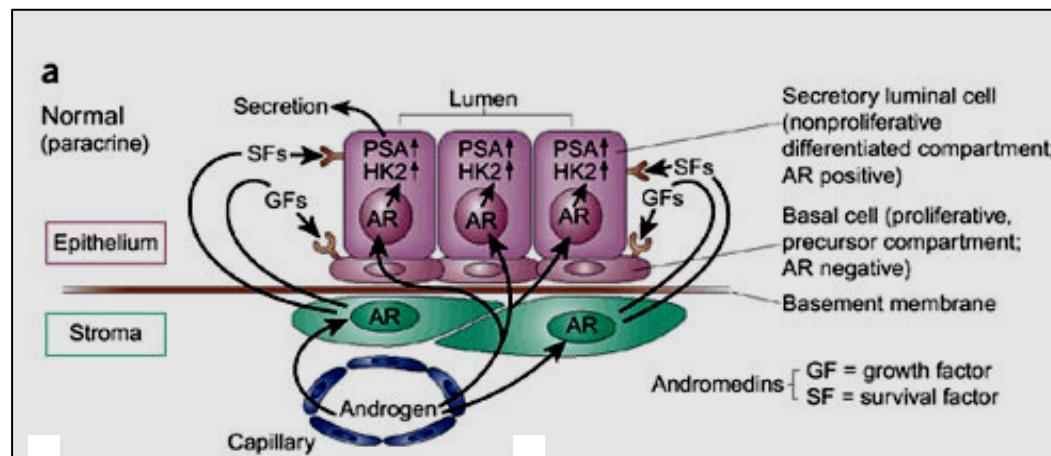


Figura 2. Interação parácrina epitélio-estroma na próstata. Fonte: Isaacs e Isaacs, 2004.

2.4. Desenvolvimento da próstata

A próstata se desenvolve a partir do seio urogenital, que surge em roedores machos e fêmeas aproximadamente 13 dias após a concepção (HAMILTON et al., 1959 apud BRUNI-CARDOSO et al., 2008). Entretanto, em roedores, assim como em humanos, importantes eventos pós-natais têm impacto no desenvolvimento final da próstata (HAYWARD; CUNHA, 2000; VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006; BRUNI-CARDOSO; CARVALHO, 2007). Este desenvolvimento inclui crescimento epitelial, ramificação e canalização (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986). A canalização resulta ou ocorre simultaneamente com a diferenciação do epitélio.

O evento inicial na morfogênese desta glândula resulta em sólidos cordões epiteliais no mesênquima circundante (FLICKINGER, 1970; TIMMS et al., 1994 apud BRUNI-CARDOSO et al., 2008). No nascimento, esses cordões se alongam dentro do mesênquima, começando a bifurcar e enviar ramos laterais e também a canalizar (BRUNI-CARDOSO; CARVALHO, 2007). Depois do nascimento, a próstata ventral de ratos apresenta um crescimento complexo e progressivo. Um estudo revelou um precoce aumento pós-natal no

peso da próstata (crescimento inicial), um período de repouso entre a quarta e sexta semana pós-natal, no qual o crescimento da glândula segue o do corpo e, a partir da sétima semana, um crescimento puberal até a idade adulta (VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006). Segundo esse estudo, da primeira à terceira semana pós-natal, há a formação do lúmen, que é preenchido com material de secreção, e também a diferenciação de células epiteliais, com a formação de cordões na primeira semana e organização progressiva de uma camada epitelial simples. O lúmen torna-se o principal compartimento na próstata. Da terceira à sexta semana pós-natal não há mudança histológica evidente. A partir da sexta semana já há invaginações epiteliais e brotos acinares. Da décima a décima segunda semana há um alargamento do lúmen, com distensão epitelial, desaparecendo as invaginações e brotos. Em relação à testosterona, sua concentração é baixa até a quinta semana, sofre um aumento da sexta a oitava semana e atinge seu pico na nona semana após o nascimento. Assim, o pico de testosterona a partir da quinta semana é responsável pela diferenciação da atividade secretora da glândula.

Assim, de acordo com o exposto, há um desenvolvimento pós-natal da próstata até a décima semana e um crescimento glandular na fase puberal, que é altamente influenciada pela testosterona. O crescimento puberal da próstata é caracterizado por um fenômeno de duas fases. Primeiramente, há uma resposta proliferativa com a formação de invaginações e/ou brotos epiteliais. Segundo, há um marcado aumento na acumulação de secreção no lúmen devido à estimulação da atividade sintética (VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006). Então, o aumento do nível de testosterona da fase puberal estimula a atividade secretora das células epiteliais existentes. O crescimento do lúmen é imediato, dado a acumulação de material de secreção produzido pelo epitélio. Ao mesmo tempo, o mesmo aumento de testosterona no plasma estimula um segundo conjunto de células epiteliais a proliferar e então diferenciar amadurecendo o epitélio acinar.

A diferenciação epitelial na próstata ocorre em paralelo ao desenvolvimento do estroma. Andrógenos atuam nos receptores de andrógenos no mesênquima urogenital para induzir a proliferação epitelial, ramificação ductal e diferenciação de células epiteliais (MARKER et al., 2003). O desenvolvimento epitelial, por sua vez, dirige a diferenciação da musculatura lisa no estroma. Uma das funções dos andrógenos é manter a musculatura lisa que rodeia a uretra como uma fina camada, permitindo que o brotamento inicial atinja o mesênquima urogenital e haja desenvolvimento da próstata (THOMPSON et al., 2002 apud VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006).

2.5. Diabetes e próstata

Muitas das alterações observadas no sistema reprodutor masculino, causadas pelo diabetes, são decorrentes da diminuição de testosterona. O diabetes promove um acometimento do sistema hipofisário-gonadal causando distúrbio na secreção dos hormônios que estimulam a síntese de andrógenos pelos testículos (BHASIN et al., 2007 apud PETROIANU et al., 2009; IKEDA et al., 2000 apud ARCOLINO et al., 2010). Além disso, o diabetes causa mudanças moleculares nas células de Leydig, responsáveis pela síntese de tais hormônios. Desse modo, há uma associação direta entre as funções sexuais masculinas e a síntese inadequada de testosterona decorrentes do diabetes (DINUOVIC; RADONJIC, 1990 apud PETROIANU et al., 2009).

Estudos recentes mostram que o diabetes causa drástica atrofia na próstata de roedores, interfere na proliferação e apoptose de células epiteliais, altera expressão de receptores androgênicos e leva à importante remodelação estromal (RIBEIRO et al., 2006; RIBEIRO; TABOGA; GÓES, 2009; ARCOLINO et al., 2010; GOBBO et al., 2012a). Os mecanismos que levam a estas alterações não são totalmente conhecidos, mas são, ao menos parcialmente, relacionados à diminuição no nível de testosterona e também a hiperglicemia. De acordo com estudo de Ribeiro e outros (2006), o diabetes promove redução no peso da próstata ventral e atrofia no epitélio secretor em camundongos adultos, indicando que a ausência de insulina, a hiperglicemia e a queda androgênica devido ao diabetes afetam o funcionamento da glândula.

A remodelação estromal também é uma resposta prostática comum ao diabetes, envolvendo mudanças morfológicas nas células musculares lisas e aumento na quantidade de fibras colágenas e elementos da matriz extracelular, como condroitim sulfato e fibronectina. Tais modificações comprometem as características teciduais e prejudicam a homeostase, que garante as funções normais da glândula (CARVALHO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008; RIBEIRO; TABOGA; GÓES, 2009). Essas mudanças podem ser interpretadas como resultado da diminuição do nível de testosterona (SOUDAMANI et al., 2005). Além da próstata, tem sido demonstrado que esta doença causa mudanças na organização, secreção e volume dos componentes da matriz extracelular de outros tecidos como rins, retina e vasos sanguíneos, prejudicando o seu correto funcionamento e causando patologias sistêmicas (MCLENNAN et al., 2007; WU et al., 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e delineamento experimental

No presente estudo foi utilizada a próstata de ratos machos Wistar (*Rattus novergicus*, variedade *albinus*), com três meses de idade (400-500g; n=10). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclo claro-escuro (12 horas), com livre acesso à água e à dieta sólida de ração em grãos (Purina®) no biotério do ARFIS- UFU.

Para a indução do *diabetes mellitus* tipo I (DMI) nas fêmeas prenhas, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas, com fornecimento de água “ad libitum”. A seguir, elas receberam injeção intraperitoneal de aloxana (5,6 Dioxuracil monohidrato, Sigma, EUA) em dose única de 100mg/kg de peso corporal, suspensa em 0,1ml de solução fisiológica 0,9%. Os animais controle (n=10) foram submetidos apenas à injeção intraperitoneal de solução fisiológica. A indução foi realizada um dia após o cruzamento (indicado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal). Decorridos três dias da indução, a glicemia foi testada pelo sistema de fitas “one touch” com o uso do glicosímetro Accu-Chek (Roche), a partir de gota de sangue retirada da pata do animal, segundo as instruções dos fabricantes. Para o grupo diabético, foram utilizadas apenas as fêmeas que apresentaram glicemia de jejum acima de 150mg/dl. Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados através de dose profunda de ketamina/xilasina para remoção da próstata ventral. O peso corpóreo e os níveis glicêmicos foram avaliados no momento do sacrifício em todos os grupos.

Todos os procedimentos, manutenção e manuseio dos animais ao longo do estudo foram baseados nos princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA – (CEUA/UFU, Análise 133/11, Protocolo 043/11 – ANEXO A).

3.2. Processamento para microscopia de luz e estereologia

Após a remoção e pesagem da próstata ventral, os fragmentos teciduais foram fixados por imersão em solução de Metacarn (metanol, ácido acético, clorofórmio, 6:3:1), por três horas em geladeira, para processamento de rotina histológica em parafina. Os cortes histológicos da próstata ventral foram corados em hematoxilina-eosina (HE) para estudos

gerais do tecido e em picrosírius-hematoxilina para estudo das fibras colágenas. O material foi avaliado e documentado em fotomicroscópio Leica acoplado com fotodocumentador.

A fração volumétrica de cada elemento como epitélio, lúmen e estroma foram estimadas por estereologia, utilizando software de análise de imagens (Image-Pro Plus C – Media Cybernetics version 4.5 for Windows software, Maryland, USA). Cinco animais por grupo e três fragmentos de próstata foram utilizados por animal. Doze imagens foram digitalizadas de campos microscópicos contíguos por animal, no aumento de 40X para epitélio, lúmen e estroma. Essas áreas foram estimadas através do método de contagem de pontos de Weibel et al. (1963) com aplicação de um retículo de 130 pontos. Foram contados os pontos que tocaram cada elemento analisado, que foi posteriormente expresso em freqüência relativa (%).

Para a análise da freqüência de fibras colágenas foram usadas 10 imagens de cortes corados com Picosírius-hematoxilina por animal ($n=5$), totalizando 50 campos visuais/grupo. A quantificação dessas áreas de colágeno foi realizada com a ferramenta de contraste e limite de threshold usando o programa Image J (National Institute of Health, USA), e a densidade integrada de pixel foi sistematicamente quantificada como porcentagem de área marcada (freqüência relativa).

3.3. Análise imunohistoquímica e imunofluorescência

Os cortes em parafina foram submetidos à reação imunohistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), vimentina (para fibroblastos), alfa-actina de músculo liso, fibronectina, MMP-2 e MMP-9. Resumidamente, foi realizada recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 92°C por 20 minutos, seguido de um bloqueio de peroxidases endógenas com H_2O_2 3% em etanol durante 15 minutos. Posteriormente, foi realizada incubação em background sniper (Biocare Medical) durante 10 minutos para bloqueio de interações inespecíficas entre proteínas. Após lavagem em TBST, os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em BSA 1%: mouse anti-PCNA de humano (Santa Cruz Biotechnology- sc56, 1:100, 1h a 37°C), mouse anti-vimentina de humano (Santa Cruz Biotechnology- sc 6260, 1:100, overnight, 4°C), mouse anti-alfa-actina de músculo liso de humano (Santa Cruz Biotechnology- sc 32251, 1:100, overnight, 4°C), mouse anti-fibronectina de humano (FKBiotec – IQ 011 –, 1:100, 1h30, 37°C), rabbit anti-MMP-2 de humano (Abcam – Ab54401, 1:100, 1h30, TA) e mouse anti-MMP-9 de humano (Santa Cruz Biotechnology – sc 21733, 1:100, overnight, 4°C). A detecção foi realizada com anticorpo

secundário na forma de Polímero conjugado à peroxidase (Envision System – Dako) por 45 minutos. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os cortes contracorados com hematoxilina. No caso da imunofluorescência para vimentina, foi utilizado anticorpo secundário anti-mouse conjugado à CY3 por 1h e as lâminas foram montadas em glicerol. O controle negativo foi obtido com a omissão do anticorpo primário.

A distribuição relativa dos componentes estromais (alfa-actina, vimentina e fibronectina) foi estimada por estereologia, utilizando software de análise de imagens Image-Pro Plus anteriormente mencionado. Foram utilizados cinco animais por grupo e 10-15 imagens foram digitalizadas de campos microscópicos contíguos por animal, no aumento de 40X. Essas áreas foram estimadas através do método de contagem de pontos de Weibel (1963) com aplicação de um retículo de 130 pontos. Foram contados os pontos que tocaram cada elemento analisado, que foi posteriormente expresso em freqüência relativa (%).

3.4. Análise da apoptose pelo método do TUNEL

As células apoptóticas foram detectadas *in situ* utilizando-se o ensaio da fragmentação de DNA associada à morte celular, baseado na reação do TUNEL, segundo as instruções do fabricante (TdT-Fragel-Calbiochem). Resumidamente, após a digestão com proteinase K (1:100 em 10mM Tris pH 8.0) por 23 minutos em temperatura ambiente, os cortes histológicos foram imersos em uma solução de H₂O₂ 3% em metanol, durante cinco minutos, para inativação da peroxidase endógena. Sequencialmente, foram incubados com TdT-biotinilada e com a enzima deoxinucleotidil terminal transferase (TdT) por 1h a 37°C. Após o término da reação, os nucleotídeos biotinilados foram detectados usando peroxidase/estreptoavidina conjugada e a marcação revelada pela diaminobenzidina. Os cortes foram contrastados com hematoxilina. Os controles negativos foram obtidos omitindo-se a incubação com a enzima TdT.

3.5. Determinação do Índice de proliferação celular e apoptose

As células proliferativas e apoptóticas foram determinadas de acordo com a contagem de células positivas para PCNA e TUNEL, respectivamente. Para isso, foram utilizados pelo menos cinco animais de cada grupo e foram capturados 15 campos visuais de cada corte histológico de próstata, em aumento de 400X, sendo contadas no mínimo 2000

células. O Índice representa o valor de células positivas dividido pelo número total de células contadas em todos os campos, expresso em porcentagem.

3.6. Western blotting

Cinco fragmentos de próstata ventral de ambos os grupos foram congelados e homogeneizados em 5ml Tris-HCL 1M pH 7,4, 5ml NaCl 5M, 0,5ml Triton X100, 10ml glicerol e 1% coquetel inibidor de proteases (Sigma – P8340). Após homogeneização, o extrato permaneceu incubando por 1h a 4°C e posteriormente centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Polipeptídeos dos extratos de próstata (100µg de proteína) foram separados por gel de SDS-PAGE (12%) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose por 2h a 4°C. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas por 1h com BSA 5% em temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos primários de humano (mouse anti-alfa-actina de músculo liso – 1:500; mouse anti-vimentina – 1:500; mouse anti-PCNA – 1:300; mouse anti-MMP-2 – 1:500; mouse anti-MMP-9 – 1:500, rabbit anti-AR – 1:400; rabbit anti-AKT total – 1:500; e mouse anti-β-actina – 1:500) overnight, a 4°C sob agitação constante. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse ou anti-rabbit diluídos 1:5000 em BSA 1% por 1 hora. As bandas de proteínas foram detectadas por sistema de revelação quimioluminescente (ECL system, GE Healthcare) e revelados em filme de raio x (Kodak). Para quantificar a intensidade das bandas de proteínas, os filmes foram escaneados, salvos como arquivo TIFF e analisados usando software Image J (National Institute of Health, USA). A β-actina foi usada como controle interno das corridas e os valores das densitometrias foram todos normalizados pela sua densitometria da β-actina.

3.7. Extração de MMP e zimografia de gelatina

Também foi realizada a zimografia, técnica que verifica a atividade das metaloproteinases de matriz extracelular. Cinco fragmentos de próstata ventral de ambos os grupos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,2M de NaCl, Triton 10%, 10mM de CaCl₂ e 1% de inibidores de proteases (Sigma). As amostras homogeneizadas foram incubadas por 2h a 4°C e então centrifugadas a 10000 rpm por 20min a 4°C. O

conteúdo de proteínas dos sobrenadantes foi mensurado através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Um total de 50 μ g de proteína de cada amostra foi usado para eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% contendo 0,1% de gelatina (usada como substrato das MMPs). A corrida foi realizada em ambiente a 4°C sob condições não redutoras. Após a eletroforese, o gel foi lavado em Triton X-100 2,5% em PBS sob agitação em TA por 30 minutos para remoção do SDS. Então, o gel foi incubado overnight com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo 10 nM de CaCl₂ e 0,1M de NaCl a 37°C, sob agitação constante. Posteriormente, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R (solução de 0,5% contendo 20% de metanol e 10% de ácido acético) por 1h. As bandas não coradas, indicando a atividade gelatinolítica, foram observadas após a descoloração do gel com solução de etanol 30% e ácido acético 10%. A análise quantitativa das bandas foi realizada por densitometria, usando o programa Image J (National Institute of Health, USA). Os valores de atividade determinados para o grupo controle foram usados como referência (100%). Os experimentos com as cinco amostras de cada grupo foram realizados em duplicata.

3.8. Dosagens hormonais

Amostras de sangue, coletadas no momento da eutanásia através de punção cardíaca, foram centrifugadas e estocadas a -20°C para posterior análise. Os níveis de testosterona e estrógeno foram quantificados por ELISA Captura/Sanduíche (anticorpo-antígeno-anticorpo) utilizando kits comerciais específicos (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). O kit para a Testosterona tem sensibilidade de 0,030 ng/mL e do Estrógeno de 4,84 pg/mL. As leituras foram realizadas em leitor SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, CA, EUA). Foram utilizados pelo menos cinco animais de cada grupo experimental e cada amostra foi analisada em triplicata.

3.9. Avaliação do sistema de controle do estresse oxidativo

A atividade da catalase foi determinada através da degradação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) monitorada espectrofotometricamente a 240nm (AEBI, 1984). Uma unidade (U) de catalase foi definida como a quantidade da enzima que degrada 1 μ mol de substrato (H₂O₂) por minuto. O volume final foi de 1ml e as concentrações do meio reacional foram: tampão fosfato 50mM pH 7,2, EDTA 0,5mM e H₂O₂ 10mM. Em uma cubeta de quartzo, o sobrenadante do homogeneizado tecidual foi misturado com água e a Δ A240 foi

registrada para os cálculos. A reação foi disparada após adição e homogeneização de 100 μ L da solução de H₂O₂ 100 mM e a ΔA_{240} foi acompanhada entre 0 a 60 segundos. Para a quantificação da atividade da catalase do homogeneizado da próstata ventral usamos 10 μ L do sobrenadante tendo um fator de diluição de 100 vezes.

A atividade antioxidante total foi avaliada por meio da redução do ferro no seu estado férrico (Fe³⁺) para seu estado ferroso (Fe²⁺) em pH baixo, através da formação do complexo ferro-tripiridiltriazina (TPTZ) de coloração azul intensa, lido espectofotometricamente a 593nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Os reagentes incluem tampão acetato de sódio (300 mM/L⁻¹, pH 3.6), e 16ml de C₂H₄O₂ por litro de tampão; 10 mmol/L⁻¹ de TPTZ acrescido de HCl a 40 mmol/L⁻¹ e cloreto férrico (FeCl₃.6H₂O) a 20 mM, preparado em tampão acetato de sódio (300 mM/L⁻¹, pH 3.6). O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se 25ml de tampão acetato de sódio, 2,5ml da solução de TPTZ e 2,5ml da solução de FeCl₃.6H₂O, sendo aquecido a 37°C por cinco minutos. Na microplaca foram adicionados 10 μ l da amostra, 25 μ l de água destilada e 250 μ l do reagente de trabalho, incubados a 37°C por seis minutos. A absorbância foi mensurada em espectofotômetro a 593nm utilizando uma leitora de microplaca (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). A atividade antioxidante total foi calculada baseada em uma curva padrão construída com trolox, nas concentrações de 1000, 800, 400, 200, 100 e 50 μ M. Com exceção do tampão acetato, os reagentes foram preparados no dia do experimento.

Para ambas as análises foram usados cinco animais de cada grupo experimental e as atividades foram quantificadas em triplicata.

3.10. Análise estatística

Todos os valores numéricos dessa investigação foram avaliados estatisticamente por teste t-Student ou teste Mann Whitney, escolhidos de acordo com a homogeneidade das amostras, com o uso do programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Análise biométrica, hormonal e estereológica

Os ratos machos filhotes de mães diabéticas (PD) apresentaram um aumento significativo de 48% nos níveis de glicose sanguínea em relação aos filhotes de mães normais (PC), enquanto o peso corporal não variou significativamente entre os grupos (Tabela 1).

A análise hormonal mostrou que houve uma diminuição expressiva nos níveis plasmáticos de ambos os esteroides nos filhotes de mães diabéticas (Figura 3). Foi possível notar que os níveis de testosterona reduziram mais de 50%, enquanto os níveis de estrógeno reduziram mais de três vezes. A Figura 3 mostra ainda que o peso da próstata ventral reduziu 36% nos filhotes de mães diabéticas em comparação aos animais controle.

Os dados da análise estereológica demonstram que não há alterações expressivas no epitélio e estroma da próstata dos animais filhotes de ratas diabéticas (Tabela 1). Entretanto, notou-se significativa diminuição de 15% na frequência relativa do lúmen no grupo PD em relação ao PC (Tabela 1; Figura 4A e 4B). Em relação às fibras colágenas, houve uma diminuição significativa de cerca de 30% na próstata ventral dos ratos PD. A distribuição destas fibras pode ser observada na Figura 4 (4C e 4D), que comprova morfologicamente as alterações descritas na análise estereológica.

Tabela 1: Parâmetros biométricos (média ± desvio padrão) referentes ao peso corporal, glicemia e frequência relativa (%) dos componentes teciduais da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD). * diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$).

	Peso corporal (g)	Glicemia (mg/dL)	Estereologia (%)			IOD (%)
			Epitélio	Lúmen	Estroma	
PC	$344,4 \pm 18,0$	$99,0 \pm 2,7$	$24,5 \pm 1,3$	$54,0 \pm 1,9$	$21,5 \pm 1,5$	$1,7 \pm 0,10$
PD	$359,0 \pm 4,8$	$146,2 \pm 19,7^*$	$26,7 \pm 1,2$	$46,7 \pm 2,7^*$	$26,6 \pm 2,4$	$1,2 \pm 0,08^*$

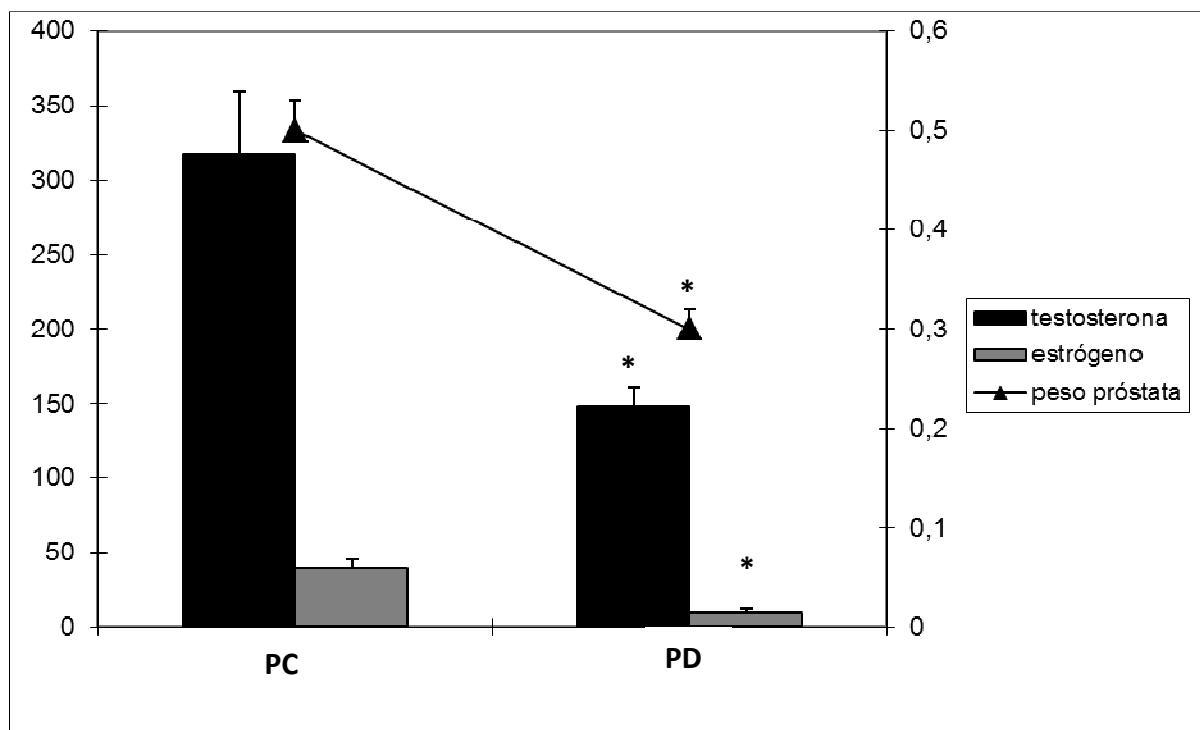


Figura 3. Gráfico de análise do peso da próstata (mg) e das dosagens plasmáticas de testosterona (ng/dl) e estrógeno (mg/dl) em ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD). Os valores são expressos em média \pm desvio padrão. * diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

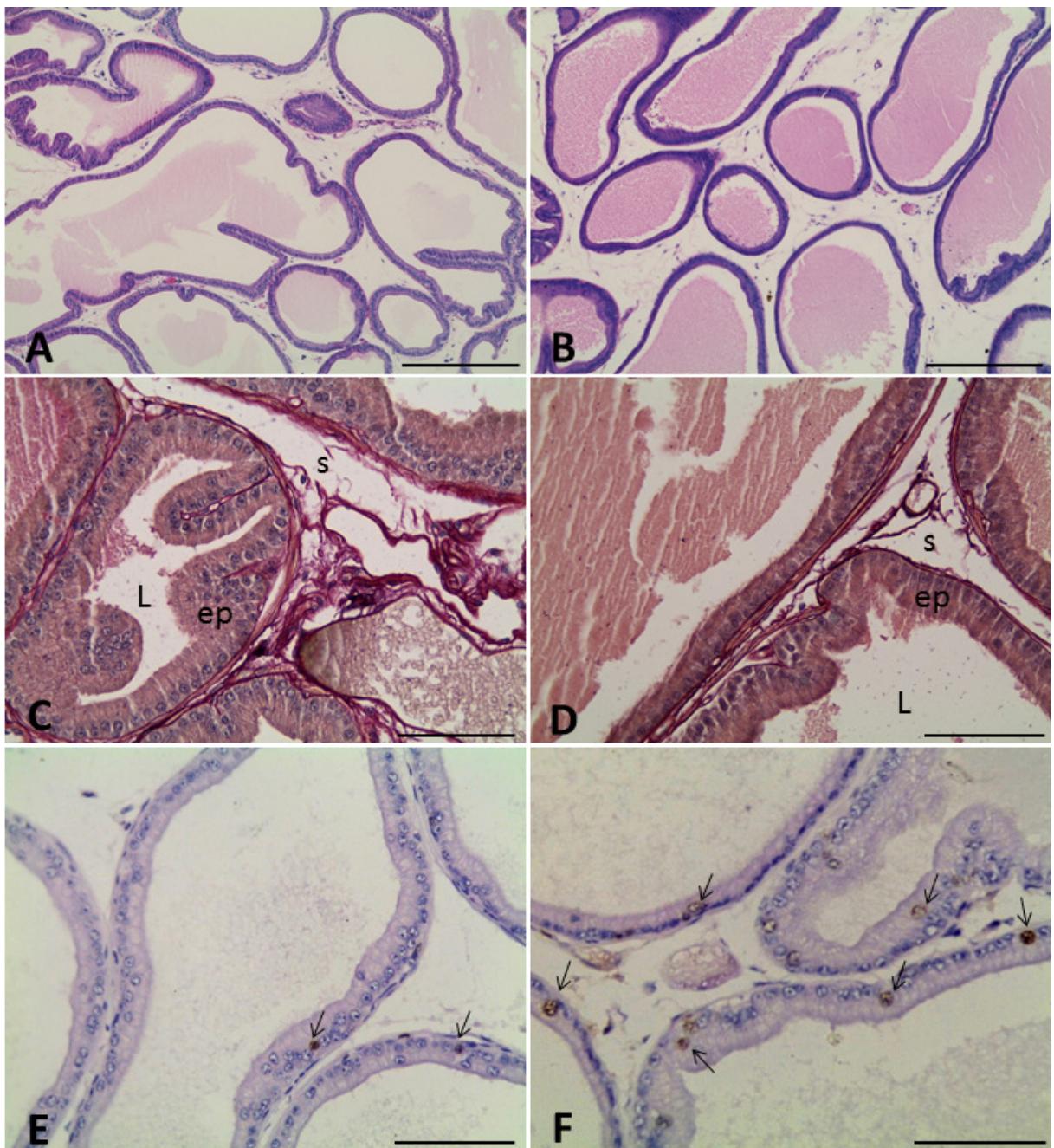


Figura 4. Cortes histológicos da próstata ventral em ratos filhotes de mães controle (A, C e E) e diabéticas (B, D e F) após coloração de Hematoxilina-Eosina (A, B), Picrossirius-Hematoxilina (C, D) e imunohistoquímica para PCNA (E, F). A análise geral dos ácinos não mostrou alterações morfológicas significativas, exceto pela diminuição da amplitude do lúmen em PD. No estroma (S), notamos uma significativa diminuição da distribuição de fibras colágenas em PD, especialmente no espaço interacinar. A imunohistoquímica para PCNA mostra expressivo aumento de células em proliferação no epitélio da próstata do grupo PD (setas). ep – epitélio acinar; L – lúmen; S – estroma. Barras de escala: A e B = 200 µm; C, D, E e F: 50 µm.

4.2. Ensaio imunohistoquímico

Na análise de proliferação celular, feita através de imunohistoquímica para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), o qual é altamente expresso no núcleo durante a fase S do ciclo celular, foi possível verificar um expressivo aumento de células em proliferação no epitélio secretor da próstata do grupo PD (Figura 4, E e F). O Índice de proliferação (células positivas em relação ao total de células) mostrou um aumento de cerca de três vezes ($0,73\% \pm 0,12$ e $2,73\% \pm 0,27$; PC e PD respectivamente, $p = 0,0000$). Em relação ao Índice de apoptose, não houve alteração entre os grupos estudados ($0,63\% \pm 0,12$ e $0,50\% \pm 0,12$; PC e PD respectivamente, $p = 0,45$).

A distribuição de células musculares lisas (α -actina de músculo liso) e de fibroblastos (vimentina) foi observada na região subepitelial envolvendo todos os ácinos (Figura 6A, B, E, F). Por outro lado, a fibronectina foi encontrada no espaço interacinar do estroma prostático em ambos os grupos (Figura 6, C e D). A frequência relativa de fibroblastos exibiu um aumento de 103,5% na próstata dos filhotes de mães diabéticas quando comparados ao grupo controle, enquanto para a distribuição de células musculares lisas e fibronectina não foi observada alteração significativa entre os grupos (Figuras 5 e 6).

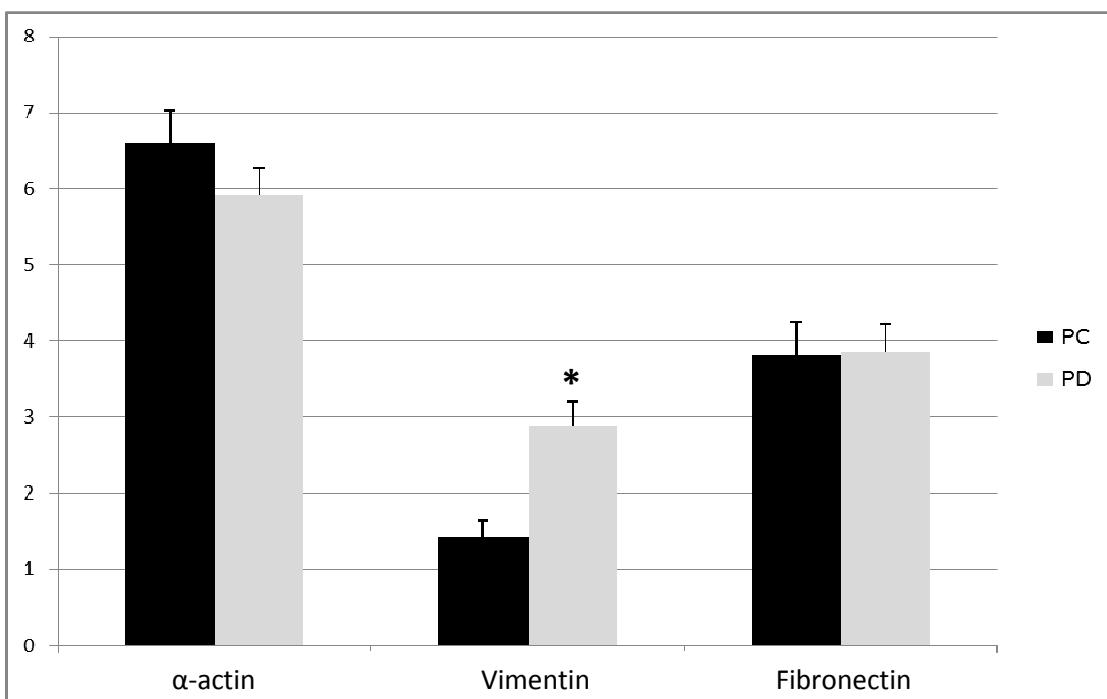


Figura 5. Frequência relativa (%) de áreas estromais contendo α -actina de músculo liso, vimentina e fibronectina na próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD). Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão.
*diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

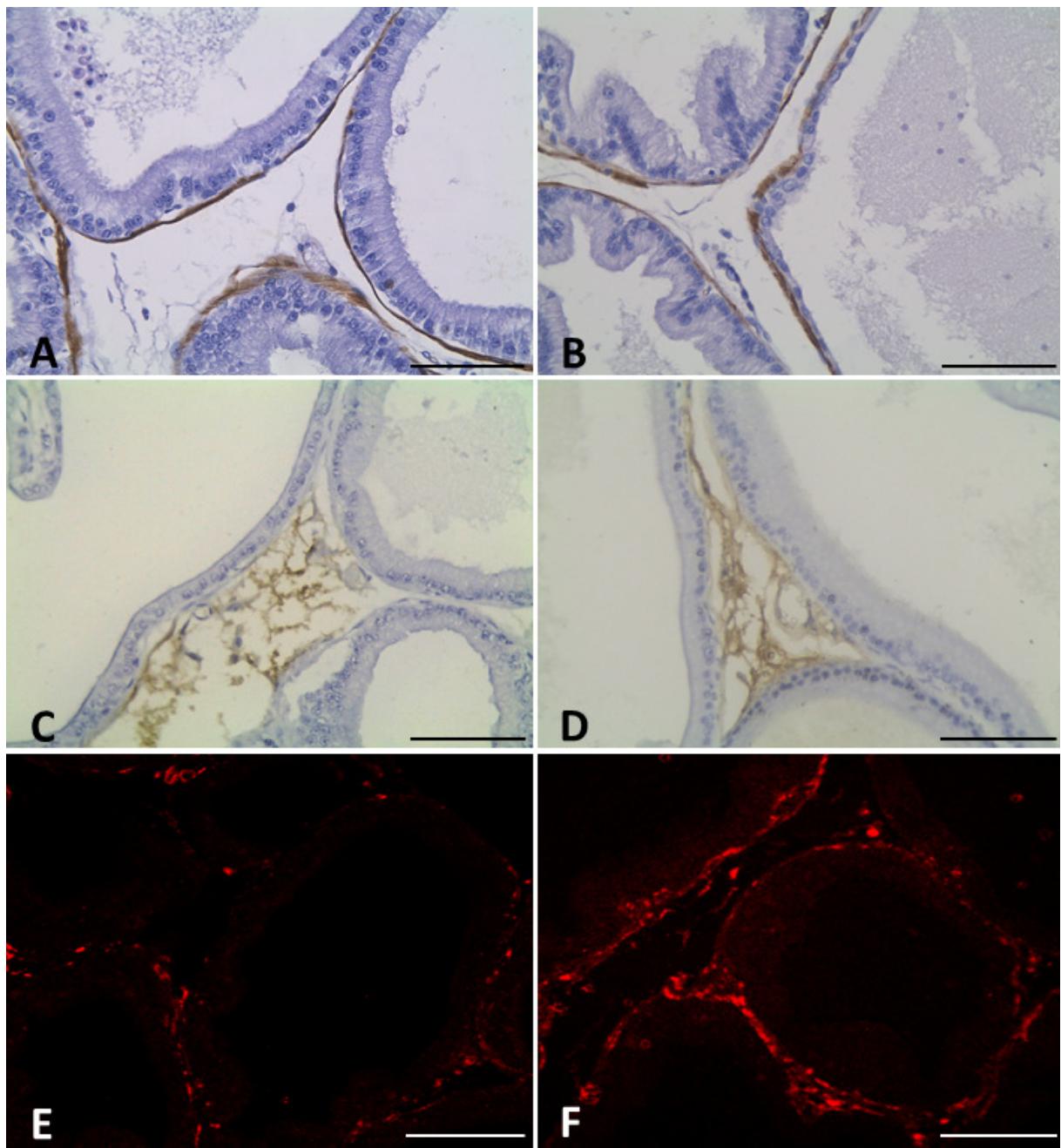


Figura 6. Cortes histológicos da próstata ventral em ratos filhotes de mães controle (A, C e E) e diabéticas (B, D, F) após imunohistoquímica para α -actina de músculo liso (A, B), fibronectina (C, D) e imunofluorescência para vimentina (E, F). A próstata dos animais PD não apresenta alteração na distribuição de células musculares lisas nem de fibronectina (A-D). Entretanto, em relação aos fibroblastos nota-se um aumento na frequência dessas células no grupo PD, detectado pela maior distribuição de vimentina no tecido. Barras de escala: 50 μ m.

Em relação às metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), a imunohistoquímica mostrou que ambas são encontradas em abundância na próstata ventral de ratos. Elas foram localizadas no estroma subepitelial e interacinar, sendo possível notar uma discreta diminuição na distribuição de MMP-2 na próstata de PD em relação ao PC (Figura 7, A e B). Não houve alteração na distribuição de MMP-9 entre os grupos (Figura 7, C e D).

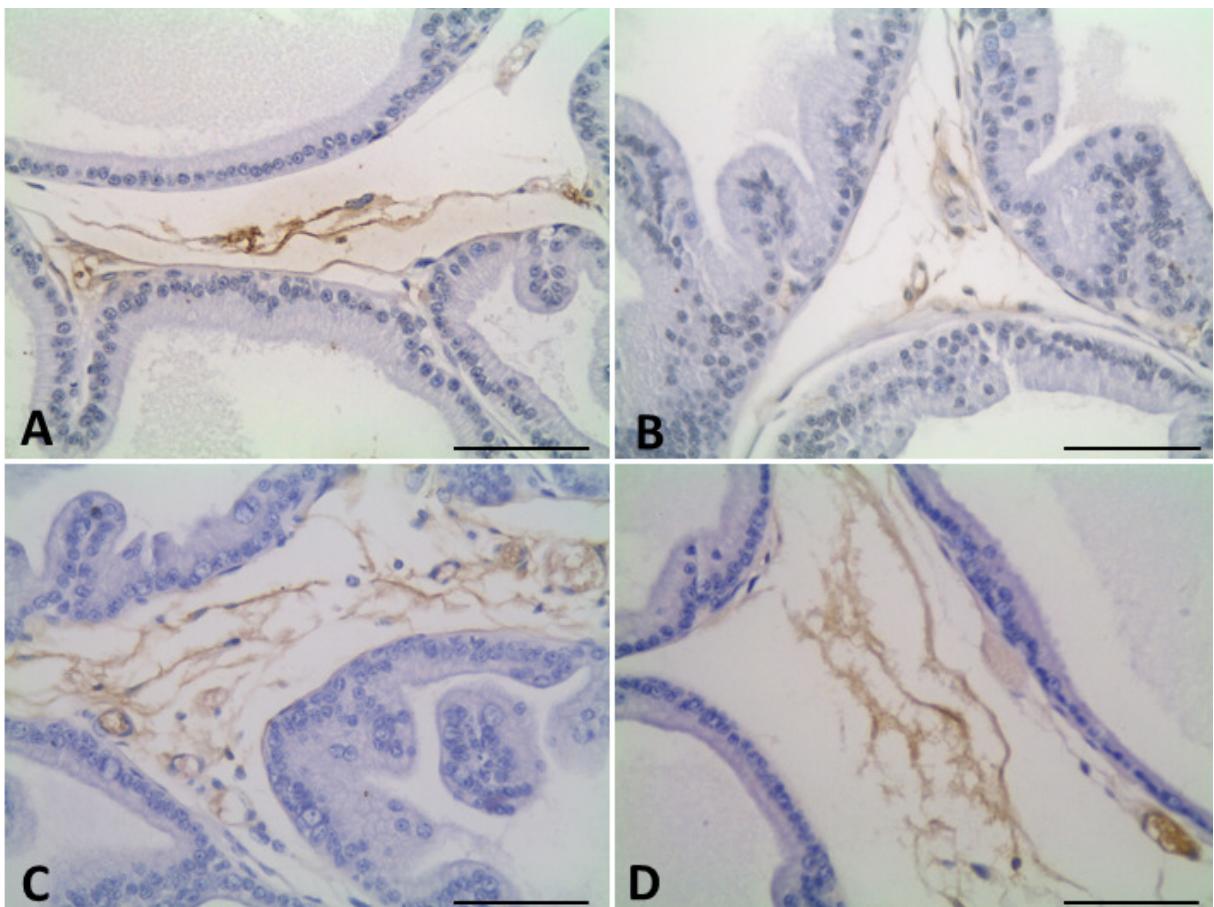


Figura 7. Cortes histológicos da próstata ventral em ratos filhotes de mães controle (A e C) e diabéticas (B e D) após imunohistoquímica para MMP-2 (A, B) e MMP-9 (C, D). Ambas as metaloproteinases foram detectadas no estroma subepitelial e interacinar e não foi observada diferença na distribuição entre os grupos PC e PD. Barras de escala: 50 µm.

4.3. Western blotting e gel de zimografia

O ensaio de western blotting mostrou que houve diminuição no conteúdo de α -actina na próstata ventral do grupo PD, indicando indiretamente uma diminuição no volume de células musculares lisas nos filhotes de ratas diabéticas (Figura 8). Já em relação ao conteúdo de fibroblastos, embora tenha sido notada uma tendência de aumento de vimentina na próstata de PD, esse valor não alcançou diferença significativa (Figura 8).

A próstata dos animais proles de ratas diabéticas apresentou ainda um aumento de 60% na quantidade de AR e de 53% de PCNA (Figura 9). Essa mesma análise revelou também um incremento menos acentuado, porém significativo, na quantidade de AKT total na próstata do grupo PD (Figura 9).

A análise de MMPs mostrou, através da técnica de western blotting, uma diminuição da quantidade de MMP-2 na próstata dos filhotes de mães diabéticas (Figura 10A), porém a zimografia revelou que há aumento da atividade desta enzima neste grupo (Figura 10B). Em relação à MMP-9, não houve alterações significativas no conteúdo da proteína nem, tampouco, em sua atividade na próstata (Figura 10, A e B).

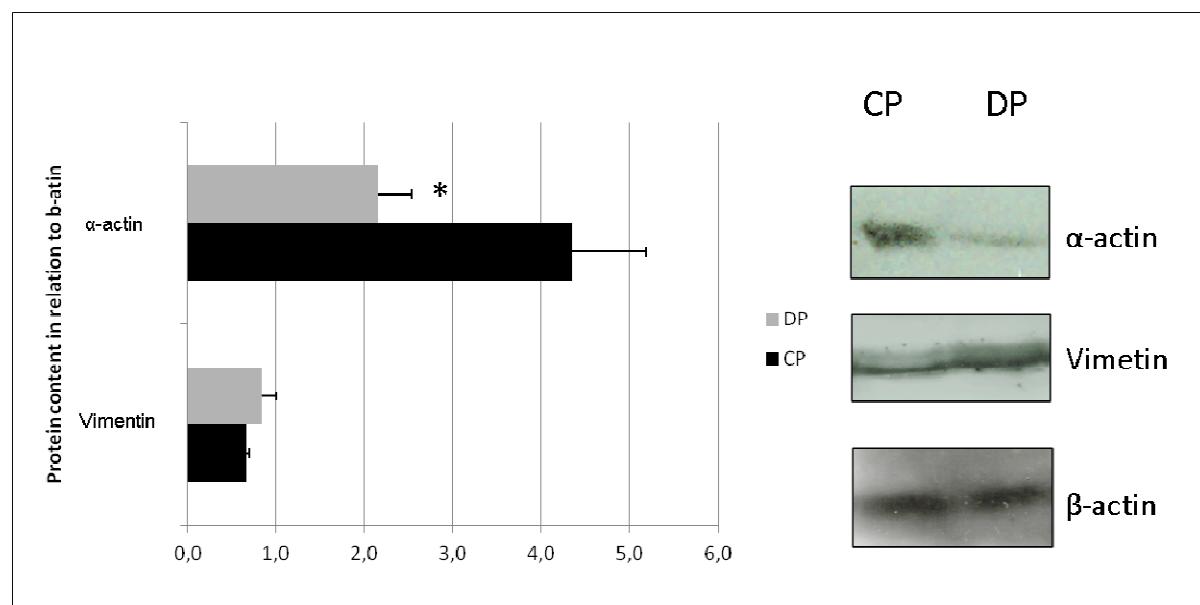


Figura 8. Western blotting para quantificação de α -actina de músculo liso e vimentina em extratos proteicos da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD). Os valores foram normalizados em relação à β -actina. * diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

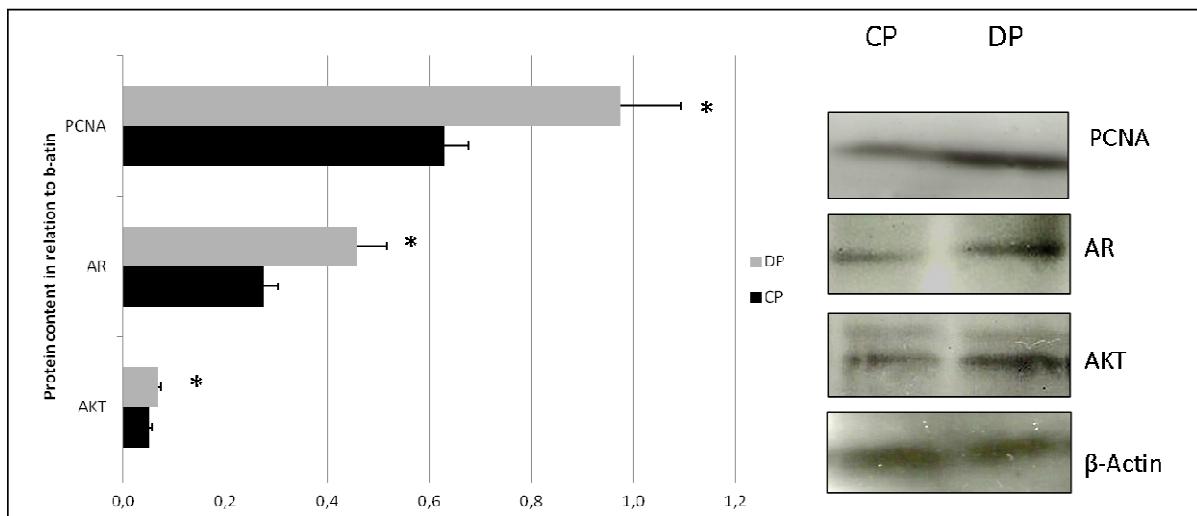


Figura 9. Western blotting para quantificação de PCNA, AR e AKT em extratos proteicos da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD). Os valores foram normalizados em relação à β -actina. * diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

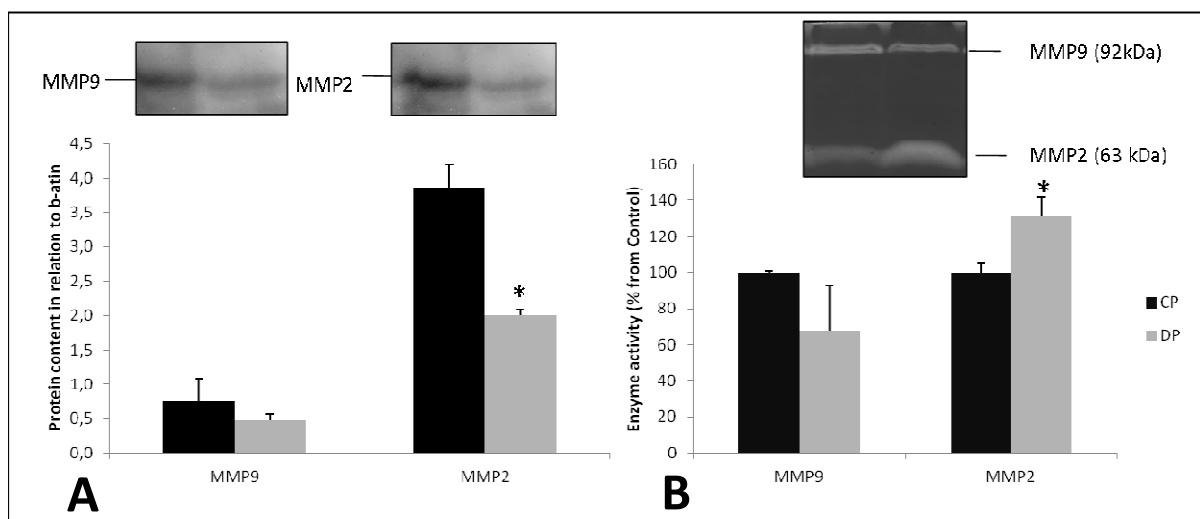


Figura 10. Western blotting (A) e zimografia (B) de MMP-2 e MMP-9 em extratos proteicos da próstata ventral de ratos filhotes de mães controle (PC) e diabéticas (PD). Os valores das bandas de western blotting foram normalizados em relação à β -actina e os da zimografia em relação ao grupo controle (100%). * diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,05$).

4.4. Estresse Oxidativo

O estudo do sistema de controle do estresse oxidativo revelou que na próstata ventral dos filhotes de ratas diabéticas houve uma redução significativa de 33% da atividade da catalase e de 41% da atividade antioxidante total na glândula (Figura 11).

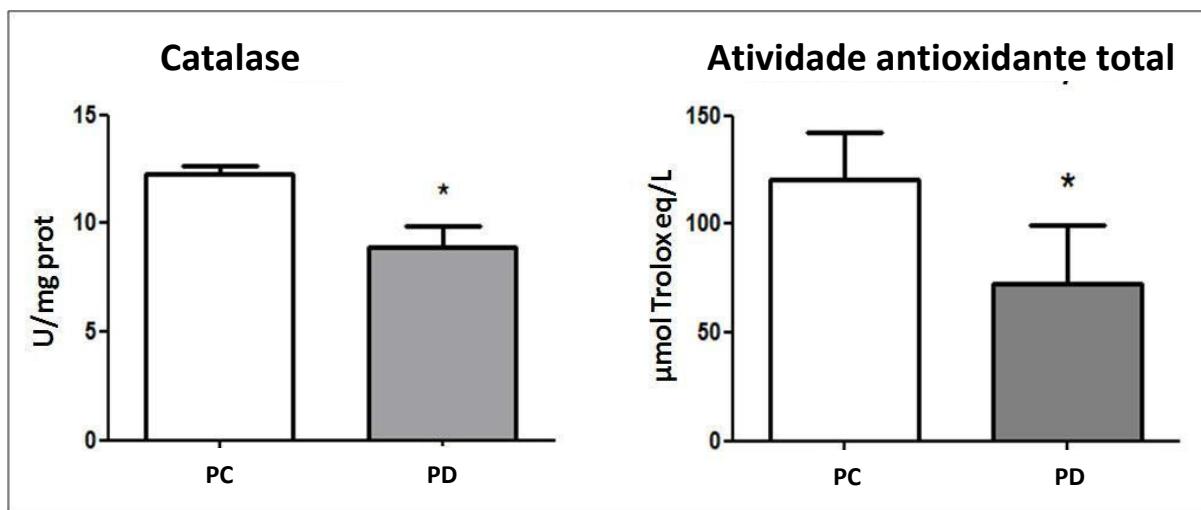


Figura 11. Análise do sistema de controle do estresse oxidativo através da atividade da enzima catalase e da atividade antioxidante total na próstata ventral de animais filhotes de ratas controle (PC) e diabéticas (PD). * diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Essa investigação descreve alterações morfológicas e bioquímicas no epitélio e estroma da próstata ventral de ratos adultos, proles de mães diabéticas. Esses dados são inéditos na literatura e trazem novos conhecimentos sobre o comprometimento morfológico e molecular decorrentes do ambiente hiperglicêmico durante o desenvolvimento intrauterino da glândula. O impacto direto do diabetes na próstata adulta e também no seu desenvolvimento pós-natal já é bem descrito na literatura (CAGNON et al., 2000; SOUDAMANI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2006, 2008; RIBEIRO; TABOGA; GÓES, 2009; ARCOLINO et al., 2010). A importância da presente investigação se justifica pela acentuada e crescente incidência de diabetes gestacional e pela ausência de informações científicas a respeito dos seus efeitos no desenvolvimento do sistema genital masculino, em especial a próstata.

A análise de parâmetros biométricos mostrou que o peso corporal não variou no grupo prole de ratas diabéticas. Por outro lado, a glicemia esteve mais elevada nesse grupo em relação ao controle. Catalano e Hauguel-De Mouzon (2011) sugerem que a hiperglicemia maternal dá origem à intolerância à glicose que é transferida ao feto, aumentando então a produção de insulina fetal. Isso, por sua vez, leva à hiperglicemia, maior crescimento fetal e macrossomia, que na idade adulta podem estimular o desenvolvimento de diabetes e obesidade. Alguns estudos sobre diabetes gestacional apontaram aumento significativo no peso corporal e nos níveis de glicose nos filhotes de mães diabéticas (JELODAR; KHAKSAR; POURAHMADI, 2009; BADR et al., 2013). Por outro lado, entre os animais diabéticos é comum a ocorrência da perda de peso associada à hiperglicemia (RIBEIRO et al., 2006; LAMERS et al. 2007; ARCOLINO et al. 2010; YE et al. 2011). Os modelos de indução de diabetes são também caracterizados pela acentuada elevação da glicemia, que atinge níveis acima dos 400mg/dl. Esse estado metabólico causa severos danos sistêmicos associados à perda de massa corporal, que é um sintoma comum entre indivíduos com diabetes descompensada. Entretanto, os animais expostos ao diabetes gestacional apresentam hiperglicemia moderada, o que possivelmente não afeta mais profundamente o metabolismo corporal, explicando a manutenção de peso corporal.

Embora não tenha ocorrido mudança no peso corporal, o diabetes gestacional causou significativa redução no peso absoluto da próstata ventral de ratos. Além disso, notou-se uma dramática diminuição dos níveis de testosterona nesses animais em comparação àqueles proles de ratas normais. Não existe na literatura trabalhos que avaliem o peso ou a morfologia da próstata sob influência do diabetes gestacional. Jelodar, Khaksar e Pourahmadi (2009)

analisaram o perfil endócrino em ratos adultos filhotes de mães diabéticas e relataram um decréscimo na testosterona plasmática, associando tal achado com a diminuição do hormônio luteinizante (LH) e do número de células de Leydig. Estudos em modelos de indução de diabetes em ratos machos adultos mostram também redução de testosterona e de peso da próstata, assim como os estudos de castração (VILAMAIOR et al., 2000; GÓES et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; RIBEIRO; TABOGA; GÓES, 2009). É interessante apontar que os níveis de testosterona são inversamente proporcionais à glicemia, porém os mecanismos envolvidos nesse processo ainda precisam ser elucidados (DAWOOD et al., 2005). Indivíduos castrados apresentam com frequência hiperglicemia, bem como os diabéticos apresentam hipotestosteronemia (RAMAMANI; ARULDHAS; GOVINDARAJULU, 1999). É interessante notar que os níveis plasmáticos de estradiol também foram reduzidos nesses animais. Normalmente, as alterações mais impactantes do estradiol na próstata se refere à maior exposição a esses esteróides ou ao desequilíbrio da relação T/E, tão freqüente nas desordens prostáticas clássicas do envelhecimento (PRINS, 2008; SCARANO et al., 2008; NELLES; HU; PRINS, 2011). Nessa investigação não houve alteração na razão T/E, uma vez que ambos os hormônios reduziram da mesma maneira. Embora não tenhamos feito uma análise dos receptores estromais, não podemos descartar totalmente uma alteração causada pelo decréscimo desse hormônio, mas nossos dados apontam a testosterona como um grande estimulador das alterações de volume prostático aqui descritas. Dessa forma, fica evidente que o diabetes gestacional, além de causar hiperglicemia, influencia o eixo gonadotrófico da prole, reduzindo níveis de testosterona e influenciando, consequentemente, o peso da próstata que é uma glândula notadamente andrógeno-dependente.

O diabetes gestacional causou um expressivo aumento de células em proliferação no epitélio da próstata da prole. Também foi observada uma elevação na quantidade de receptores de andrógeno (AR) na próstata desse grupo. O principal modulador da proliferação na próstata são os andrógenos que agem nas células epiteliais e estromais via AR (ROY et al., 1990; YAN; BROWN, 2008). Durante o envelhecimento, observa-se um drástico declínio nos níveis androgênicos, entretanto desordens proliferativas são estabelecidas na próstata de homens em idade avançada, tais como a hiperplasia benigna (BANERJEE; BANERJEE; BROWN, 2001). Dessa forma, a redução androgênica é acompanhada de uma maior sensibilização da glândula aos esteróides, provavelmente através de um aumento na quantidade de AR (BARRACK; BUJNOVSZKY; WALSH, 1983; BANERJEE; BANERJEE; BROWN, 2001). Outro dado intrigante desta pesquisa foi o aumento na quantidade da proteína AKT, que faz parte de uma via de sinalização que

estimula a proliferação e sobrevivência celular. Esta via é importante para ação da insulina no metabolismo de glicose, mas também estimula a proliferação e diferenciação celular via mTOR, sendo alvo terapêutico para o tratamento do câncer, diabetes e outras doenças (BARBALHO et al., 2011). Atualmente, muitas evidências mostram que os ARs podem ser ativados de forma independente de seus ligantes clássicos, sendo inclusive ativados pela via de sinalização Pi3K/AKT (SARKER et al., 2009). Isso explica as altas taxas de proliferação celular em tumores de próstata após o tratamento com ablação androgênica, uma vez que a via AKT está intensamente ativada durante a carcinogênese (TAPLIN et al., 2008; SARKER et al., 2009). Nossos dados sobre proliferação celular diferem daqueles observados nos modelos de indução de diabetes, que mostram uma diminuição da proliferação celular na próstata ventral de ratos desencadeada pela redução androgênica, o que causa atrofia da glândula (ARCOLINO et al. 2010; PORTO et al., 2011; GOBBO et al., 2012a). Essa diferença de resultados se justifica porque são modelos distintos de diabetes e os indivíduos apresentam hiperglicemias diferentes. Embora todos também forneçam uma situação de redução de testosterona, não há um aumento compensatório nos níveis de AR nos modelos de *diabetes mellitus*. Na presente investigação, a hiperglicemia nos filhotes de diabéticas é moderada em relação aos modelos de indução de diabetes e provavelmente o aumento de AR e AKT são os responsáveis em desencadear a proliferação celular prostática que protege a glândula da intensa atrofia epitelial que a redução androgênica poderia causar na próstata (demonstrada nos modelos acima citados). Portanto, acredita-se que o principal responsável pela estimulação da proliferação celular na próstata da prole de mães diabéticas seja o aumento da quantidade desses receptores e da quantidade de AKT glandular.

Embora a distribuição relativa de vimentina tenha sido maior na próstata do grupo de filhotes de ratas diabéticas, o conteúdo dessa proteína não variou entre os grupos. Esse dado nos indica indiretamente que o diabetes materno não afeta o volume de fibroblastos na próstata de ratos. Por outro lado, essa investigação mostra uma significativa redução nas fibras colágenas nesses animais proles de mães diabéticas. Os fibroblastos são críticos para o ambiente estromal, uma vez que sintetizam moléculas da matriz extracelular, incluindo o colágeno, cuja sinalização é essencial na homeostase da próstata (AUMULLER; SEITZ, 1990; CUNHA; COOKE; KURITA, 2004). Em modelos de *diabetes mellitus*, estudos anteriores revelaram diminuição na frequência relativa e no peso absoluto de fibroblastos na próstata de ratos, juntamente a um aumento na quantidade de colágeno e outros elementos da matriz, mas os autores atribuem este aumento à atrofia da glândula e aproximação das fibras e não ao incremento da síntese e deposição de colágeno (RIBEIRO et al., 2006; GOBBO et al.,

2012a). Lamers e colaboradores (2007) demonstraram que o diabetes também aumenta a quantidade de diferentes tipos de colágeno em glândulas salivares de ratos, fator que está associado à aumentada expressão de TGF β . Diversos autores também descrevem que o diabetes experimental é responsável pela maior deposição de elementos da matriz extracelular, principalmente em tecidos altamente afetados por essa desordem como os rins (SANAI et al., 2000; D'SOUZA et al., 2013). Dessa forma, ficam evidentes os efeitos da hiperglicemia na deposição colagênica nos diferentes tecidos conjuntivos estudados. Nossa investigação indica que a redução na distribuição de colágeno na próstata de animais proles de diabéticas é provavelmente decorrente da maior atividade de MMP-2, também observada nesse grupo. A família das metaloproteinases é um grupo de enzimas responsável pela remodelação e degradação da matriz extracelular (principalmente colágeno) (VAN MARION, 2006). Em tecidos saudáveis, as MMPs são expressas em baixos níveis, algumas podendo inclusive estar ausentes. Entretanto, durante a remodelação tecidual causada por estresse mecânico, doenças, inflamação ou sinalização celular desregulada, os níveis de MMPs estão frequentemente elevados (LAUER-FIELDS; JUSKA; FIELDS, 2002). Estudos recentes indicam que as MMP-2 e -9 estão relacionadas às alterações teciduais inerentes da nefropatia diabética e que elas ocorrem em maior quantidade no plasma e urina de pacientes com diabetes (GHARAGOZLIAN et al., 2009; KOLSET; REINHOLT; JENSSSEN, 2012). Além disso, Hsieh et al. (2013) mostrou que o tratamento de culturas com glicose aumenta a expressão de MMP-9 estimulando a migração de astrócitos *in vitro*. Diferentemente da deposição de matriz extracelular, as informações sobre os efeitos da hiperglicemia ou do diabetes materno na atividade de MMPs na próstata são inexistentes na literatura, mas nossos dados mostram que essa desordem causa remodelação estromal caracterizada por maior degradação de colágeno pelas MMP-2 associada à inalterada deposição pelos fibroblastos, uma vez que não houve aumento no número dessas células como ocorreu em outros estudos com modelos *diabéticos mellitus*.

Os eventos de remodelação estromal na próstata são achados comuns nas situações de redução androgênica. Dessa forma, além da hiperglicemia, devemos levar em consideração a redução de testosterona nos filhotes de mães diabéticas como possível estimulador das alterações estromais acima discutidas. Comparando a remodelação estromal apresentada neste trabalho com a que ocorre na próstata ventral em modelos de animais castrados ou diabéticos citados na literatura, podemos destacar algumas diferenças. Ribeiro, Taboga e Góes (2009) verificaram que o diabetes promove um aumento significativo na densidade de fibras colágenas, na espessura e também na frequência relativa dessas fibras, assim como Fávaro,

Padovani e Cagnon (2009) também observaram reestruturação estromal na próstata de camundongos NOD diabéticos espontâneos. Durante a castração, situação em que há redução de andrógenos, a remodelação estromal associada à atrofia da glândula é intensa e caracterizada pela maior deposição de fibras colágenas (VILAMAIOR et al., 2000; GÓES et al., 2007). Além disso, os indivíduos castrados apresentam frequentemente hiperglicemia, associada à obesidade e distúrbios de sensibilidade à insulina (CHRISTOFFERSEN et al., 2010). Considerando que os níveis de testosterona são baixos em todos esses modelos citados e que, em relação à glicemia, as proles de mães diabéticas apresentam apenas moderada hiperglicemia enquanto nos animais modelos de *diabetes mellitus* e de castração há acentuada hiperglicemia, uma hipótese a ser considerada é de que essa diferença de resultados observada em relação às fibras colágenas seja devido aos níveis glicêmicos e não pela redução de testosterona. Essa hipótese é corroborada pelos estudos que mostram que a glicose em excesso estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos por meio da maior expressão de TGF β , o mais potente estimulador da síntese de matriz extracelular (LAMERS et al., 2007; KOLSET; REINHOLT; JENSSSEN, 2012; D'SOUZA et al., 2013). Além disso, estudos em modelos de obesidade, nos quais ocorre intensa redução androgênica e moderada hiperglicemia, mostram que os níveis de colágeno não se alteram na próstata ventral (RIBEIRO et al., 2012).

A presente investigação mostrou que o diabetes no período gestacional causou redução no conteúdo de alfa-actina na próstata ventral de ratos, refletindo indiretamente em redução de volume de células musculares lisas na glândula. As células musculares lisas (CML), além de fornecerem a contração necessária para a função reprodutiva da próstata, apresentam papel central na regulação do desenvolvimento e funcionamento glandular, secretando fatores de crescimento que inibem a proliferação epitelial excessiva e participando também de interações parácrinas epitélio-estromais na glândula (THOMSON; CUNHA; MARKER, 2008). No câncer de próstata, a presença de CML desdiferenciadas é uma característica comum no estroma reativo que acompanha as células tumorais e os eventos da carcinogênese (TUXHORN et al., 2002). Esse estroma reativo caracteriza-se por significativa redução ou completa perda de CML diferenciadas (expressando alfa-actina de músculo liso), sendo substituídas por fibroblastos e miofibroblastos (expressando vimentina e alfa-actina simultaneamente) responsáveis por secretar elementos da matriz que estimulam a invasão tumoral (LEIMGRUBER et al., 2011). Dessa forma, fica evidente a importância da presença e da diferenciação desse tipo celular no aspecto reprodutivo e patológico da próstata. Essa investigação mostra que o diabetes gestacional pode causar prejuízo na contração da glândula

e também na interação epitélio-estroma importante para a sua manutenção funcional. Cabe destacar que os estudos sobre a capacidade reprodutiva desses indivíduos são inexistentes na literatura e os dados aqui apresentados abrem novas perspectivas para esse tipo de avaliação.

O grupo de filhotes de mães diabéticas apresentou diminuição significativa da atividade da catalase e também da atividade antioxidante total, indicando que o diabetes gestacional pode interferir negativamente na próstata da prole, causando prejuízo no sistema de controle do estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma consequência da vida aeróbica, entretanto a atuação das enzimas que controlam a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) é essencial para diminuir os seus impactos negativos nos diversos sistemas orgânicos (ARSOVA-SARAFINOVSKA et al., 2009). O diabetes está associado a elevado estresse oxidativo em alguns órgãos, tais como pâncreas, pulmão e coração (ZHOU et al., 2000; BROWNLEE, 2001; ROBERTSON et al., 2003; THANDAVARAYAN et al., 2009; FORGIARINI JÚNIOR, 2010). Um estudo recente mostrou que o diabetes aumenta o estresse oxidativo e perturba a homeostase redox intracelular na próstata através da presença aumentada de ROS (YE et al. 2011). Os níveis intracelulares de ROS geralmente se encontram elevados em células tumorais, revelando um papel crítico dessas espécies na carcinogênese e na progressão tumoral (YANG et al., 2013). Gobbo e outros (2012b) também demonstraram maior atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST) e uma tendência de aumento na catalase que foi associada à maior apoptose na próstata de ratos diabéticos. Esses mesmos autores notaram que o tratamento com antioxidante como a vitamina C restaura os níveis das atividades enzimáticas e reduzem a apoptose nos ratos diabéticos. Recentemente, tem sido sugerido que a exposição a fatores ambientais como agentes infeciosos e carcinógenos provenientes da alimentação, bem como desequilíbrio hormonal, causam um tipo de atrofia na próstata associada à inflamação e proliferação – designada PIA (DE MARZO et al, 2007). Uma inflamação de longo prazo pode contribuir com a carcinogênese através de mecanismos repetitivos de danos seguidos de reparo tecidual devido à presença de grandes quantidades de ROS e citocinas (NAKAYAMA et al., 2003). As enzimas superóxido dismutase, glutationa e catalase são consideradas antioxidantes primários, uma vez que elas estão envolvidas diretamente na eliminação de ROS. Elas protegem as células contra os ROS produzidos durante o metabolismo normal e após insultos como a inflamação (SCIARRA et al., 2007). Dessa maneira, o sistema de defesa trabalha cooperativamente para aliviar o estresse oxidativo causado pela produção de radicais livres. Qualquer alteração nos níveis de enzimas antioxidantes pode quebrar o equilíbrio e causar danos celulares responsáveis pela transformação maligna irreversível. Embora alguns estudos mostrem o efeito negativo do

estresse oxidativo em animais diabéticos, pouco se sabe a respeito dessa alteração nos indivíduos prole de mães diabéticas. Badr e colaboradores (2013) verificaram que os níveis de ROS e hidroperóxido estão elevados no plasma de filhotes nascidos de ratas diabéticas, porém nada é descrito para a próstata. Dessa forma, fica evidente que o ambiente diabetogênico durante a gestação estimula o estresse oxidativo devido à menor atividade de enzimas de controle na próstata ventral de ratos, e esse evento pode causar danos teciduais na glândula em longo prazo, já que o estresse oxidativo se relaciona à inflamação e carcinogênese.

6. CONCLUSÃO

A presente investigação mostrou que o diabetes gestacional causa uma reprogramação metabólica e hormonal na prole que impacta na próstata mesmo na fase adulta. A partir desses dados podemos destacar algumas conclusões:

- Os ratos descendentes de mães diabéticas apresentam hiperglicemia, acentuada diminuição de testosterona que se associam à redução de peso da próstata.
- Embora o diabetes gestacional não tenha impacto profundo sobre a morfologia da próstata, ele causa expressivo aumento na proliferação celular no epitélio, desencadeado provavelmente pelo aumento na quantidade de receptores de andrógeno e AKT.
- Há uma intensa reorganização estromal, caracterizada pela redução de fibras colágenas associada à maior atividade de MMP-2 e inalterada deposição pelos fibroblastos na próstata das proles de ratas diabéticas, podendo afetar a homeostasia estrutural e molecular imposta pelo colágeno no estroma prostático.
- Os processos de contração e interação epitélio-estromal da glândula também podem estar comprometidos, uma vez que o diabetes diminuiu o volume de células musculares lisas na próstata da prole.
- Os ratos que se desenvolveram sob influência do diabetes apresentam prejuízo no sistema de controle do estresse oxidativo. Esse dado, associado ao perfil metabólico alterado e maior proliferação celular, pode estimular o desenvolvimento de patologias na próstata durante o envelhecimento.

REFERÊNCIAS¹

AEBI, H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, v. 105, p. 121-126, 1984.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes-2010. **Diabetes Care** 2010, v. 33, Supplement 1, jan. 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes-2012. **Diabetes Care** 2012, v. 35, Supplement 1, jan. 2012.

AMORIM, E. M. P. et al. Short- and long-term reproductive effects of prenatal and lactational growth restriction caused by maternal diabetes in male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/9/1/154>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

ANDERSON, L. C.; SULEIMAN, A. H.; GARRET, J. R. Morphological effects of diabetes on the glandular ducts and acini of the rat submandibular gland. **Mycroscopy Research and Technique**, v. 27, n. 1, p. 61-70, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8155905>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

ARCOLINO, F. O. et al. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 91, n. 2, p. 144-154, abr. 2010.

ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z., et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1228-1235, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912009002240>>. Acesso em: 07 out. 2013.

AUMULLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. **International review of cytology**, v. 121, p. 127-231, 1990.

BADR, G. et al. Maternal supplementation of diabetic mice with thymoquinone protects their offspring from abnormal obesity and diabetes by modulating their lipid profile and free radical production and restoring lymphocyte proliferation via PI3K/AKT signaling. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 37, 2013. Disponível em: <http://www.lipidworld.com/content/12/1/37>. Acesso em: 17 set 2013.

BANERJEE, P. P.; BANERJEE, S.; BROWN, T. R. Increased androgen receptor expression correlates with development of age-dependent, lobe-specific spontaneous hyperplasia of the brown Norway rat prostate. **Endocrinology**, v. 142, n. 9, p. 4066-4075, set. 2001.

¹ Baseado na ABNT NBR 6023/2002.

BARBALHO, S. M. et al. Evaluation of glycemic and lipid profile of offspring of diabetic Wistar rats treated with Malpighia emarginata juice. **Experimental Diabetes Research**, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3034956/>>. Acesso em: 26 set. 2013.

BARRACK, E. R.; BUJNOVSZKY, P.; WALSH, P. C. Subcellular distribution of androgen receptors in human normal, benign hyperplastic, and malignant prostatic tissues: characterization of nuclear salt-resistant receptors. **Cancer Research**, v. 43, n. 3, p. 1107-1116, mar. 1983.

BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 788-791, dez 2001.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, jul. 1996. Disponível em: <<http://legacy.library.ucsf.edu/documentStore/b/p/c/bpc07a00/Sbpc07a00.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2013.

BERGMAN, R. N.; FINEGOOD, D. T.; KAHN, S. E. The evolution of beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes. **European journal of clinical investigation**, v. 32, p. 35-45, jun. 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, maio 1976.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6865/full/414813a.html>>. Acesso em: 07 out. 2013.

BRUNI-CARDOSO, A. et al. Localized matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity in the rat ventral prostate during the first week of postnatal development. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 6, p. 805-815, jun. 2008.

BRUNI-CARDOSO, A.; CARVALHO, H. F. Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. **The Anatomical Record**, v. 290, n. 10, p. 1223-1232, out. 2007.

BURKE, J. P. et al. Diabetes and sexual dysfunction: results from the olmsted county study of urinary symptoms and Health Status Among Men. **The Journal of Urology**, v. 177, n. 4, p. 1438-1442, abr. 2007.

CALLE, M. C.; FERNANDEZ, M. L. Inflammation and type 2 diabetes. **Diabetes & metabolism**, v. 38, n. 3, p. 183-191, jun. 2012.

CAGNON, V. H. et al. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). **Tissue & Cell**, v. 32, n. 4, p. 275-283, ago. 2000.

CARVALHO, C. A. et al. Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of C57BL/6J and NOD mice. **The Anatomical Record. Part A**, v. 270, n. 2, p. 129-136, fev. 2003.

CATALANO, P. M.; HAUGUEL-DE MOUZON, S. Is it time to revisit the Pedersen hypothesis in the face of the obesity epidemic? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 6, p. 479-487, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3130827/>>. Acesso em: 25 set. 2013.

CHRISTOFFERSEN, B. O. et al. Influence of castration-induced testosterone and estradiol deficiency on obesity and glucose metabolism in male Göttingen minipigs. **Steroids**, v. 75, n. 10, p. 676-684, out. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X10001091>>. Acesso em: 07 out. 2013.

CUNHA, G. R.; COOKE, P. S.; KURITA, T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, n. 5, p. 417-434, dez. 2004.

DAWOOD, T. et al. Glucocorticoid responses to stress in castrate and testosterone-replaced rams. **Regulatory Peptides**, v. 125, n. 1-3, p. 47-53, fev. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011504002630#>>. Acesso em: 25 set. 2013.

D'SOUZA, A. et al. Chronic effects of mild hyperglycaemia on left ventricle transcriptional profile and structural remodelling in the spontaneously type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. **Heart Failure Reviews**, fev. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10741-013-9376-9>>. Acesso em: 15 out. 2013.

DE MARZO, A. M. et al. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. **The Journal of Urology**, v. 160, n. 6 (pt 2), p. 2381-2392, dez. 1998.

DE MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-269, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552388/>>. Acesso em: 08 out. 2013.

DETSCH, J. C. M. et al. Marcadores para o diagnóstico e tratamento de 924 gestações com diabetes melito gestacional. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 6, p. 389-398, ago. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302011000600005&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 16 jul. 2012.

FÁVARO, W. J.; PADOVANI, C. R.; CAGNON, V. H. Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. **Tissue & Cell**, v. 41, n. 2, p.119-132, abr. 2009.

FLICKINGER, C. J. Ultrastructural observations on the postnatal development of the rat prostate. **Z. Zellforsch**, Bd. 113, 1970.

FOGLIA, V. G. et al. Sexual disturbances in the male diabetic rat. **Hormone and Metabolic Research**, v. 1, n. 2, p. 72-77, mar. 1969.

FONTÃO, M. F. et al. Estroma fibromuscular da próstata de camundongos NOD. **Perspectivas Médicas**, v. 20, n. 2, p. 5-9, jul./dez. 2009.

FORGIARINI JÚNIOR, L. A. et al. Alterações pulmonares em um modelo de diabetes mellitus em ratos: o efeito da terapia antioxidante. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 579-587, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v36n5/v36n5a09.pdf>>. Acesso em 22 out. 2013.

FRENKEL, G. P. et al. Fertility of the streptozotocin-diabetic male rat. **Andrologia**, v. 10, n. 2, p. 127-136, mar./abr. 1978.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica**: fundamentos da terapêutica racional, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

GAO, J.; ISAACS, J. T. Development of an androgen receptor-null model for identifying the initiation site for androgen stimulation of proliferation and suppression of programmed (apoptotic) death of PC-82 human prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 58, n. 15, p. 3299-3306, ago. 1998.

GHARAGOZLIAN, S. et al. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. **BMC Clinical Pathology**, v. 9, p. 1-5, set. 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6890/9/7>>. Acesso em: 26 set. 2013.

GOBBO, M. G. et al. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p. 326-333, fev. 2012a.

GOBBO, M. G. et al. Oxidative stress markers and apoptosis in the prostate of diabetic rats and the influence of vitamin C treatment. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 7, p. 2223-2233, jul. 2012b.

GÓES, R. M. et al. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. **Micron**, v. 38, n. 3, p. 231-236, 2007.

GRANT, G. M. et al. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. **Matrix Biology**, v. 18, n. 2, p. 145-148, abr. 1999.

GROSSMANN, M.; WITTERT, G. Androgens, diabetes and prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**. Publicação online em 18 abr. 2012.

HANSEN, B. C. The metabolic syndrome X. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 892, p. 1-24, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10842649>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiologic clinics of North America**, v. 38, n. 1, p. 1-14, jan. 2000.

HSIEH, H. L. et al. High glucose induces reactive oxygen species-dependent matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration in brain astrocytes. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 601-614, dez. 2013.

HUANG, H.; TINDALL, D. J. The role of the androgen receptor in prostate cancer. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 12, n. 3, p. 193-207, 2002.

HUDSON, D. L. Prostate epithelial stem cell culture. **Cytotechnology**, v. 41, n. 2-3, p. 189-196, mar. 2003.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 2012. Disponível em: <<http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>>. Acesso em: 15 out. 2013.

ISAACS, J. T.; COFFEY, D. S. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. **The Prostate. Supplement**, v. 2, p. 33-50, 1989.

ISAACS, J. T.; ISAACS, W. B. Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. **Nature medicine**, v. 10, n. 1, p. 26-27, jan. 2004.

JELODAR, G.; KHAKSAR, Z.; POURAHMADI, M. Endocrine profile and testicular histomorphometry in adult rat offspring of diabetic mothers. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 59, n. 5, p. 377-382, set 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12576-009-0045-7>>. Acesso em: 21 ago. 2013.

JESIK, C. J.; HOLLAND, J. M.; LEE, C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. **The Prostate**, v. 3, n. 1, p. 81-97, 1982. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pros.2990030111/abstract>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

KAMATH, U. et al. Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. **Acta Paediatrica**, v. 87, p. 676-679, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1651-2227.1998.tb01529.x/pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2013.

KIM, W. T. et al. Prostate size correlates with fasting blood glucose in non-diabetic benign prostatic hyperplasia patients with normal testosterone levels. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 9, p. 1214-1218, set 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3173509/>>. Acesso em: 25 abr. 2013.

KOLSET, S. O.; REINHOLT, F. P.; JENSSEN, T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. **The Journal of Histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 60, n. 12, p. 976-986, dez. 2012. Disponível em: <<http://jhc.sagepub.com/content/early/2012/10/26/0022155412465073.full.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2013.

KRZYZANOWSKA, K. et al. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1115-1122, jul. 2008.

LABRIE, F. et al. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: introcrinology. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, n. 3, p. 185-212, jul. 2001.

LAMERS, M. L. et al. Chronic hyperglycaemia increases TGF β 2 signaling and the expression of extracellular matrix proteins in the rat parotid gland. **Matrix Biology**, v. 26, n. 7, p. 572-582, set 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X07000637#>>. Acesso em: 17 set 2013.

LANG, S. H.; FRAME, F. M.; COLLINS, A. T. Prostate cancer stem cells. **The Journal of Pathology**, v. 217, n. 2, p. 299-306, jan. 2009.

LAUER-FIELDS, J. L.; JUSKA, D.; FIELDS, G. B. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. **Biopolymers**, v. 66, n. 1, p. 19-32, 2002.

LEIMGRUBER, C. Dedifferentiation of prostate smooth muscle cells in response to bacterial LPS. **The Prostate**, v. 71, n. 10, p. 1097-1107, jul. 2011.

LERNMARK, A. Molecular biology of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 28, n. 4, p. 195-203, 1985.

LIN, C. Q.; BISSEL, M. J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 9, p. 737-743, jun. 1993. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/content/7/9/737>>. Acesso em: 08 out. 2013.

LIRA, L. Q.; DIMENSTEIN, R. Vitamina A e Diabetes Gestacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 355-359, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000300023&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 16 jul. 2012.

MARCHENKO, G. N.; STRONGIN, A. Y. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cisteine-switch sequence is widely expressed in tumors. **Gene**, v. 265, n. 1-2, p. 87-93, mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255011>>. Acesso em: 25 set. 2013.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Developmental Biology**, v. 253, n. 2, p. 165-174, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160602000313>>. Acesso em: 04 nov. 2013.

MCLENNAN, S. V. et al. Advanced glycation end products decrease mesangial cell MMP-7: a role in matrix accumulation in diabetic nephropathy? **Kidney International**, v. 72, n. 4, p. 481-488, ago. 2007.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American Journal of surgical Pathology**, v. 12, n. 8, p. 619-633, ago. 1988.

MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. O pâncreas endócrino. In: Aires M. M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 842-854, 1999.

MIKI, J. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. **International Journal of Urology**, v. 17, n. 2, p. 139-147, fev. 2010.

MIRANZI, S. S. C. et al. Qualidade de vida de indivíduos com diabetes mellitus e hipertensão acompanhados por uma equipe de saúde da família. **Texto & Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 17, n. 4, p. 672-679, out./dez. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/tce/v17n4/07.pdf>>. Acesso em: 29 maio 2012.

NAKAYAMA, M. et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 3, p. 923-933, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868250/>>. Acesso em: 08 out. 2013.

NELLES, J. L; HU, W. Y.; PRINS, G. S. Estrogen action and prostate cancer. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, v. 6, n. 3, p. 437-451, maio 2011.

NOBLE, D. et al. Risk models and scores for type 2 diabetes: systematic review. **British Medical Journal**, v. 343, nov. 2011.

OKAMURA, A. et al. Estrutura e estereologia do epitélio secretor do lobo ventral da próstata frente ao tabagismo passivo. **Perspectivas Médicas**, v. 19, n. 1, p. 23-28, jan./jun. 2008. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=243217737007>>. Acesso em: 06 jun. 2012.

OKSANEN, A. Testicular lesion of streptozotocin diabetic rats. **Hormony Research**, v. 6, n. 3, p. 138-144, 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/130334>>. Acesso em: 06 jun. 2012.

PADILHA, P. C. et al. Terapia nutricional no diabetes gestacional. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 1, p. 95-105, jan./fev., 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000100011&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 16 jul. 2012.

PARK, P. W.; REIZES, O.; BERNFIELD, M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p. 29923-29926, set. 2000.

PETROIANU, A. et al. Relação entre diabetes mellitus e fertilidade masculina. **Einstein**, v. 7, n. 4 (Pt 1), p. 407-410, 2009. Disponível em: <http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/1350-Einsteinv7n4p407-10_port.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2012.

PORTO, E. M. et al. Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 11, p. 1040-1048, nov. 2011.

PRICE, D. Comparative aspects of development and structure in the prostate. **National Cancer Institute Monograph**, v. 12, p. 1-27, out. 1963.

PRINS, G. S. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3703-3714, jun. 1992.

PRINS, G. S. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. **Endocrine-related Cancer**, v. 15, n. 3, p. 649-656, set. 2008.

RAMAMANI, A.; ARULDHAS, M. M.; GOVINDARAJULU, P. Differential response of rat skeletal muscle glycogen metabolism to testosterone and estradiol. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 77, n. 4, p. 300-304, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535679>>. Acesso em: 25 set. 2013.

RIBEIRO, D. L. et al. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. **European journal of histochemistry**, v. 50, n. 1, p. 51-60, jan./mar., 2006.

RIBEIRO, D. L. et al. Malignant lesions in the ventral prostate of alloxan-induced diabetic rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 4, p. 276-283, ago. 2008.

RIBEIRO, D. L. et al. High fat-induced obesity associated with insulin-resistance increases FGF-2 content and causes stromal hyperplasia in rat ventral prostate. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 577-588, ago. 2012.

RIBEIRO, D. L.; TABOGA, S. R.; GÓES, R. M. Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulphate proteoglycans of the rat ventral prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 4 p. 400-411, ago. 2009.

ROBERTSON, R. P. et al. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 581-587, mar. 2003. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/content/52/3/581.full>>. Acesso em: 07 out. 2013.

ROY, S. et al. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 1, p. 404-408, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC53272/>>. Acesso em: 26 set. 2013.

SANAI, T. et al. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v. 43, n. 1, p. 91-100, jan. 2000.

SARKER, D. et al. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. **Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 15, p. 4799-4805, ago. 2009. Disponível em: <<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/15/4799.full>>. Acesso em: 15 out. 2013.

SCARANO, W. R. et al. Sexual behavior, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 482-488, ago. 2006.

SCARANO, W. R. et al. Oestrogen supplementation following castration promotes stromal remodelling and histopathological alterations in the Mongolian gerbil ventral prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 89, n. 1, p. 25-37, fev. 2008.

SCHALKEN, J. A.; VAN LEENDERS, G. Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. **Urology**, v. 62, n. 5 (Supplement 1), p. 11-20, nov. 2003.

SCHINNER, S. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 22, n. 6, p. 674-682, jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910615>>. Acesso em: 17 jul. 2012.

SCIARRA, A et al. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link? **European Urology**, v. 52, n. 4, p. 964–972, out. 2007.

SILVA, J. C. et al. Fatores relacionados à presença de recém-nascidos grandes para a idade gestacional em gestantes com *diabetes mellitus* gestacional. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 1, p. 5-9, jan. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032009000100002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 16 jul. 2012.

SIMANAINEN, U. et al. Androgen sensitivity of prostate epithelium is enhanced by postnatal androgen receptor inactivation. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1335-E1343, jun. 2009. Disponível em: <<http://ajpendo.physiology.org/content/296/6/E1335>>. Acesso em: 20 maio 2013.

SINGH, P. et al. Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer. **Endocrine-related Cancer**, v. 13, n. 3, p. 653-666, set 2006.

SOUADAMANI, S. et al. Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation of ventral prostate during sexual maturation of rats. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 287, n. 2, p. 1281-1289, dez. 2005.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 5, p. 961-971, jun. 1986.

TAPLIN, M. E. et al. A phase II study of mifepristone (RU-486) in castration-resistant prostate cancer, with a correlative assessment of androgen-related hormones. **BJU International**, v. 101, n. 9, p.1084-1089, maio 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2008.07509.x/full>>. Acesso em: 15 out. 2013

TAVARES, B. C. et al. Resiliência de pessoas com diabetes mellitus. **Texto & Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 20, n. 4, p. 751-757, out./dez., 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-07072011000400014&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 05 jun. 2012.

THANDAVARAYAN, R. A. et al. Dominant-negative p38 α mitogen-activated protein kinase prevents cardiac apoptosis and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, p. H911-H919, set. 2009. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/content/297/3/H911>>. Acesso em: 15 out. 2013.

THOMAS, L. N. et al. Differential alterations in 5 alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. **The Prostate**, v. 63, n. 3, p. 231-239, maio 2005.

THOMSON, A. A.; CUNHA, G. R.; MARKER, P. C. Prostate development and pathogenesis. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 559-564, jul. 2008.

TIMMS, B. G.; HOFKAMP, L. E., 2011. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. **Differentiation**, v. 82, n. 4-5, p. 173-183, nov.-dez. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468111001253>>. Acesso em: 15 out. 2013.

TUXHORN, J. A. et al. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 9, p. 2912-2923, set 2002.

VAMBERGUE, A.; FAJARDY, I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. **World Journal of Diabetes**, v. 2, n. 11, p. 196-203, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3215769>>. Acesso em: 20 ago. 2013.

VAN MARION, M. M. H. Matrix Metalloproteinases and Collagen Remodeling: A Literature Review. **BMTE**, 06.55, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.mate.tue.nl/mate/pdfs/7435.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2013.

VELASCO, G. et al. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4570-4576, fev. 1999.

VILAMAIOR, P. S. et al. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **The Prostate**, v. 45, n. 3, p. 253-258, nov. 2000.

VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Winstar Rats: a stereological and morphometrical study. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288, n. 8, p. 885-892, ago. 2006.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 12, p. 131-155, fev. 1963.

WEINERT, L. S. et al. Diabetes gestacional: um algoritmo de tratamento multidisciplinar. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 7, p. 435-445, out. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302011000700002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 16 jul. 2012.

WOODS, S. C. et al. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1219–1235, jul. 2006.

WU, D. et al. Collagen I induction by high glucose levels is mediated by epidermal growth factor receptor and phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling in mesangial cells. **Diabetologia**, v. 50, n. 9, p. 2008-2018, set 2007.

XU, J. et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v. 154, n. 5, p. 1069-1079, set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2196184/>>. Acesso em: 16 out. 2013.

YAN, J.; BROWN, T. R. Cell proliferation and expression of cell cycle regulatory proteins that control the G1/S transition are age dependent and lobe specific in the Brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 193-207, jan. 2008.

YANG, Y. et al. Metabolic reprogramming for producing energy and reducing power in fumarate hydratase null cells from hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p.e72179, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744468/>>. Acesso em: 04 nov. 2013.

YE, C. et al. Diabetes causes multiple genetic alterations and downregulates expression of DNA repair genes in the prostate. **Laboratory Investigation**, v. 91, n. 9, p. 1363-1374, set 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/labinvest/journal/v91/n9/full/labinvest201187a.html>>. Acesso em: 24 maio 2013.

YUAN, X.; BALK, S. P. Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration. **Urologic Oncology**, v. 27, n. 1, p. 36-41, jan.-fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245883/>>. Acesso em: 04 nov. 2013.

ZHOU, Y. T. et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1784-1789, feb. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26513/>>. Acesso em: 15 out. 2013.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 133/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 043/11**

Projeto Pesquisa: “Influências do diabetes materno sobre o desenvolvimento renal pós-natal e expressão de MAPK no córtex renal de ratas Wistar”.

Pesquisador Responsável: Ana Paula Coelho Balbi

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 21 de setembro de 2011.



Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU