

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ISABELLA SILVA CASSIMIRO

ESTUDO IN VITRO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DA
PRÓSTATA DE RATOS SOB INFLUÊNCIA DE GLICOSE

UBERLÂNDIA

2019

ISABELLA SILVA CASSIMIRO

ESTUDO IN VITRO DO DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DA PRÓSTATA
DE RATOS SOB INFLUÊNCIA DE GLICOSE

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 em Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C345 Cassimiro, Isabella Silva, 1994-
2019 Estudo in vitro do desenvolvimento pós-natal da próstata de
ratos sob influência de glicose [recurso eletrônico] / Isabella Silva
Cassimiro. - 2019.

Orientadora: Daniele Lisboa Ribeiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2274>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Citologia. I. Ribeiro, Daniele Lisboa, 1981-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia
Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 005/2019 do PPGBC				
Data:	18 de Julho de 2019	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:00
Matrícula do Discente:	11722BCE003				
Nome do Discente:	Isabella Silva Cassimiro				
Título do Trabalho:	Estudo do desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos sob influência de glicose				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia da Reprodução				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se na Sala de Videoconferência, Sala 2B 216, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Ana Paula da Silva Perez – UFG; Ana Paula Coelho Balbi – UFU e Daniele Lisboa Ribeiro** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). **Daniele Lisboa Ribeiro**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre**.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Coelho Balbi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/08/2019, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele Lisboa Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/08/2019, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula da Silva Perez, Usuário Externo**, em 07/08/2019, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1437387** e o código CRC **6D356831**.

Aos meus pais, Maurício e Janete, que
abdicaram de sonhos ou os postergaram para
que eu alcançasse os meus mais rapidamente.
Aos meus avós, que pavimentaram a porção
mais árdua e inicial do caminho, o qual
permaneço percorrendo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Jeová, pelo dom da vida, pelo presente da capacidade de raciocínio e de produzir conhecimento, por permitir que eu contemple pelo olhar da ciência suas atividades, imensa sabedoria e engenhosidade, por me dar serenidade e resiliência.

À Prof^a. Dra. Daniele Lisboa que na posição de orientadora me ensinou valiosas lições, as quais levarei comigo para sempre. Obrigada por ser inspiradora enquanto cientista e mulher. Sua grande competência certamente tem impacto sobre quem sou atualmente e em tudo que poderei me tornar daqui em diante como pesquisadora e docente.

À minha família por nunca permitir que eu desista dos meus sonhos e sempre acreditar no meu potencial. Obrigada pelo conforto e amor constantes.

Ao meu amor, Jonathan, que tem passado pelos momentos mais difíceis e também pelos mais alegres da minha jornada durante os últimos seis anos. Se hoje concluo mais um passo em minha carreira certamente devo muito ao seu incansável apoio.

Aos meus amigos e amigas membros do PPGBC e colegas de laboratório que tornaram a busca pelo título de mestre mais suave. Sua ajuda foi valiosa.

Aos professores do PPGBC que tanto me ensinaram, alguns desde a graduação em Biomedicina. Espero conseguir de alguma forma transmitir à sociedade o conhecimento que hoje tenho e que ainda obterei, pois vocês me deram ferramentas para isso, e compensar o investimento de seu tempo e energia ao me ensinarem.

Agradeço aos professores doutores membros da banca de defesa pela disposição em avaliarem o presente trabalho; ao LabGen na figura do Dr. Carlos Ueira Vieira pela parceria em experimentos; ao ICBIM por fornecer a estrutura dos laboratórios; à FAPEMIG por conceder os recursos necessários à realização do trabalho e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu ter dedicação exclusiva à pesquisa.

“Na vida nada deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

- Marie Curie

RESUMO

O diabetes materno interfere na sinalização hormonal e afeta a estrutura da próstata de roedores adultos. Contudo, os efeitos do ambiente hiperglicêmico sobre a próstata de neonatos não são bem descritos. Além de se desenvolverem sob condições hiperglicêmicas os filhotes de ratas diabéticas podem nascer moderadamente hiperglicêmicos. Visto que os eventos pós-natais são críticos para o desenvolvimento e maturação prostáticos, é essencial esclarecer o impacto de concentrações aumentadas de glicose nos primeiros dias após o nascimento. O trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* os efeitos de diferentes concentrações de glicose no desenvolvimento pós-natal da próstata. As próstatas foram removidas de ratos recém-nascidos (dia 0) e cultivadas por 1, 2 e 3 dias em DMEM com glicose a 100 mg/dL (Controle), 225 mg/dL (glicose moderada) ou 450mg/dL (alta glicose). As amostras foram processadas para análise histológica (coloração por H&E e Picrosirius); imunohistoquímica para α -actina de músculo liso e PCNA; ou homogeneizadas para avaliação da atividade de caspases, concentração de TGF- β pelo método ELISA e quantificação das proteínas p-ERK1/2 e MMP-2 por *Western blot*. Como resultado, observou-se que a alta concentração de glicose reduz o número de brotos prostáticos e leva à perda maciça de células em proliferação, tanto epiteliais como estromais, em relação ao grupo controle. O aumento natural na deposição de colágeno observado no controle durante os primeiros 3 dias de desenvolvimento é afetado pelos níveis aumentados de glicose, sendo que os grupos tratados apresentam severa diminuição na distribuição dessa proteína. Além disso, a frequência de células musculares lisas também é reduzida pelos ambientes de concentrações moderada e alta de glicose. A atividade da caspase é significativamente maior em próstatas incubadas em concentração moderada de glicose e há aumento expressivo da concentração de TGF- β nos grupos tratados em relação ao controle. Por fim, observou-se que a produção de p-ERK1/2 e MMP-2 foi desestimulada nos grupos tratados. Esses dados mostram que o desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos é afetado por níveis elevados de glicose visto que estes comprometem a estrutura glandular pela redução de células em divisão; pelo prejuízo a importantes moléculas sinalizadoras que participam dos processos de proliferação e sobrevivência celular; por meio do aumento de morte celular e diminuição de elementos estromais.

Palavras-chave: Próstata. Desenvolvimento. Diabetes.

ABSTRACT

Maternal diabetes interferes with hormone signaling and affects the adult rodent prostate structure. However, the effects of the hyperglycemic environment on the prostate of neonates are not well described. In addition to developing under hyperglycemic conditions, pups of diabetic rats may be born moderately hyperglycemic. Since postnatal events are critical for prostate development and maturation, clarifying the impact of increased glucose concentrations in the first few days after birth is essential. We aimed to evaluate *in vitro* effects of different glucose concentrations on postnatal prostate development. Prostates were removed from newborn rats (day 0) and cultured for 1, 2 and 3 days in DMEM under glucose at 100 mg / dL (Control), 225 mg / dL (moderate glucose) or 450 mg / dL (high glucose) . Samples were processed for histological analysis (H&E and Picrosirius staining); immunohistochemistry for smooth muscle α -actin and PCNA; or homogenized for evaluation of caspase activity, TGF- β concentration by the ELISA method and quantification of p-ERK1/2 and MMP-2 proteins by Western blot. High glucose concentration reduces the number of prostatic buds and induces massive loss of proliferating cells, both epithelial and stromal, compared to control. The natural increase in collagen deposition observed in the control during the first 3 days of development is affected by increased glucose concentrations since treated groups presented drastic reduction on collagen distribution. In addition, the frequency of smooth muscle cells is also reduced by environments of moderate to high glucose concentrations. The activity of caspase is significantly higher in prostates incubated at moderate glucose concentration and there is an expressive increase of TGF- β concentration in the treated groups compared to control. Finally, it was observed that the activation of p-ERK1 / 2 and the content MMP-2 decreased in the treated groups. These data show that rat prostate postnatal development is affected by elevated glucose levels, impairing glandular structure by mitosis reduction; damage to important signaling molecules, who have part on cell proliferation and survival; by increasing cell death and decreasing stromal elements.

Keywords: Prostate. Development. Diabetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura das próstatas humana e de roedor.....	15
Figura 2 - Morfogênese pós-natal da próstata de roedor.....	18
Figura 3 - Desenvolvimento prostático nas 12 primeiras semanas pós-natais.....	19
Figura 4 - Esquema simplificado da via de sinalização ERK.....	23
Figura 5 - Vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/Akt/mTOR.....	24
Figura 6 - Macroscopia de próstatas cultivadas em meio controle, glicose moderada e alta glicose nos dias 1, 2 e 3 após o nascimento.....	30
Tabela 1 - Média das áreas prostáticas.....	31
Figura 7 - - Histoarquitetura de próstatas cultivadas durante 1, 2 e 3 dias em meios com diferentes concentrações de glicose (coloração H&E).....	32
Figura 8 - Representação gráfica da média de brotos acinares.....	33
Figura 9 - Representação gráfica da média de figuras mitóticas nos brotos acinares.....	33
Figura 10 - Imunohistoquímica para PCNA.....	35
Figura 11 - Representação gráfica da frequência média de células epiteliais em proliferação nas próstatas sob influência de glicose.....	36
Figura 12 - - Representação gráfica da frequência média de células estromais em proliferação nas próstatas sob influência de glicose.....	36
Figura 13 - Representação gráfica da atividade das caspases 3/7.....	37
Figura 14 - Imunohistoquímica para alfa-actina.....	38
Figura 15 - Representação gráfica da quantidade de alfa-actina nas próstatas cultivadas em diferentes concentrações de glicose.....	39
Figura 16 - Coloração por picrossírius-hematoxilina.....	40
Figura 17 - Representação gráfica da quantidade de colágeno em próstatas cultivadas sob diferentes concentrações de glicose.....	41
Figura 18 - Representação gráfica dos conteúdos de MMP-2 e p-ERK1/2.....	41
Figura 19 - Concentração de TGF- β em próstatas de ratos cultivadas sob a influência de glicose.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1- Diabetes e hiperglicemia.....	11
2.2- Reprogramação fetal.....	13
2.3- Estrutura, fisiologia e desenvolvimento da próstata.....	14
2.4- Relação entre diabetes/hiperglicemia e próstata.....	20
2.5- Vias de sinalização ERK e Akt.....	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1- Objetivo Geral.....	25
3.2- Objetivos Específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1- Animais e protocolo de cultura de órgão inteiro (próstata).....	26
4.2- Processamento das próstatas para análise histológica.....	26
4.3- Análise imunocitoquímica da proliferação celular e células musculares lisas.....	27
4.4- Western blotting.....	28
4.5- Avaliação da morte celular por apoptose.....	28
4.6- Quantificação de TGF- β por ELISA.....	29
4.7- Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 – Os tratamentos com glicose em concentrações moderada e alta não alteram a área tecidual da próstata.....	29
5.2 - Concentrações aumentadas de glicose induzem redução do número de brotos prostáticos.....	30
5.3 - Altos níveis de glicose induzem redução do número de figuras mitóticas nos brotos prostáticos.....	30
5.4 - Concentrações aumentadas de glicose diminuem a proliferação celular e morte celular por apoptose.....	33
5.5 – Os tratamentos com glicose em concentrações moderada e alta reduzem a expressão de alfa-actina de músculo liso.....	33
5.6 – Concentrações aumentadas de glicose induzem redução da quantidade de colágeno.....	33
5.7 – O ambiente rico em glicose desencadeia diminuição da expressão de MMP-2 na próstata.....	37

5.8 – A ativação da proteína ERK1/2 na próstata diminui com o aumento da concentração de glicose.....	37
5.9- Concentrações elevadas de glicose causam aumento da expressão de TGF- β	39
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

A alta prevalência de diabetes e o contínuo aumento da sua incidência mundial, incluindo o diabetes gestacional, tornam os estudos sobre os efeitos dessa doença nos diferentes sistemas orgânicos de importante relevância médico-social. Embora o impacto negativo do diabetes na próstata adulta seja bem descrito na literatura, não são claros seus efeitos durante o desenvolvimento intra-uterino da glândula tampouco se o ambiente hiperglicêmico materno prejudica os acontecimentos pós-natais tão importantes para a formação e maturação dessa glândula. Damasceno e colaboradores (2014) demonstraram que a hiperglicemia tem impacto negativo na próstata ventral de ratos adultos nascidos de mãe diabéticas. Neste trabalho, notou-se que os animais, além de desenvolverem hiperglicemia e hipotestosteronemia, tiveram uma diminuição no peso da glândula, desarranjo histológico associado à maior proliferação celular e expressão de receptor androgênico e TGF- β - uma importante molécula reguladora da expressão de proteínas da matriz extracelular (JAVELAUD & MAUVIE, 2004) - e elevado conteúdo de metaloproteínas.

Fica evidente, portanto, que o diabetes materno modifica o microambiente prostático de forma a impactar a vida adulta da glândula. Entretanto, não está bem definido se os efeitos são decorrentes da carência androgênica ou da hiperglicemia desses animais. Ainda não existem evidências suficientes para a compreensão do efeito da hiperglicemia no desenvolvimento prostático recém pós-natal. Tendo em vista que muitos eventos do desenvolvimento da próstata ocorrem nas primeiras semanas após o nascimento, o esclarecimento do impacto da hiperglicemia sobre o desenvolvimento da glândula nesse período é de extrema relevância para a prevenção de distúrbios na função reprodutiva durante a vida adulta. Assim, o presente trabalho avaliou se os eventos de morte e proliferação celular bem como a arquitetura histológica da próstata no início do seu desenvolvimento são afetados por ambientes hiperglicosados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Diabetes e hiperglicemia

Diabetes corresponde a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, a qual desencadeia alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios e está relacionada a prejuízos em longo prazo e disfunção de vários órgãos e estruturas (THOMAS & PHILIPSON, 2015). 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, 2016).

Projetava-se que até 2030 cerca de 366 milhões de pessoas apresentassem a doença (WILD et. al, 2004), porém de acordo com os dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde em seu Relatório Global sobre Diabetes (2016), no ano de 2014 essa previsão já havia sido superada, uma vez que neste mesmo ano foram reportados 422 milhões de casos em adultos. Em 2017, o número de casos diagnosticados chegou a 425 milhões (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Um dos principais fatores de risco ligados ao surgimento do diabetes é o sobrepeso. Segundo dados do Observatório de Saúde Global, mundialmente 39% das mulheres e 39% dos homens adultos apresentam sobrepeso e especificamente no Brasil, as estimativas são de 18,5 % da população masculina adulta e 25,4% das mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016, 2017).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (2015) a doença pode ser classificada de acordo com quatro categorias gerais. A primeira é o tipo 1, dado basicamente pela destruição de células β pancreáticas, o que comumente leva à absoluta deficiência de insulina. Os principais sintomas são polidipsia (sede aumentada), poliúria (aumento do volume urinário) e perda de peso, Tais sinais e sintomas podem ser acompanhados de polifagia (fome excessiva). O tipo 2, marcado pela deficiência progressiva na secreção de insulina associada a uma condição de resistência insulínica. É a forma que acomete a vasta maioria dos diabéticos em todo o mundo. Neste tipo há produção de insulina, porém a ação desta é ineficiente, o que é conhecido como resistência insulínica. Esta resistência é o estado no qual ocorre menor captação de

glicose nos tecidos periféricos em resposta à ação da insulina. Respondendo a tal resistência tecidual e hiperglicemia, há um aumento da secreção de insulina pelas células β , com o objetivo de manter a glicemia dentro dos valores normais. Porém, como afirmam Bell & Polonsky (2001), se essas células falham na adaptação à nova demanda de insulina ocorre piora no quadro de resistência e, conseqüentemente, desenvolvimento do diabetes tipo 2. Os sintomas são similares aos clássicos, mas é muito comum que sejam mais brandos ou até ausentes. Assim, esta forma de manifestação da doença pode permanecer não diagnosticada por vários anos até que severas complicações surjam. Por muito tempo se definiu o diabetes tipo 2 como sendo próprio de indivíduos adultos, porém a frequência em crianças tem aumentado dada a crescente tendência da população mundial adotar hábitos de vida sedentários (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Além disso, tem-se o *diabetes mellitus* gestacional ou diabetes materno que corresponde a uma forma da doença que se manifesta entre o segundo e terceiro trimestre de gestação em mulheres que não tinham diagnóstico de diabetes anterior à gravidez. Esta forma é definida pelo quadro de intolerância à glicose o qual pode ocorrer em diferentes intensidades e resulta em hiperglicemia, que pode permanecer ou não após o parto (BAZ et al., 2016; WEINERT et al., 2011). A prevalência do diabetes materno situa-se em torno de 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 diabetes (DETSCH et al., 2011; PADILHA et al., 2010). Segundo a Federação Internacional de Diabetes (2017), 1 em cada 7 nascimentos é afetado pelo diabetes gestacional e a maioria dos casos de hiperglicemia durante a gravidez ocorre em países de baixa e média renda, nos quais o acesso materno a cuidados médicos é frequentemente limitado. À medida que a obesidade tem se tornado epidêmica, o diabetes gestacional e do tipo 2 recém diagnosticado na gravidez têm se tornado cada vez mais comuns em mulheres de todas as raças.

Durante a gestação normalmente ocorre hiperplasia de células β -pancreáticas pela estimulação via prolactina e lactogênio placentários, resultando em níveis aumentados de insulina. Porém, a placenta também produz hormônios diabetogênicos tais como hormônio do crescimento (GH), hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e progesterona, o que gera resistência insulínica. A incapacidade de superar a resistência à insulina apesar da hiperplasia de células beta leva ao diabetes gestacional (MACK &

TOMICH, 2017). Este tipo de diabetes implica em aumento do risco de complicações durante a gestação tanto para a mãe quanto para o feto. As complicações mais frequentes para a gestante são a ruptura prematura de membranas, o parto prematuro 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 posteriormente à gestação. Para o feto, há maior risco de macrosomia, hipoglicemia, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, policitemia, síndrome de desconforto respiratório e morte perinatal (LIRA & DIMENSTEIN, 2010). Por fim, há diabetes de outras origens como por falhas genéticas (diabetes monogênico), doenças no pâncreas exócrino e por razões iatrogênicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

2.2- Reprogramação Fetal

O desenvolvimento fetal é, em especial, negativamente afetado quando há interação entre o ambiente intrauterino desfavorável e predisposição genética ao desenvolvimento de doenças. Sugere-se que o desequilíbrio nutricional e distúrbios metabólicos maternos tenham efeito persistente e intergeracional na saúde da prole e sobre o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. Este processo é denominado reprogramação fetal, o qual se dá no momento em que fatores hostis rompem o ambiente ótimo no qual o feto cresce, sendo tal evento particularmente prejudicial durante períodos críticos ao desenvolvimento de órgãos essenciais. Ocorrem alterações epigenéticas de alguns genes como uma resposta adaptativa a ambientes hostis. Estas modificações podem representar um importante mecanismo de manutenção da homeostase do organismo em formação sob condições inadequadas. Uma vez que alterações ocorrem, o fenótipo se torna permanente e pode determinar o gatilho para futuros problemas de saúde (PERRONE, 2016; MARCINIAK, 2017).

Além das complicações imediatas induzidas pelo diabetes gestacional, os recém-nascidos de mães diabéticas também apresentam maior risco de morbidades em longo prazo. A nutrição fetal é influenciada pela dieta e composição corporal das mães. Adaptações nutricionais precoces por sub ou supernutrição maternas, como na vida intrauterina, podem trazer mudanças permanentes ao metabolismo de carboidratos, resultando em distúrbios no adulto. O alto peso ao nascer é um fator predisponente para a resistência insulínica, obesidade e diabetes tipo 2. Portanto, acredita-se que uma série de

doenças crônicas possam ser prevenidas por se alcançar um desenvolvimento fetal e infantil ótimos (SILVA et al., 2009; FALL, 2013).

2.3- Estrutura, fisiologia e desenvolvimento da próstata

A próstata é uma glândula acessória exócrina componente do trato genital masculino de mamíferos, que se situa abaixo da bexiga e circunda a parte proximal da uretra pélvica (GOBBO et al., 2012). A principal função desta glândula, de acordo com Hayward & Cunha (2000), é produzir as proteínas e íons que formam a maior parte do fluido seminal, o qual fornece aos espermatozóides condições ideais de sobrevivência e viabilidade durante e após a ejaculação.

Atualmente utiliza-se a classificação de McNeal (1988) que, através de estudo anatômico e histológico, dividiu a próstata humana em zonas. Desta forma, há três regiões prostáticas bastante distintas (Fig. 1A) designadas zona de transição, zona central e zona periférica. A zona central consiste de uma porção de tecido glandular circundando os ductos ejaculatórios, constituindo aproximadamente 25% da próstata normal (MCNEAL, 1972). A zona periférica é a maior região da próstata, abrangendo aproximadamente 70% do volume desta glândula. Os outros 5% remanescentes formam a zona de transição. Em roedores, esta glândula é formada por quatro pares de lobos (Fig. 1B) bilateralmente simétricos designados, de acordo com a sua localização na uretra, em: anterior (LA), ventral (LV), lateral (LL) e dorsal (LD). Observa-se considerável heterogeneidade quanto à histologia e sensibilidade androgênica entre os diferentes lobos, sendo o lobo ventral o que apresenta resposta androgênica e histologia mais semelhantes à próstata humana (PRINS, 1992).

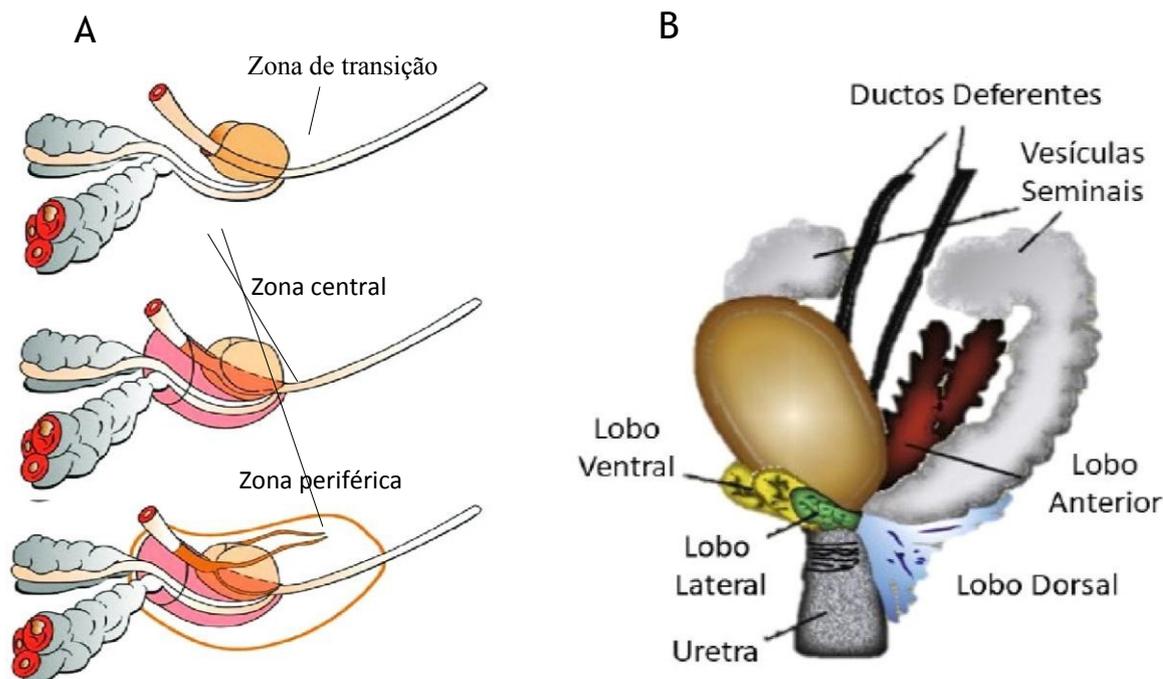


Figura 1 - Estrutura das próstatas humana e de roedor (A) Representação esquemática de próstata humana de acordo com a anatomia zonal descrita por J. E. McNeal (1988). A primeira imagem representa a zona de transição periuretral. A segunda imagem mostra a zona central envolvendo os ductos ejaculatórios. A terceira imagem representa a zona periférica. (B) Representação da próstata de roedor contendo os quatro principais lobos bilaterais. (Imagens adaptadas de <https://www.researchgate.net/figure/Zonal-anatomy-of-the-prostate-described-by-J-E-McNeal-Am-J-Surg-Pathol_fig2_235736309 [accessed 21 Jun, 2019]>; e AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016, respectivamente).

Histologicamente, a próstata é composta por túbulos secretores e ácinos, possuindo uma parte epitelial e outra estromal (CUNHA et al., 2004). No epitélio secretor há ao menos cinco tipos de células que apresentam fenótipo distinto e função específica: células tronco, células basais, células intermediárias, células luminais ou secretoras e células neuroendócrinas (DE MARZO et al., 1998; SINGH et al., 2006; RATO et al; 2015). Células tronco são raras e correspondem, em número, a menos de 1% das células basais do epitélio prostático. As células intermediárias são pouco diferenciadas, estando num estágio transiente de intensa capacidade proliferativa enquanto as células luminais secretoras são as responsáveis pela produção de glicoproteínas que farão parte da composição seminal. Tais células são plenamente diferenciadas enquanto a porção basal do epitélio prostático consiste em células precursoras que proliferam e transitam pelo epitélio até se diferenciarem em células luminais secretoras. As células neuroendócrinas têm localização difusa ao longo do epitélio. Estas secretam uma série de peptídeos e amins bioativas, podendo atuar na regulação da diferenciação e crescimento prostáticos (ARCOLINO, 2010; LEE; PEEHL, 2004).

O estroma é formado por uma região subepitelial que possui fibroblastos e fibras colágenas localizadas em uma ou duas camadas, seguida de uma região rica em células musculares lisas que circundam os ácinos secretores (GOBBO et al., 2012). As células estromais sintetizam os componentes da matriz extracelular, enquanto as células musculares lisas são responsáveis pela contração da glândula e pela interação epitélio-estromal (CUNHA et al, 2004). Esta interação se dá pela sinalização bilateral entre epitélio e estroma e, nos primórdios do desenvolvimento prostático, entre epitélio e mesênquima. Tal comunicação é um elemento essencial à formação de ductos, diferenciação de células e crescimento glandular; e na próstata adulta, regula a homeostase proliferativa (SHAW; ATTIA; BUSHMAN, 2008). Associados aos elementos da matriz encontram-se também fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias das atividades celulares. Dessa forma, as células ao sintetizarem a matriz extracelular, influenciam a morfogênese, maturação e homeostase da glândula (OKAMURA et al., 2008; WONG & TAM, 2002).

A manutenção das funções prostáticas não é influenciada apenas pela síntese de moléculas da matriz extracelular. A degradação de componentes da matriz extracelular tem, igualmente, papel biológico em um processo denominado remodelação estromal, que pode ocorrer normalmente durante o desenvolvimento, mas também sob condições patológicas ou de privação androgênica (MAUNEY; OLSEN; VOLLOCH, 2010; BANERJEE et al, 2018). As moléculas ativamente envolvidas na remodelação são as metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de endopeptidases dependentes de cálcio, responsáveis pela remodelação ou degradação de matriz extracelular, agindo sobre diversos substratos tais como colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos. Inibidores endógenos e teciduais de MMPs exercem controle estrito sobre a ação destas. Isso é importante uma vez que a superexpressão de MMPs e consequente desequilíbrio na proporção destas em relação a seus inibidores pode levar a uma variedade de condições patológicas não apenas por gerar remodelação tecidual, mas também pela liberação de moléculas sinalizadoras que estimulam angiogênese, migração e proliferação celular (KAPOOR et al, 2016; TUXHORN et al., 2002).

Os andrógenos são provavelmente os principais fatores tróficos no desenvolvimento do epitélio prostático secretor. De fato, a próstata é uma glândula andrógeno-dependente altamente sensível a distúrbios hormonais e que apresenta alta capacidade de resposta a hormônios androgênicos (ARCOLINO, 2010; GOBBO et al., 2012). A ação dos andrógenos é essencial para indução da diferenciação epitelial

prostática durante o desenvolvimento embrionário e maturação pós-natal e para a manutenção normal da atividade secretora e diferenciação celular da glândula adulta (ARCOLINO et al. 2010). O principal andrógeno circulante no homem é a testosterona, sendo a sua maior porção produzida pelos testículos e apenas 5% gerados pelo precursor dehidroepiandrosterona (DHEA) nas adrenais (LABRIE et al., 2001; LABRIE, 2010). Outro importante intermediário é androstenediona, a qual é convertida em testosterona pela enzima 17-beta-hidroxiesteroide-desidrogenase nos tecidos periféricos. Na próstata, o andrógeno biologicamente ativo é a 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT), que é produzido pela conversão local da testosterona pela enzima 5-alfa-redutase (CLARK; PROUGH; KLINGE, 2018; HAYWARD & CUNHA, 2000). Tanto a testosterona quanto 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 androgênico e tem atividade mais potente que a testosterona (HUANG & TINDALL, 2002). A ação direta de andrógenos nas células epiteliais via receptor androgênico resulta na diferenciação de células epiteliais luminais e regula a transcrição de proteínas fundamentais à formação da secreção prostática, tais como o antígeno prostático específico (GAO & ISAACS, 1998; SUGIMURA, CUNHA & DONJACOUR, 1986; ARCOLINO et al., 2010). Já a proliferação no epitélio acinar é indiretamente controlada por estimulação androgênica via células estromais, que também possuem receptor androgênico. As células estromais secretam fatores de crescimento tais como EGF, FGF-7, FGF-10 e IGF-1, coletivamente denominadas andromedinas. A secreção parácrina de andromedinas ativa a proliferação celular epitelial e é fundamental à sobrevivência de células luminais (UZGARE; XU; ISAACS, 2003; D'ANTONIO; VANDER; ISAACS, 2009). Esse mecanismo que ocorre desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta é chamado de interação epitélio-estroma, processo já mencionado anteriormente. Outros hormônios como insulina, glicocorticóides e estrogênio também têm impacto nesta glândula, sendo importantes na sua regulação fisiológica (CLEUTJENS, 1997; PUFALL, 2015).

Com relação à morfogênese, o desenvolvimento prostático inicial se dá no estágio pré-brotamento a partir do seio urogenital por volta do 13º dia após a concepção, em roedores, e entre 8-9 semanas de gestação em humanos (BRUNI-CARDOSO et al., 2008; CUNHA et al., 2018). Em ambos, porém, importantes eventos pós-natais têm impacto no desenvolvimento final da próstata (BRUNI-CARDOSO & CARVALHO, 2007; HAYWARD & CUNHA, 2000; VILAMAIOR et al., 2006). Este desenvolvimento

pós-natal inclui crescimento epitelial, ramificação e canalização (Fig. 2) que resulta ou ocorre concomitantemente à diferenciação do epitélio (SUGIMURA et al., 1986)

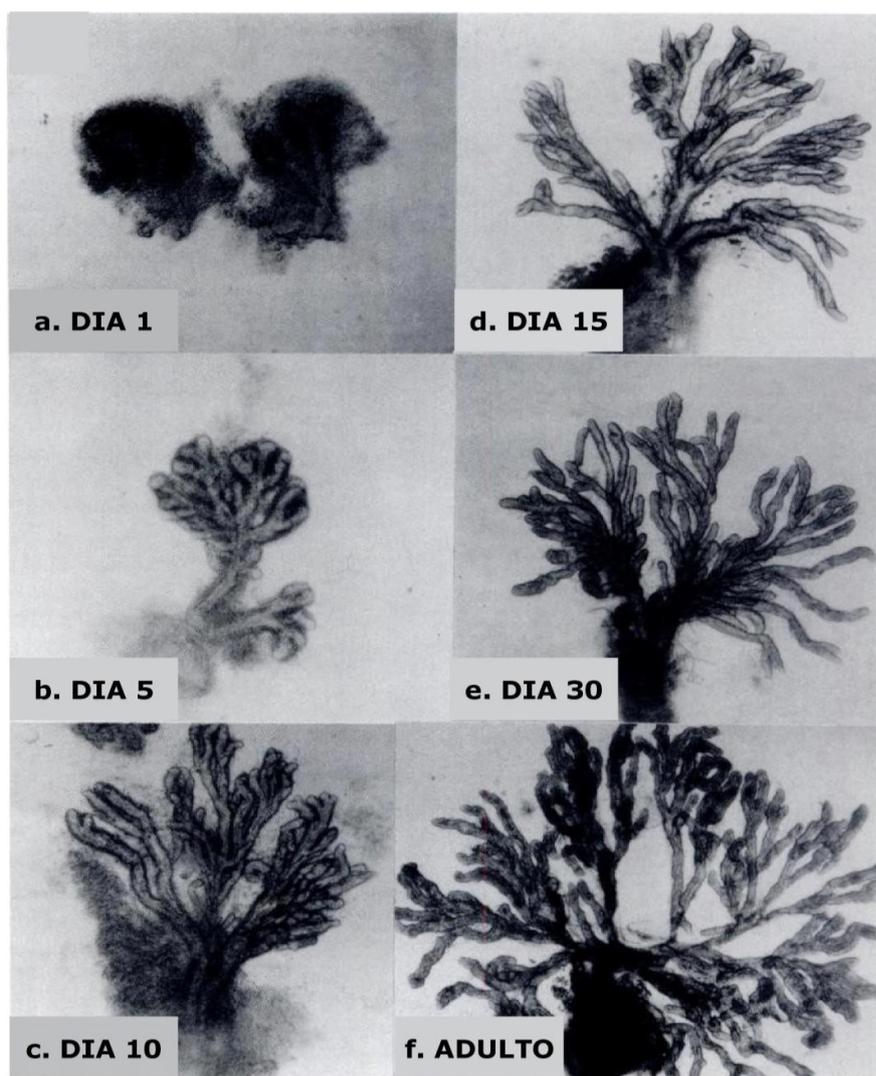


Figura 2 - Morfogênese pós-natal da próstata ventral de roedor. No dia 1 (a), ductos principais repousam em mesênquima denso. A ramificação distal progride do quinto dia após o nascimento em diante (b-f). Após 30 dias a maior parte da ramificação está completa. O contínuo crescimento da glândula após 30 dias ocorre pelo alongamento de ductos preexistentes (Adaptado de SUGIMURA, CUNHA & DONJACOUR, 1986).

O primeiro evento da morfogênese é a formação de sólidos cordões epiteliais no mesênquima circundante. Os cordões epiteliais passam por alongamento, ramificação e canalização após o nascimento enquanto há reorganização da porção estromal da glândula (TIMMS, 2008). Percebe-se, portanto, que a próstata ventral de ratos apresenta desenvolvimento complexo e progressivo no período pós-natal.

Vilamaior e colaboradores (2006) identificaram um crescimento inicial da próstata de ratos após o nascimento acompanhado de aumento no peso da glândula. Em seguida, há um período de repouso entre a quarta e sexta semanas no qual o crescimento

prostático é proporcional ao crescimento corporal e, a partir da sétima semana, o crescimento é retomado, caracterizando a fase puberal, até o período adulto. Nesse mesmo estudo observou-se, no que concerne ao desenvolvimento dos ductos prostáticos (Fig. 3), que nas primeiras três semanas após o nascimento há formação do lúmen e preenchimento deste com material de secreção, e ocorre também diferenciação epitelial pela formação de cordões na primeira semana e organização progressiva de epitélio simples. Da terceira semana até a sexta não há mudanças histológicas significativas, porém da sexta semana em diante encontram-se invaginações epiteliais e brotos acinares até a décima semana. Desta até a 12^a semana há aumento do diâmetro luminal com distensão epitelial, assim os brotos e invaginações desaparecem. Quanto à concentração sérica de testosterona, esta permanece baixa até a quinta semana de desenvolvimento pós-natal. Seus níveis aumentam da sexta semana em diante e atingem seu pico na nona semana após o nascimento. Assim, o aumento da concentração de testosterona é o responsável pela diferenciação epitelial e início da atividade secretora da glândula.

Figura 3- Diagrama esquemático do desenvolvimento prostático nas primeiras 12 semanas pós-natais (Adaptado de VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006)

Em paralelo a esse processo, ocorre o desenvolvimento do estroma. Andrógenos atuam nos receptores androgênicos presentes no mesênquima urogenital para induzir a proliferação e diferenciação do epitélio e ramificação ductal ainda no desenvolvimento intrauterino e alguns dias após o nascimento (MARKER et al., 2003). O desenvolvimento epitelial, por sua vez, induz 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 haja estímulo inicial do mesênquima urogenital resultando no desenvolvimento da próstata (THOMSON et al., 2002; VILAMAIOR et al., 2006).

2.4- Relação entre diabetes/hiperglicemia e próstata

Muitos trabalhos apontam para o diabetes como fator de risco para disfunção sexual e outras alterações do sistema reprodutor masculino tanto em seres humanos quanto em roedores (BAK et al., 2017; MAIORINO et al., 2014; GIUGLIANO et al., 2010). As desordens sexuais masculinas ligadas ao diabetes são diminuição da libido, disfunção erétil e redução da qualidade do sêmen além de alterações morfológicas das glândulas sexuais acessórias, o que inclui a próstata (SCARANO 2006; VÁRKONYI & KEMPLER, 2014; RIBEIRO et al., 2008).

Algumas alterações na função do sistema reprodutor masculino causadas pelo diabetes podem ocorrer por dano ao endotélio em função da hiperglicemia. O acúmulo de produtos finais de glicação avançada e aumento da concentração sérica de espécies reativas de oxigênio limitam a síntese e atividade do óxido nítrico. A manifestação da disfunção erétil, portanto, é dada pela diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico, resultando em relaxamento insuficiente da musculatura vascular e consequente prejuízo à ereção peniana (THORVE, et al., 2011). Contudo, muitas modificações induzidas pelo diabetes são decorrentes da diminuição de testosterona. Dhindsa e colaboradores (2004) observaram baixas concentrações de testosterona em 25% dos homens estudados acometidos por diabetes do tipo 2. Os mecanismos que levam à deficiência de testosterona no diabetes incluem baixos níveis de globulina ligadora de hormônios sexuais em virtude da resistência insulínica; aumento da atividade da enzima aromatase no tecido adiposo visceral, o que leva a uma conversão aumentada de testosterona em estradiol; resistência à leptina, que leva à redução da secreção de hormônio luteinizante

(LH) e testosterona; e níveis aumentados de mediadores inflamatórios que podem suprimir a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina e LH (MALAVIGE, 2009; DANDONA, 2011). Bellastella e colaboradores (2013) ainda sugerem a possibilidade de uma patogênese autoimune de hipogonadismo hipogonadotrófico em pacientes com diabetes tipo 2, visto que estes apresentaram no estudo alta titulação de anticorpos antihipófise em relação aos controles de mesma idade. Além disso, o diabetes leva a mudanças moleculares nas células de Leydig responsáveis pela síntese de testosterona nos testículos. Portanto, existe associação direta entre prejuízos às funções sexuais masculinas e a síntese inadequada de testosterona decorrentes do diabetes.

Um estudo de Ribeiro e colaboradores (2006) demonstrou que o diabetes promove redução da massa da próstata ventral e atrofia no epitélio secretor em camundongos adultos, sugerindo que a ausência de insulina, a hiperglicemia e a queda androgênica devido ao diabetes afetam o funcionamento da glândula. Outros estudos ainda revelam que o diabetes causa significativa atrofia na próstata de roedores, interfere na proliferação e apoptose de células epiteliais, modifica a expressão de receptores androgênicos e leva à importante remodelação estromal (ARCOLINO et al., 2010; GOBBO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2009) De fato, é comum que o diabetes conduza à remodelação estromal, o que envolve 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 da glândula. Visto que essas modificações são muito similares às que ocorrem após a castração de machos adultos, sugere-se que elas se deem como resultado da diminuição do nível de testosterona induzida pelo diabetes (CARVALHO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2008, RIBEIRO; TABOGA; GÓES, 2009). Ainda, Damasceno e colaboradores (2014) demonstraram que a hiperglicemia tem impacto negativo na próstata ventral de ratos adultos nascidos de mãe diabéticas. Nesse trabalho, foi relatado que os animais, além de desenvolverem hiperglicemia e hipotestosteronemia, tiveram uma diminuição no peso da glândula; desarranjo histológico associado à maior proliferação celular e expressão de receptor androgênico e TGF- β ; e elevado conteúdo de metaloproteinases. Fica claro, portanto, que o diabetes materno continua tendo impacto sobre a prole adulta. Porém, tal evidência revela a necessidade de se investigar se esse impacto já pode ser observado nos primeiros dias de desenvolvimento pós-natal da próstata, nos quais ocorrem eventos cruciais para a

formação adequada da glândula, e até que ponto esse efeito é em decorrência da hiperglicemia ou de carência androgênica.

2.5- Vias de sinalização ERK e Akt

O desenvolvimento da maioria dos organismos depende de um pequeno conjunto de sistemas de sinalização que combinados guiam o padrão de formação de novos tecidos (PATEL & SHVARTSMAN, 2018). Um desses sistemas é a cascata das cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) a qual faz parte da via de sinalização geral das MAPKs (cinases ativadas por mitógeno). A via MAPK/ERK está associada à proliferação, diferenciação, sobrevivência, senescência e apoptose celular (SUN et al., 2015). A ativação da via se dá pela ação de ligantes sobre receptores tirosina-quinase (RTK), como o receptor de insulina e do fator de crescimento epidérmico. Os RTKs têm a capacidade de fosforilar proteínas-alvo por meio de sua porção citosólica quando recebem seus respectivos ligantes, desencadeando uma reação em cadeia de fosforilações que culmina na transcrição de genes específicos. Por exemplo, a ligação do hormônio insulina a seu receptor deflagra a fosforilação de Ras, uma proteína transdutora de sinal. Esta, em seu estado ativado, fosforila a proteína Raf-1 que, por sua vez, exerce atividade de cinase sobre MEK (ou MAP2K), a qual fosforila ERK. A ERK fosforilada é dirigida ao núcleo celular onde ativa fatores de transcrição que se ligam a um conjunto de genes necessários à divisão celular (Fig. 4). Aproximadamente 100 genes são regulados por insulina. A via ERK é essencial na manutenção dos tecidos epiteliais, no entanto sua superestimulação se relaciona à proliferação de células tumorais (TESSIER; MATSUMURA, 2001).

Outra via de sinalização celular importante no desenvolvimento é a PI3K/Akt/mTOR. A regulação por Akt nas células é induzida pela ativação de PI3K nas cascatas de sinalização mediadas por receptores de fatores de crescimento, como a insulina (FRANKE, 2008). Na membrana plasmática, PI3K fosforila uma variedade de substratos dentre os quais a proteína Akt está incluída. Akt, por sua vez, ativa mTOR que nucleia muitos complexos proteicos e regula positivamente o crescimento celular e proliferação por promover processos anabólicos, incluindo a biosíntese de proteínas, lipídios e organelas, e por limitar o catabolismo pela autofagia. (HEMMINGS & RESTUCCIA, 2012; LAPLANTE & SABATINE, 2009).

Além de estar envolvida nos processos de proliferação, transporte de glicose mediado por insulina e crescimento, esta via integra sinais extracelulares vindos de receptores de fator de crescimento a sinais intracelulares, respondendo a intermediários da via MAPK/ERK, como a proteína Ras (Fig. 5). Segundo já descrito anteriormente, a sinalização por MAPK/ERK é fundamental à proliferação e diferenciação. Ao integrar esta via e atuar diretamente em processos similares, a sinalização por PI3K/Akt/mTOR fornece alvos celulares importantes em investigações sobre padrão de desenvolvimento tecidual (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006; LAPLANTE & SABATINE, 2009).

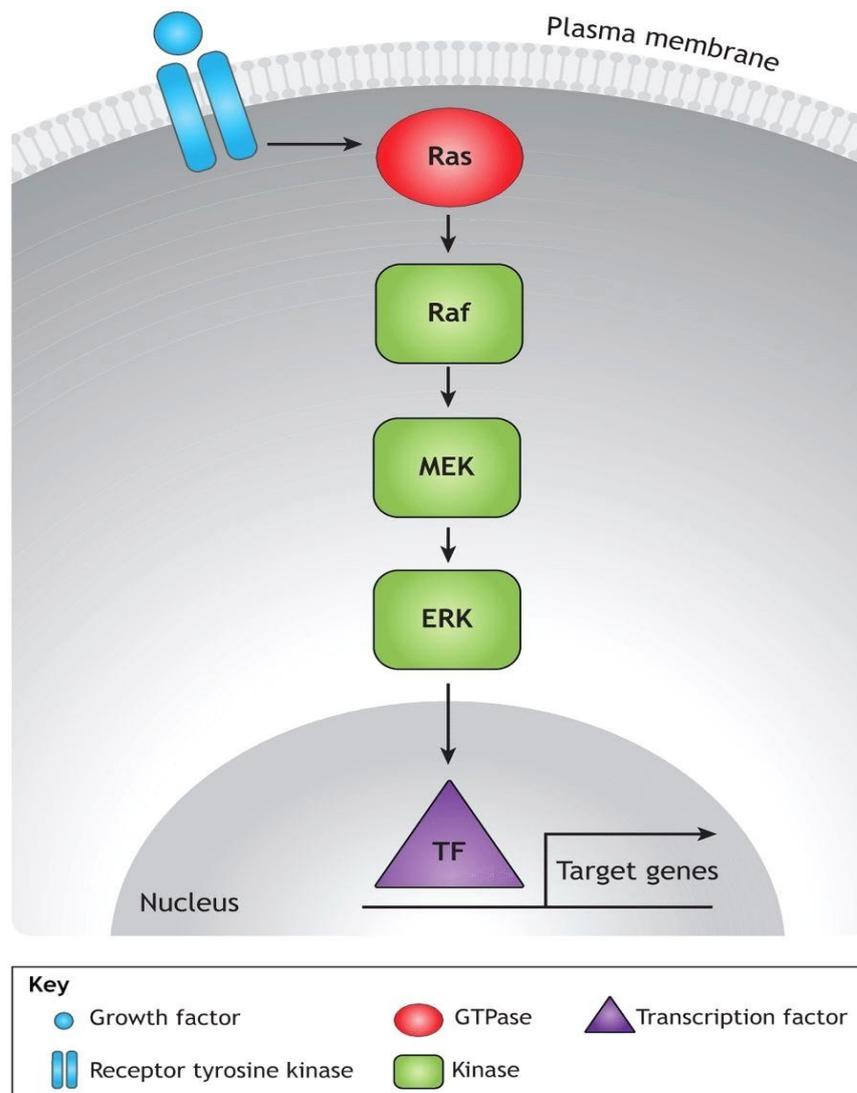


Figura 4 - Esquema simplificado da via ERK. Fatores de crescimento, como a insulina, ativam a via ERK por se ligarem a receptores transmembrana tirosina quinase (RTKs). Os receptores sinalizam à proteína Ras, que então ativa a cascata central de fosforilação da cinase Raf para MEK (ou MAP2K) e, finalmente, à ERK. ERK pode se translocar ao núcleo, onde interage com fatores de transcrição para regular a expressão de genes-alvo (De PATEL & SHVARTSMAN, 2018).

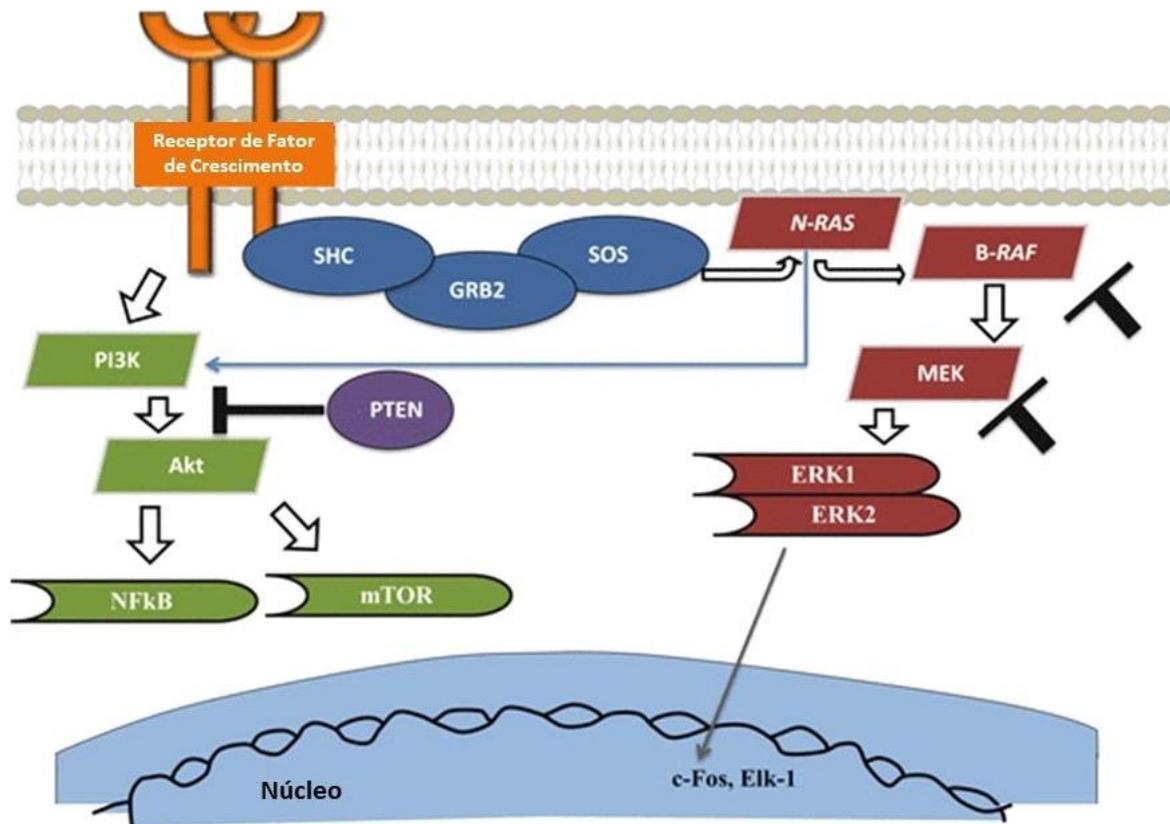


Figura 5- Vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/Akt/mTOR (Adaptado de Torres-Cabala, C.; Curry J. Genetics of Melanoma. Edição 1, New York, NY: Springer-Verlag New York, 2016).

Dada a importância dessas vias na manutenção do estado diferenciado e da proliferação de tecidos como o epitélio, é possível que as mesmas sejam desencadeadas de forma independente de insulina, como por exemplo por integrinas, fosfatase homóloga à tensina (PTEN) e receptor androgênico (AR), de acordo com Colello e colaboradores (2010, 2012). Portanto, alterações androgênicas podem interferir nas vias de sinalização Akt e ERK na próstata, haja vista a dependência androgênica da glândula. Ambas as vias estão estritamente relacionadas ao desenvolvimento próstatico. Por regular a mitogênese, transporte de glicose, proliferação e sobrevivência, influenciam diretamente o surgimento de brotos prostáticos e divisões celulares, o que se reflete na quantificação de células e no volume da glândula. Ademais, estudos apontam que altas concentrações de glicose podem modular a sinalização por insulina em alguns tipos celulares e, assim, afetar o curso basal das vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK/ERK (SCHIEKOFER et al., 2003; VARMA, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de glicose no desenvolvimento pós-natal da próstata ventral de ratos recém-nascidos (dia 0), com vistas para a organização epitelial e estromal da glândula, visando a simular o desenvolvimento glandular dos indivíduos hiperglicêmicos nascidos de mães diabéticas.

3.2- Objetivos Específicos

- Analisar o impacto da hiperglicemia no desenvolvimento pós-natal do epitélio da próstata pela quantificação de brotos prostáticos;
- Determinar os níveis de proliferação epitelial e estromal;
- Caracterizar o compartimento estromal através da quantificação de células musculares lisas, da deposição de colágeno e da expressão de MMP-2 e TGF- β ;
- Investigar se elevadas concentrações de glicose modulam a expressão de ERK1/2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais e protocolo de cultura de órgão inteiro (próstata)

Foram utilizados 90 ratos Wistar machos recém-nascidos (dia 0) provenientes do cruzamento de matrizes da REBIR- UFU. Os filhotes foram decapitados no dia do nascimento e suas próstatas ventrais dissecadas com auxílio de microscópio estereoscópio. Toda a próstata ventral e sua inserção na uretra foi cultivada por 3 dias em membranas PTFE (Millipore) flutuando sob 500 µl de meio basal constituído de DMEM/ Ham's F-12 (1:1; vol:vol) suplementado com insulina-transferrina-selênio (Gibco) e 10 nM de cipionato de testosterona (Novaquímica), de acordo com o método descrito por Lopes et al., 1996. As culturas foram divididas em 3 grupos: *Controle* - próstatas tratadas com meio basal acima descrito, contendo glicose a 100 mg/dL (5.5 mM); *Glicose moderada* - culturas tratadas com 225 mg/dL de glicose (7 mM) e *Alta glicose*- tratadas com 450 mg/dl de glicose (25 mM). Os meios foram renovados a cada 24 horas e as próstatas incubadas durante 1, 2 e 3 dias nos meios descritos. Para cada ensaio, as próstatas foram fotografadas em microscópio invertido acoplado a um sistema de captura de imagens em 1, 2 e 3 dias de cultura. A área de toda a próstata foi demarcada usando o software Image Pro Plus para a determinação da área da glândula. Os animais foram tratados de acordo com as normas previstas no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFU) sob o parecer 110/16.

4.2- Processamento das próstatas para análise histológica

Após o período de cultura, as próstatas foram fixadas em Bouin por 3 horas em geladeira, lavadas em água, desidratadas por imersão em álcool e clarificadas em xilol para processamento de rotina histológica em parafina. Cortes histológicos seriados de 4 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo (Leica) e separados para coloração por Hematoxilina de Harris e eosina (H&E), para avaliação geral do tecido glandular, ou pela técnica picrossírius, para caracterização da deposição de colágeno no compartimento estromal. Os cortes foram analisados e fotografados em fotomicroscópio (Leica, DM500) acoplado em sistema de aquisição de imagens pelas objetivas de 10X e 40X.

A contagem do número de brotos prostáticos foi feita a partir de imagens digitalizadas (objetiva de 10X) dos cortes histológicos corados em H&E. A contagem de figuras mitóticas foi feita por meio de imagens digitalizadas a partir de objetiva de 40X de cortes histológicos.

A distribuição de colágeno foi determinada por meio de análise estereológica. Tal análise foi efetuada em cortes histológicos submetidos à coloração de Picosirius. Foram utilizados campos microscópicos em objetiva 40X e a porcentagem de fibras colágenas em cada campo foi determinada após a aplicação do retículo demarcado e contagem dos pontos que tocassem a área marcada pelo Picosirius, de acordo com o sistema estereológico de Weibel (Weibel, 1974). Todas as contagens histológicas foram realizadas nas próstatas de 15 animais por grupo (5 animais para cada período experimental).

4.3- Análise imunohistoquímica da proliferação celular e células musculares lisas

Os cortes em parafina foram submetidos a reações imunohistoquímicas para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e alfa-actina de músculo liso. Para isso, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 4,0 e aquecidos a 92°C por 40 minutos em panela de vapor para a recuperação antigênica. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi feito por tratamento dos cortes com H₂O₂ 3% em metanol por 15 minutos, seguido do bloqueio das interações inespecíficas de proteínas com Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, USA) por 15 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* com os anticorpos primários para alfa-actina de músculo liso (Mouse anti-human, sc- 32251, Santa Cruz Biotechnology) ou PCNA (Mouse anti-human, sc- 56, Santa Cruz Biotechnology), diluídos em albumina 1% a 4°C, lavados em PBST e incubados com anticorpo secundário Universal Link seguido de Stroptoavidina-HRP (Kit Star Trek Universal HRP Detection System- Biocare) por 45 min cada. A revelação foi feita com diaminobenzidina – DAB (EasyPath). Os cortes foram contra- corados com hematoxilina. A frequência relativa de células musculares lisas foi determinada através do sistema de contagem de pontos acima descrito. As células PCNA-positivas foram contadas visualmente nos campos microscópicos digitalizados. Foi utilizado de 5 a 10 campos microscópicos de cada corte histológico, em aumento de 40X, da próstata de 9 animais por grupo (3 animais por tempo experimental).

4.4- Western blotting

Os conteúdos de ERK1/2 (totais e fosforiladas) e de MMP-2, foram avaliados por western blotting nas próstatas cultivadas por 3 dias nos meios de tratamento. Para isso, um pool com próstatas de 3 animais formou cada amostral, sendo que cada grupo experimental foi formado por 3 amostras (n=3). As amostras foram homogeneizadas em tampão Cell Lysis contendo inibidores de proteases (Protease Inhibitor Cocktail- Sigma Aldrich), centrifugadas a 14000 rpm e o sobrenadante foi coletado para quantificação do conteúdo de proteínas pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, alíquotas de 10 µg de proteína separadas em SDS-PAGE 10% e após a eletroforese, transferidas para membrana de nitrocelulose. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em albumina 5% em tampão Tris com Tween 20 a 0,2% (TBST) por 60 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas *overnight* com os anticorpos primários diluídos 1:1200 em albumina 3% em TBST: pERK (rabbit anti- human, #4370), ERK (rabbit anti-human, #9102), MMP2 (rabbit anti-human, #87809) e alfa tubulina (mouse anti-human, #3873) - Cell Signaling Technology.

Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase, diluído 1:35000 em TBST por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit de detecção quimioluminescente ECL (Pierce Company) e a reação luminosa das bandas foi avaliada em sistema de Análise de gel e membrana (Amersham Imager 600). A quantidade de cada proteína estudada foi determinada através da densitometria das bandas pelo *software* Image J (versão 1.34; Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Os níveis de proteínas fosforiladas foram normalizados com base na expressão da proteína na sua forma total (fosforilada e não fosforilada). No caso da MMP-2, a normalização das bandas foi realizada com alfa-tubulina.

4.5- Avaliação da morte celular por apoptose

A morte celular por apoptose foi estudada com o uso do kit EnzCheck Caspase-3 Assay (Thermo Fischer) que quantifica os níveis de caspase 3 em sua forma ativa. O conteúdo foi expresso em intensidade de fluorescência normalizada pela concentração de proteínas de cada amostra. Para cada grupo experimental foram utilizadas 3 amostras

(n=3), cada uma contendo um *pool* de 3 próstatas, que foram homogeneizadas em tampão Cell Lysis de acordo com a metodologia de extração de proteínas mencionada para o western blotting. Para cada amostra 2,5 µL de sobrenadante foram diluídos em 47,5µL de tampão reagente e incubados por 30 minutos e a medida da fluorescência (excitação/emissão 342/441 nm) foi feita em fluorímetro de microplacas.

4.6- Quantificação de TGF-β por ELISA

A forma ativa do TGF-β contida nos extratos de próstatas foi mensurada em 50 µL de sobrenadante por meio do kit Human/Mouse TGF-β1 Uncoated ELISA 88-8350 (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante. As diluições do sobrenadante foram dicionadas à placa de ELISA previamente recoberta com anticorpo monoclonal murino anti- TGF-β1. Então, foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado e, em seguida, o complexo avidina-HRP. Por fim, a placa foi lavada e adicionou-se a solução de revelação – o substrato TMB. A coloração desenvolvida foi interrompida com ácido sulfúrico 1M após 15 min de incubação e a intensidade de cor medida a um comprimento de onda de 450 nm na leitora de microplacas.

4.7- Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no software InStat (GraphPad Software®), no qual foi performado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para amostras que seguiam distribuição normal foi realizado o teste t-Student paramétrico e para as que não seguiam, realizou-se o teste t-Student não paramétrico na avaliação da significância estatística das diferenças entre médias ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1- Os tratamentos com glicose em concentrações moderada e alta não alteram a área tecidual da próstata



Figura 6-Vista macroscópica das próstatas após cultura nos meios Controle, Glicose moderada e Alta glicose por 1, 2 e 3 dias após o nascimento (barra de escala: 5mm)

Ao longo dos 3 dias de desenvolvimento analisados não houve aumento significativo da área prostática no grupo controle e o mesmo ocorre quando se compara este mesmo grupo com os

demais tratamentos (Fig. 6 e Tabela 1)., indicando que esses microambientes não influenciam o aspecto macroscópico da próstata nos tempos analisados.

Tabela 1 - Média das áreas prostáticas em mm² após cultura de órgão inteiro nos meios Controle, Glicose moderada e Alta glicose

Grupos	1 dia	2 dias	3 dias
Controle	4,73 ± 0,77	4,36 ± 0,60	4,01 ± 0,32
Glicose moderada	4,63 ± 0,28	4,31 ± 0,60	4,13 ± 0,57
Alta glicose	3,40 ± 0,32	4,84 ± 0,86	4,12 ± 0,48

5.2- Concentrações aumentadas de glicose induzem redução do número de brotos prostáticos

No primeiro dia de desenvolvimento pós-natal, o grupo controle apresentou cerca de cinco brotos acinares, quantidade essa que aumentou progressivamente ao longo dos 3 dias de desenvolvimento sendo que, ao terceiro dia, a quantidade de brotos já havia aumentado mais de quatro vezes em relação ao dia 1. Nos grupos tratados percebe-se uma tendência oposta. Há significativa redução da quantidade de brotos independentemente de quão aumentada a concentração de glicose se apresenta (Fig. 7 e 8). O prejuízo à expansão do brotamento ocorre desde o cultivo sob concentração moderada de glicose.

5.3- Altos níveis de glicose induzem redução do número de figuras mitóticas nos brotos prostáticos

No primeiro e terceiro dias de desenvolvimento, o grupo controle apresentou grande quantidade de células em divisão nos brotos acinares, como revelado pela contagem de figuras mitóticas. Não é observado o mesmo padrão nos grupos tratados. Apesar de ocorrerem figuras de mitose em boa quantidade no dia 1 de tratamento com glicose em concentração moderada esse perfil não se manteve e tendeu à ausência de mitoses no terceiro dia. O grupo incubado em alta concentração de glicose apresentou padrão de poucas figuras de mitose durante todos os três dias de desenvolvimento (Fig. 9).

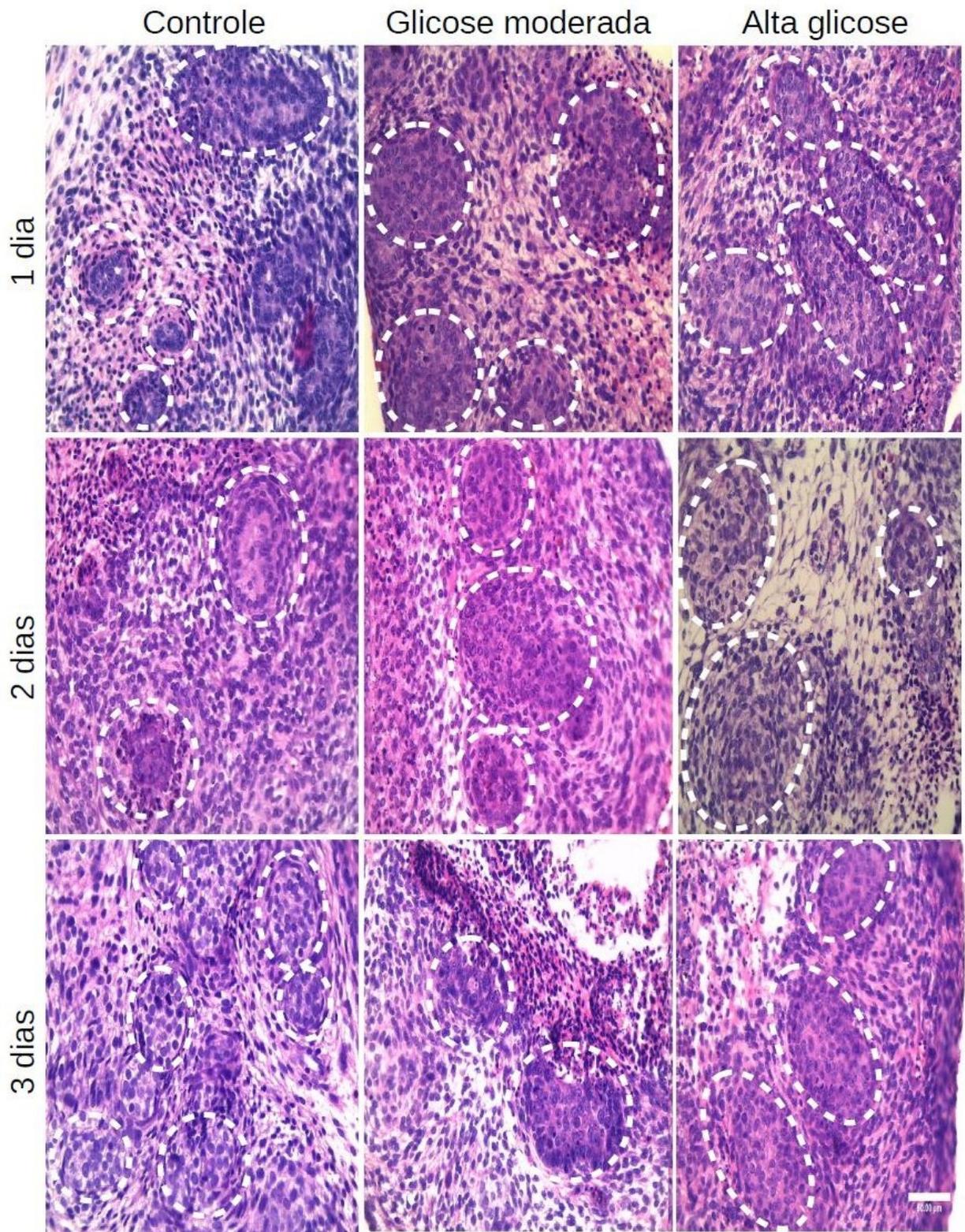


Figura 7 - Histoarquitetura de próstatas cultivadas durante 1, 2 e 3 dias em meios com diferentes concentrações de glicose e os efeitos destes sobre o brotamento acinar. Brotos acinares demarcados pelo tracejado (coloração: H&E; barra de escala: 50 um)

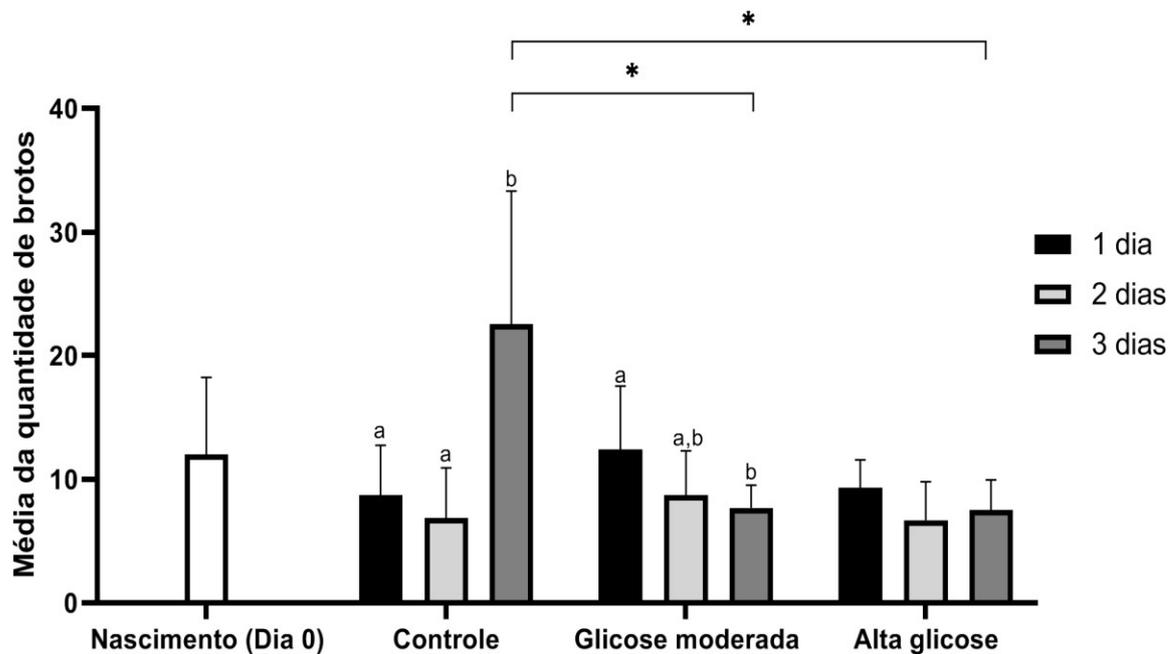


Figura 8 - Representação gráfica da média de brotos acinares no dias 1, 2 e 3 após o nascimento sob cultivo nos meios controle, glicose moderada e alta glicose. a,b: diferença estatística entre diferentes tempos de exposição ao tratamento em um mesmo grupo; *: diferença estatística entre grupos tratados ($p < 0.05$).

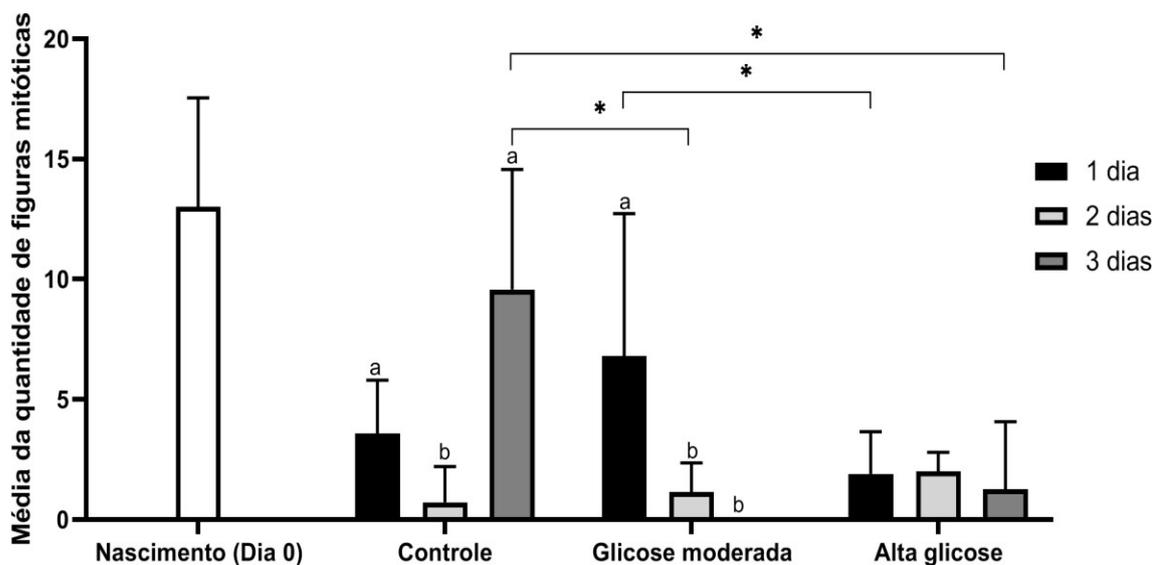


Figura 9 - Representação gráfica da média de figuras mitóticas nos brotos acinares das próstatas de ratos 1, 2 e 3 dias após o nascimento, sob cultivo nos meios controle, glicose moderada e alta glicose. a,b: diferença estatística entre diferentes tempos de exposição ao tratamento em um mesmo grupo; *: diferença estatística entre grupos tratados ($p < 0.05$).

5.4- Concentrações aumentadas de glicose diminuem a proliferação celular e aumentam a morte celular por apoptose

Os grupos controle, glicose moderada e alta glicose foram submetidos à marcação imunohistoquímica para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), a qual demonstrou que no ambiente de concentração basal de glicose a próstata tende a aumentar a proliferação epitelial e estromal progressivamente até o terceiro dia do desenvolvimento. Contudo, essa tendência é modificada nos tratamentos com concentração aumentada de glicose. Nos grupos tratados se observa menor frequência relativa de células epiteliais em proliferação, especialmente no terceiro dia, e também estromais, neste caso desde o primeiro dia de desenvolvimento pós-natal (Fig. 10, 11 e 12). A quantificação da ativação das caspases 3/7 realizada nas próstatas dos grupos de 3 dias indica que, além de induzir alterações significativas no padrão de proliferação celular, o tratamento com glicose em concentração moderada leva ao aumento da morte celular por apoptose (Fig. 13).

5.5- Os tratamentos com glicose em concentrações moderada e alta reduzem a expressão de alfa-actina de músculo liso

A quantificação de alfa-actina de músculo liso demonstrou que, no curso natural de desenvolvimento, do dia do nascimento (dia 0) para o primeiro dia de desenvolvimento pós-natal há um aumento da quantidade de células musculares lisas na próstata que se mantém até o terceiro dia. Essa tendência é alterada nos grupos tratados. Já no primeiro dia de desenvolvimento, a redução da expressão de alfa-actina é observada em ambos os tratamentos. Embora tenha ocorrido um aumento de alfa-actina do primeiro ao terceiro dia nos grupos tratados com glicose, em comparação ao controle a quantidade de células musculares lisas esperada para o período foi muito reduzida (Fig. 14 e 15).

5.6- Concentrações aumentadas de glicose induzem redução da quantidade de colágeno

No grupo controle se observou que há um aumento inicial do conteúdo de colágeno no estroma o qual se mantém até o terceiro dia de desenvolvimento. Contudo, os grupos tratados apresentaram modificação desse padrão. Em concentração moderada de glicose há redução significativa da quantidade de colágeno em todos os dias de desenvolvimento pós-natal, enquanto sob concentração alta de glicose há diminuição significativa no terceiro dia (Fig. 16 e 17).

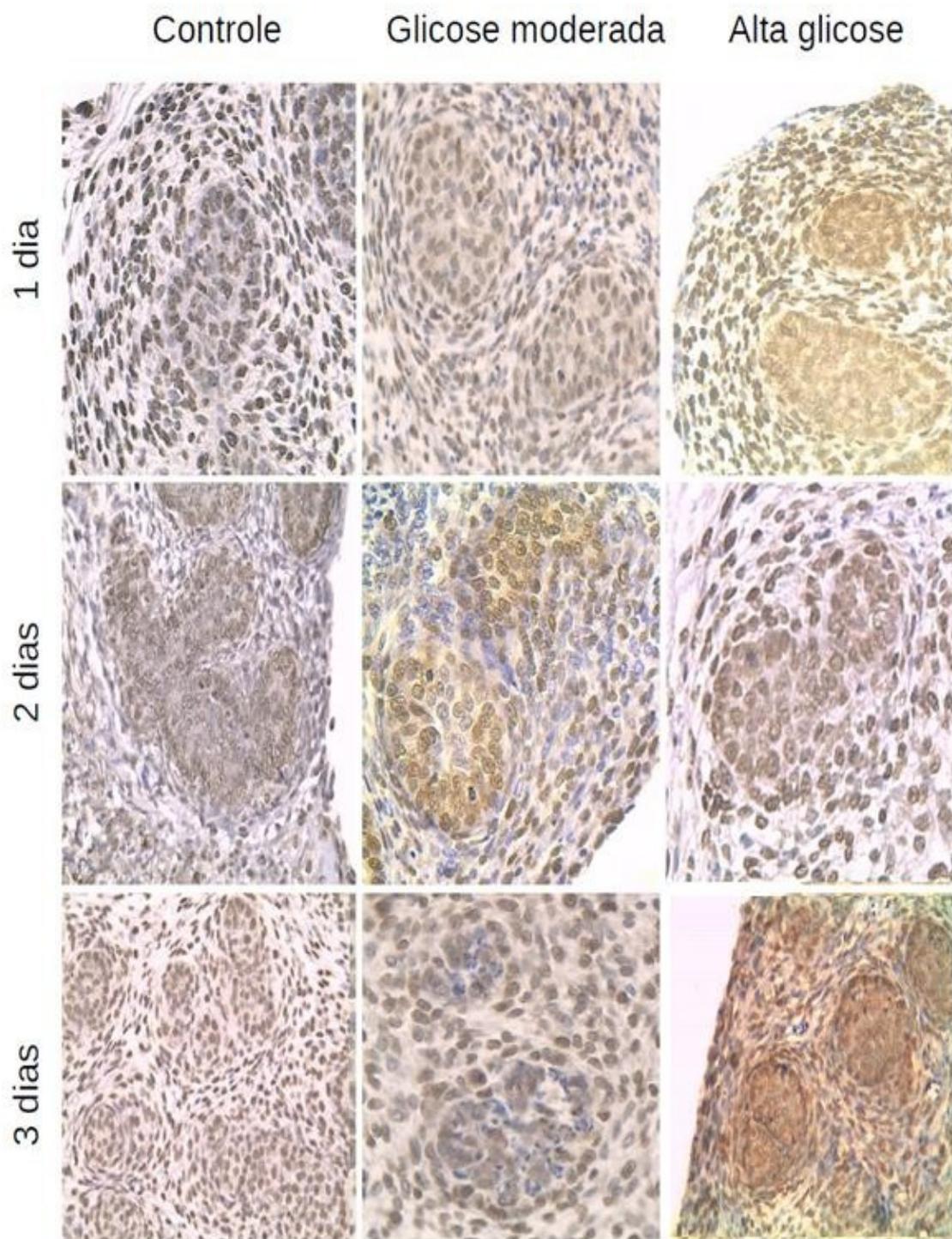


Figura 10 - Imunohistoquímica para PCNA em próstatas cultivadas por 1, 2 e 3 dias após o nascimento nos meios controle, glicose moderada e alta glicose, indicando o padrão de proliferação celular epitelial e estromal (células PCNA+ coradas por DAB, contracoloração em hematoxilina; barra de escala: 50 um).

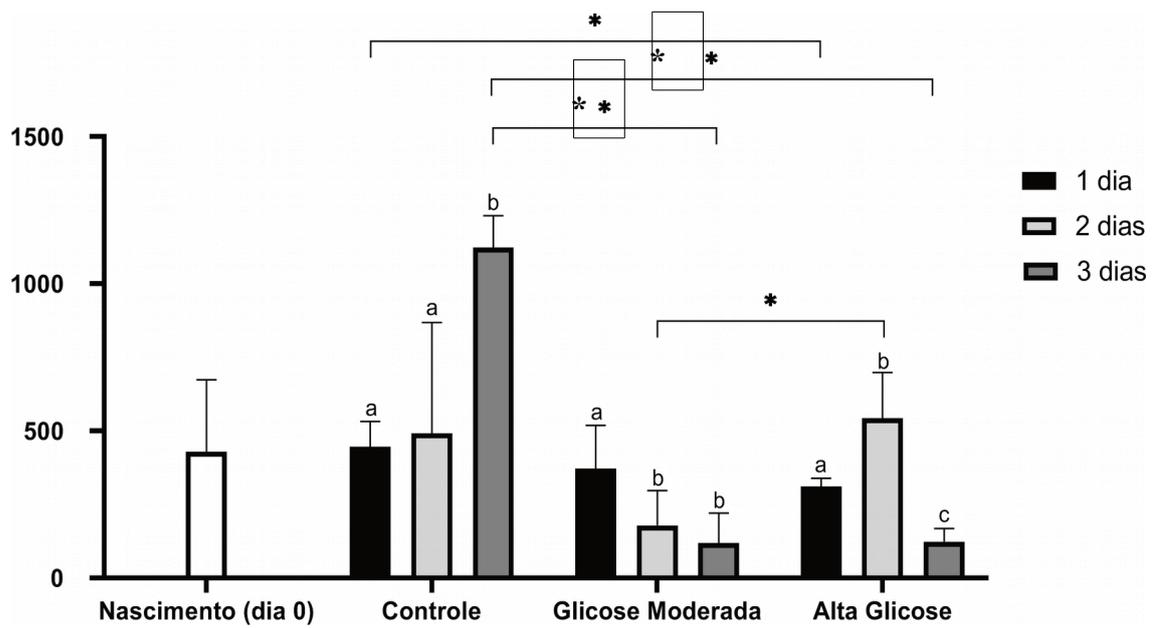


Figura 11 - Representação gráfica da frequência média de células epiteliais em proliferação nas próstatas de ratos 1, 2 e 3 dias após o nascimento, sob cultivo nos meios controle, glicose moderada e alta glicose. a,b,c: diferença estatística entre diferentes tempos de exposição ao tratamento em um mesmo grupo; *: diferença estatística entre grupos tratados ($p < 0.05$).

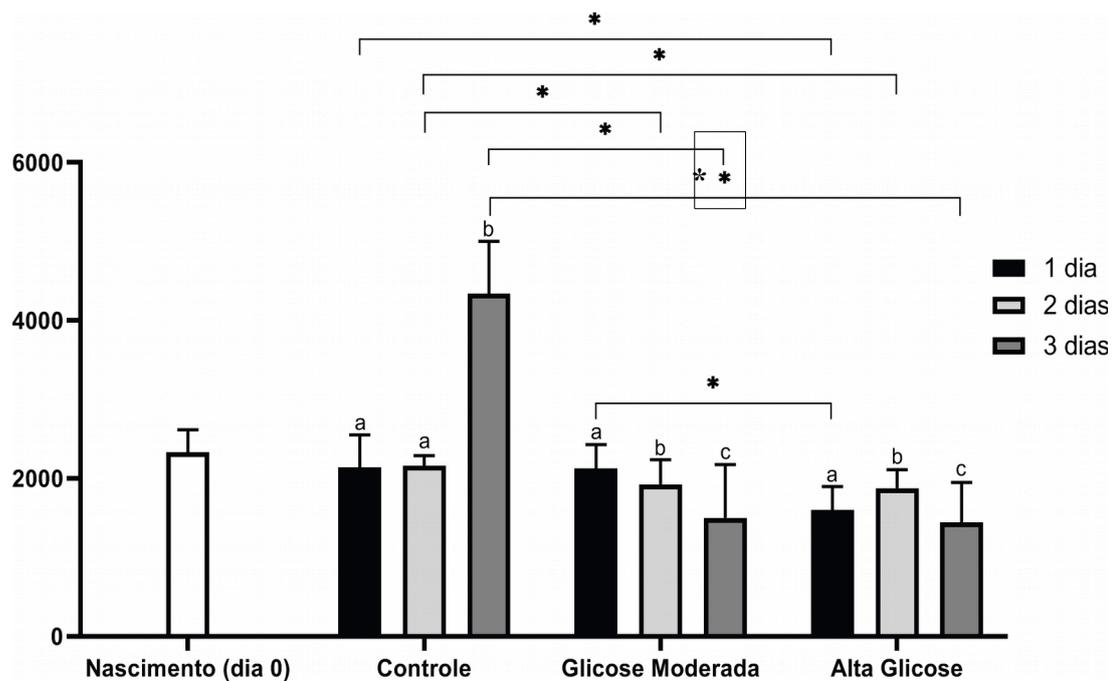


Figura 12 - Representação gráfica da frequência média de células estromais em proliferação nas próstatas de ratos 1, 2 e 3 dias após o nascimento, sob cultivo nos meios controle, glicose moderada e alta glicose. a,b,c: diferença estatística entre diferentes tempos de exposição ao tratamento em um mesmo grupo; *: diferença estatística entre grupos tratados ($p < 0.05$).

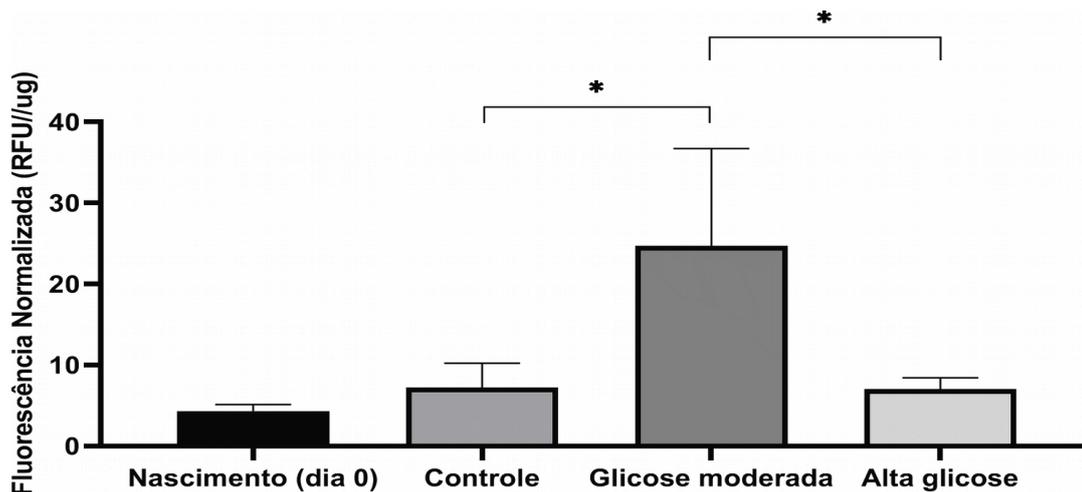


Figura 13 - Representação gráfica da atividade das caspases 3/7, dada por intensidade de fluorescência, em próstatas de ratos recém-nascidos (dia 0) e cultivadas por 3 dias em DMEM sob concentrações normal, moderada e alta de glicose. *: diferença estatística entre grupos tratados ($p < 0,05$).

5.7- O ambiente rico em glicose desencadeia diminuição da expressão de MMP-2 na próstata

A densitometria de bandas apontou que, no grupo controle, a quantidade de MMP-2 é baixa ao nascer, mas no terceiro dia de desenvolvimento pós-natal há elevada expressão da proteína. Os tratamentos com glicose em concentração aumentada, por sua vez, desestimularam a expressão de MMP-2, sendo que essa diminuição foi mais acentuada no grupo tratado com glicose em concentração moderadamente aumentada (Fig.18 A).

5.8-A ativação da proteína ERK1/2 na próstata diminui com o aumento da concentração de glicose

No dia do nascimento (dia 0) a quantidade de ERK1/2 ativa é baixa, mas no grupo controle isso se modifica no terceiro dia após o nascimento, conforme revelado pelos dados da densitometria de bandas. Os tratamentos com glicose em concentração moderada e alta fazem com que haja redução da ativação de ERK em comparação com o controle. Tal redução foi mais acentuada no grupo Alta glicose (Fig. 18 B).

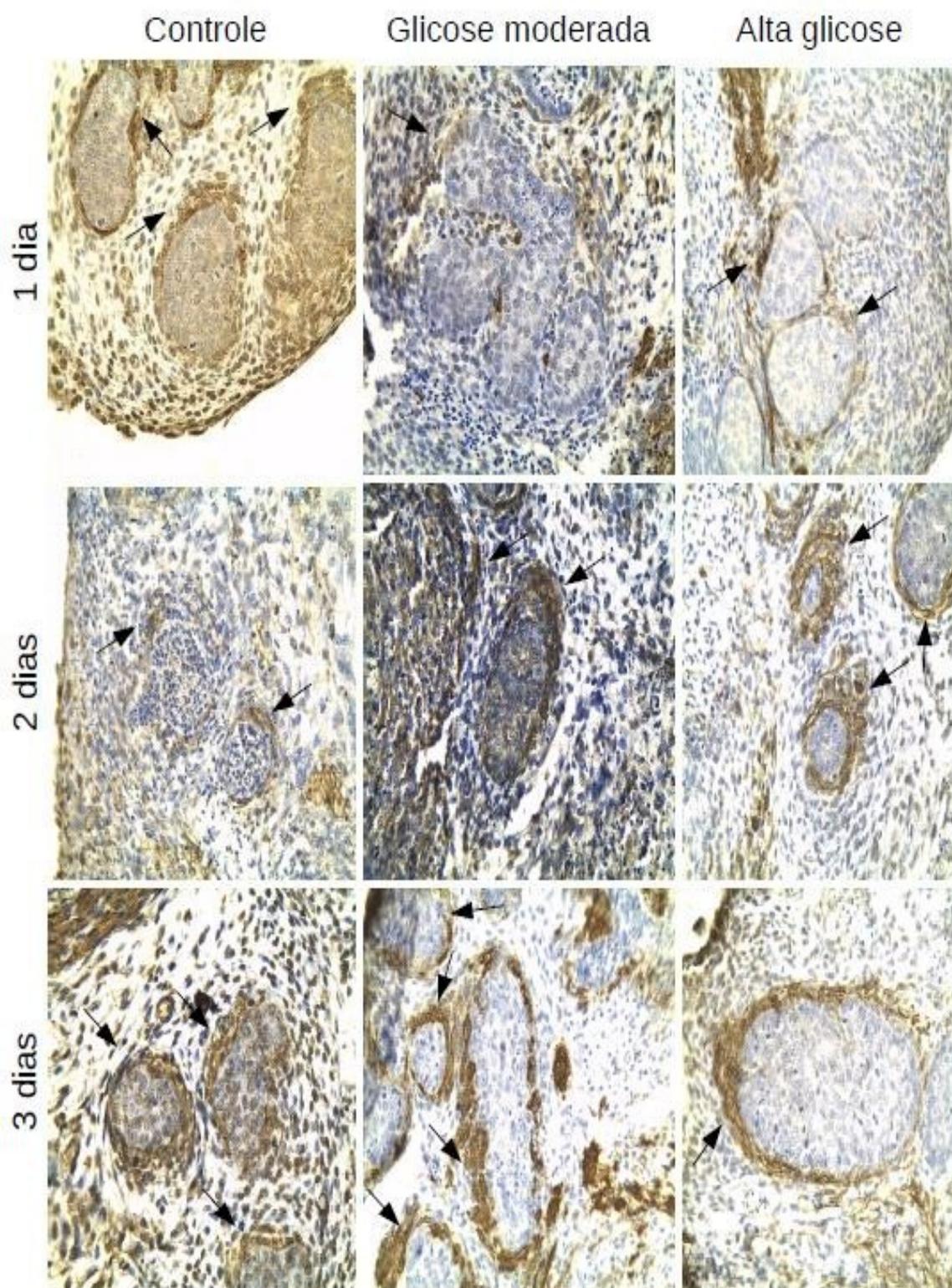


Figura 14 -. Brotos prostáticos circundados por α -actina (setas pretas). Imunohistoquímica para α - actina em próstatas de ratos cultivadas nos meios controle, glicose moderada e alta glicose por 1, 2 e 3 dias após o nascimento.

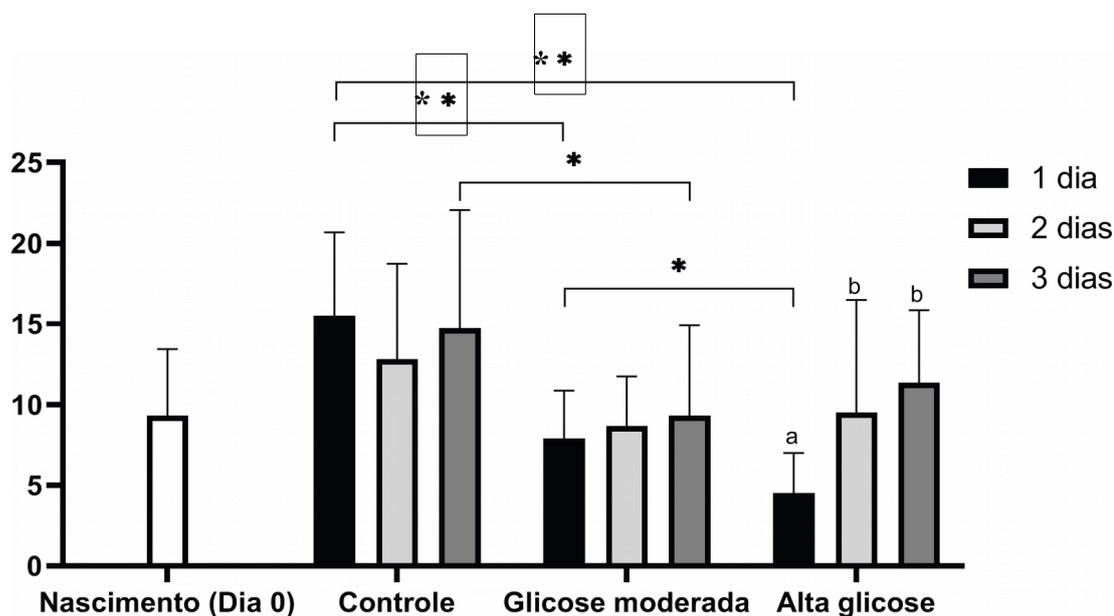


Figura 15 - Representação gráfica da quantidade de alfa-actina nas próstatas de ratos 1, 2 e 3 dias após o nascimento, sob cultivo nos meios controle, glicose moderada e alta glicose. a,b,c: diferença estatística entre diferentes tempos de exposição ao tratamento em um mesmo grupo; *: diferença estatística entre grupos tratados ($p < 0.05$).

5.9- Concentrações elevadas de glicose causam aumento da expressão de TGF- β

Em função do cultivo em meios hiperglicosados, houve aumento da concentração de TGF- β prostático nos grupos tratados em relação ao controle no terceiro dia de desenvolvimento pós-natal. A concentração basal de TGF- β encontrada no controle, que corresponde em média a aproximadamente 90 pg/ml, tem acréscimo significativo no grupo de glicose moderadamente aumentada. No grupo tratado com alta concentração de glicose o aumento de TGF- β foi ainda mais acentuado, cerca de 3 vezes maior que o controle (Fig.19).

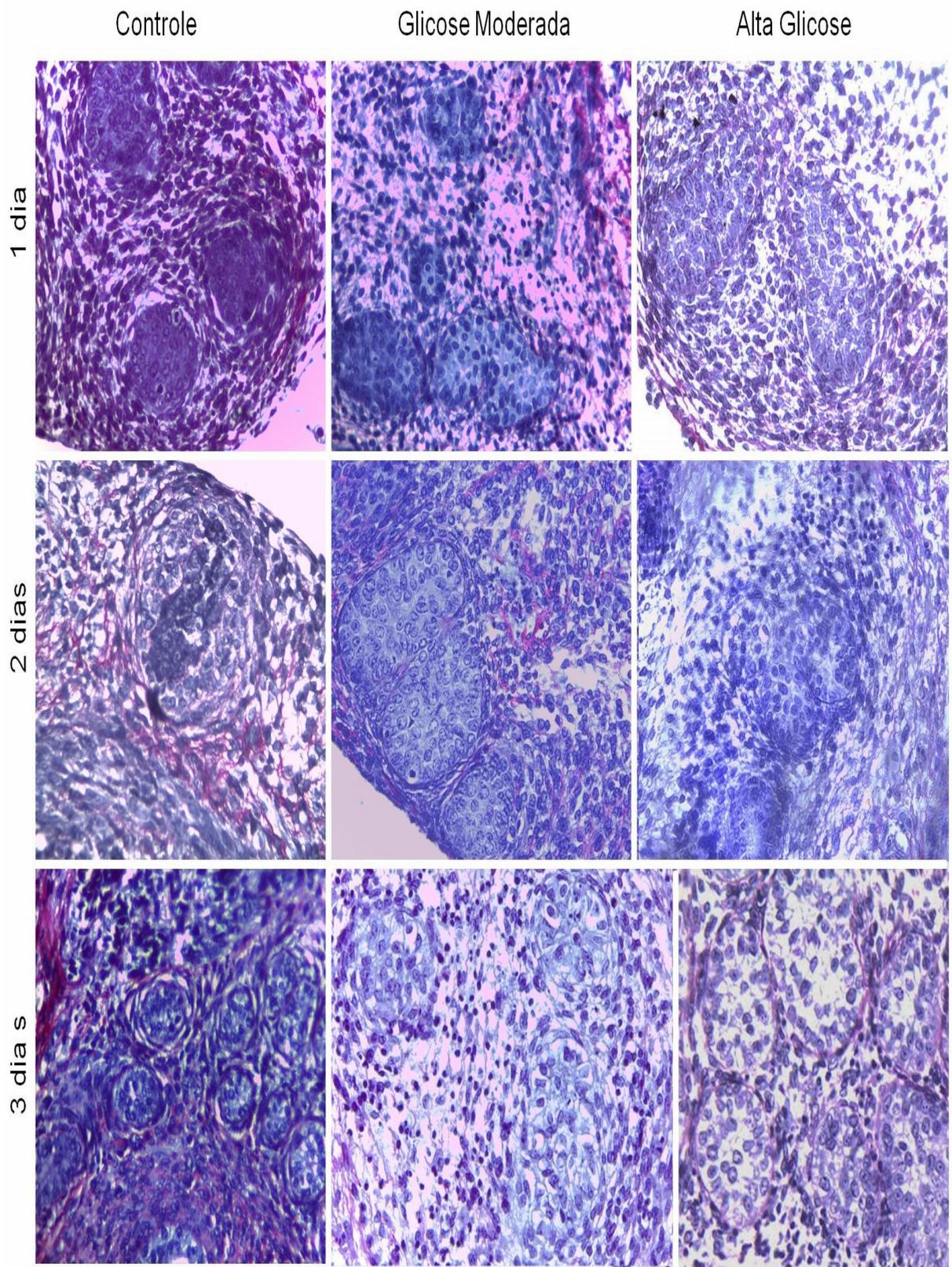


Figura 16 - Coloração por picrosírius-hematoxilina, indicando a quantidade de colágeno depositada no estroma prostático nos grupos controle, glicose moderada e alta glicose nos três primeiros dias de desenvolvimento pós-natal.

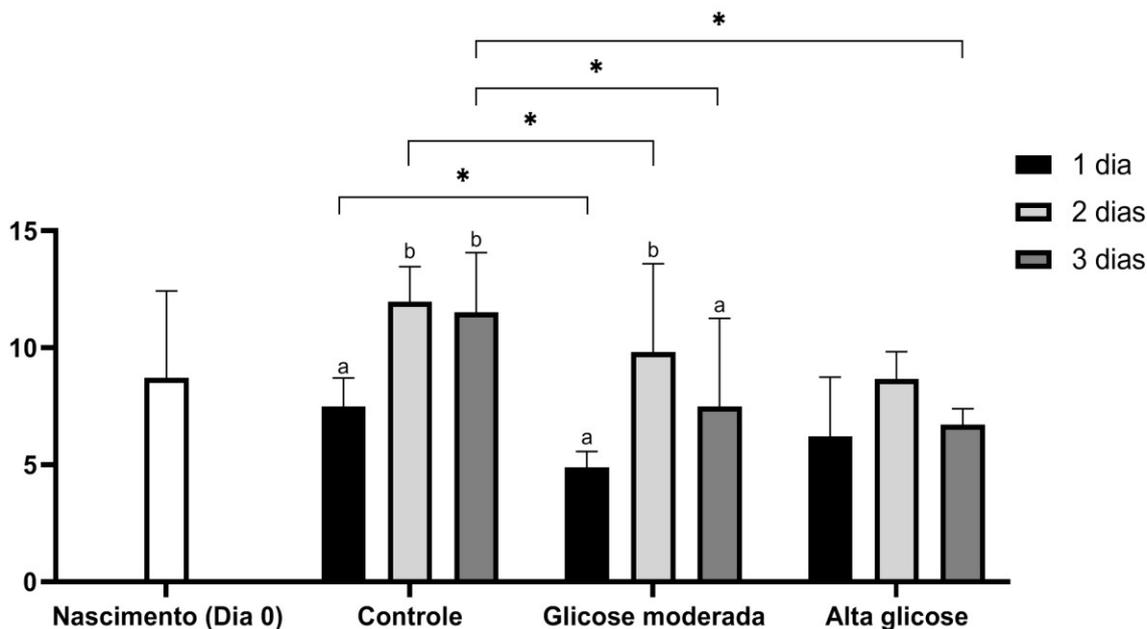


Figura 17 - Representação gráfica da quantidade de colágeno nas próstatas de ratos 1, 2 e 3 dias após o nascimento, sob cultivo nos meios controle, glicose moderada e alta glicose. a,b: diferença estatística entre diferentes tempos de exposição ao tratamento em um mesmo grupo; *: diferença estatística entre grupos tratados ($p < 0.05$)

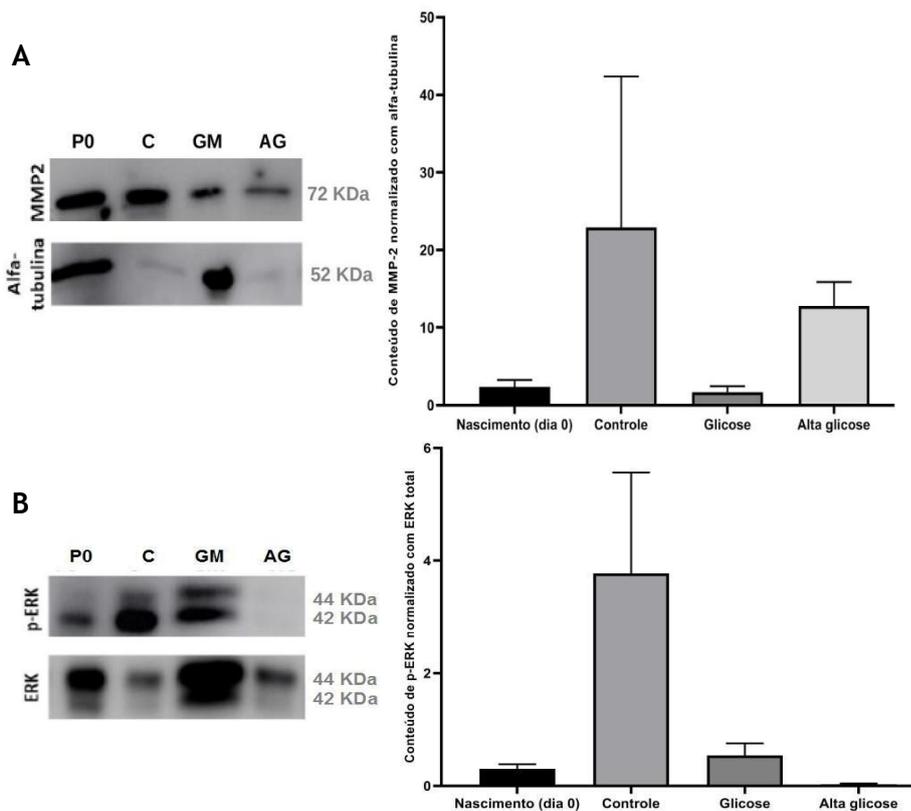


Figura 18 - (A) Representação gráfica do conteúdo de MMP-2 normalizado em relação à alfa-tubulina total dos grupos controle, glicose moderada e alta glicose de próstatas de ratos nos dias 0 (nascimento) e 3 de desenvolvimento pós-natal (B) Representação gráfica do conteúdo de p-ERK1/2 normalizado em relação à ERK não fosforilada dos grupos controle, glicose moderada e alta glicose de próstatas de ratos nos dias 0 (nascimento) e 3 de desenvolvimento pós-natal.

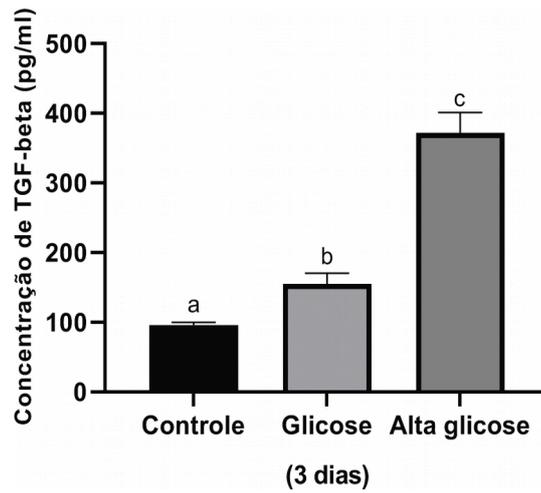


Figura 19 - Concentração de TGF- β determinada por ELISA em próstatas de ratos cultivadas em meio controle, glicose moderada e alta glicose, no terceiro dia de desenvolvimento pós-natal (Dado não representado: concentração de TGF- β no dia do nascimento (dia 0) apresentou valores abaixo do nível de detecção do teste).

6. DISCUSSÃO

A investigação conduzida neste estudo descreveu modificações morfológicas e bioquímicas induzidas por glicose em concentrações aumentadas na próstata de ratos recém-nascidos. Esses achados lançam luz sobre um tema pouco explorado e revelam aspectos importantes, até então desconhecidos, do desenvolvimento prostático pós-natal e como este é afetado pela glicose.

O aumento progressivo da quantidade de brotos, de figuras de mitose e de células em proliferação, observado no grupo controle ao nascer e até o terceiro dia de desenvolvimento pós-natal, está de acordo com o padrão de desenvolvimento esperado, anteriormente descrito por Cunha e colaboradores (1987). Seus estudos definem que após o nascimento há franca proliferação epitelial, ramificação e canalização dos ductos prostáticos. Isso ocorre concomitantemente à diferenciação do epitélio (SUGIMURA et al., 1986). Nota-se que a simulação de microambientes hiperglicêmicos, executada no presente trabalho, induziu prejuízos ao desenvolvimento uma vez que a redução da quantidade de brotos acinares e da proliferação, vista nos grupos tratados, é reflexo direto de alterações nos processos pós-natais citados. Dados sobre os efeitos da glicose na proliferação celular no início do desenvolvimento pós-natal da próstata são inexistentes. Entretanto, há estudos que relatam efeito do diabetes na proliferação celular da próstata de adultos. Porto e colaboradores (2011) observaram que próstatas de ratos diabéticos tem, em todos os lobos, diminuição significativa de proliferação epitelial e estromal. Ainda, estudos relatam que camundongos e ratos com diabetes induzido por streptozotocina têm alterações histológicas expressivas no epitélio secretor da próstata, como vacuolização celular e redução da altura do epitélio (CAGNON et al., 2000; SOUDAMANI et al., 2005). Tais dados em somatória aos aqui encontrados demonstram que a exposição a altas concentrações de glicose por si própria pode causar prejuízo ao desenvolvimento prostático, uma vez que a proliferação celular é primordial para o brotamento acinar que culminará numa próstata adulta estruturalmente e funcionalmente normais.

Apesar do possível papel direto da hiperglicemia, é importante considerar que efeitos deletérios à proliferação podem ser dados indiretamente por desequilíbrio da ação androgênica. Estudos tais como os de Liu & Wang (2005), Gorbachinsky e colaboradores (2010) e Chen e colaboradores (2015) descreveram redução da expressão de receptor androgênico (AR) na próstata de ratos diabéticos em relação a grupos

controle não diabéticos. A atividade de andrógenos sobre a próstata controla o crescimento, ramificação, morfogênese, diferenciação e maturação dos brotos acinares (WILSON, 2011). Essa atividade ocorre via AR. As células epiteliais, que inicialmente se organizam em brotos, expressam AR e, conseqüentemente, tem atividade secretora e viabilidade dependentes de andrógenos, além de induzirem o estroma à diferenciação em células musculares lisas (DENMEADE; LIN; ISAACS, 1996; CUNHA et al., 1992). As células musculares lisas também expressam esse receptor. Estas, quando estimuladas por andrógenos, induzem a proliferação das células epiteliais por ação parácrina (SCHALKEN, 2005). Dessa forma, a redução da expressão de receptor androgênico, seja epitelial ou estromal, tem impacto negativo sobre a próstata e pode justificar o prejuízo à proliferação celular exibido pelos grupos tratados.

O desenvolvimento adequado da próstata depende do equilíbrio entre proliferação e morte celular. Se ambos os processos ocorrem em taxas equivalentes, como no tecido prostático normal e plenamente desenvolvido, não há crescimento da rede de ductos. Contudo, se a taxa de morte celular supera a de proliferação, tem-se redução progressiva do número de células da glândula. Isso foi observado no grupo incubado em meio de cultura de concentração moderadamente aumentada de glicose. Em comparação com o grupo controle, houve perda massiva de células por apoptose. O diabetes causa elevado estresse oxidativo às células (BROWNLEE, 2001), o que pode desencadear lesões ao DNA e estresse de retículo endoplasmático, resultando em apoptose (WANG; REECE; YANG, 2013; GRINDEL et al., 2016; COOKE et al., 2003).

Embora tenha ocorrido mais morte celular por apoptose no grupo glicose moderada, o grupo alta glicose também apresentou diminuição importante na quantidade de brotos acinares, figuras de mitose e proliferação, o que pode ser evidência de um outro tipo de morte celular em curso sob alta concentração de glicose. Um tipo que parece estar ligado a isso e ao diabetes é a necroptose, a qual possui características semelhantes à necrose mas ocorre de forma altamente regulada em ambientes desfavoráveis ao mecanismo de apoptose (D'ARCY, 2019). O processo de necroptose se dá pela interação citosólica das proteínas RIP1 e RIP3 com receptores de morte, como o receptor de fator de necrose tumoral - 1 (TNFR1) e receptor Fas. A ativação de RIP1/3 leva à inativação da caspase 8 e recrutamento da proteína MLKL, que se oligomeriza e migra para a membrana celular, resultando em permeabilização dessa e, por fim, em morte celular (WANG, 2014). Visto que a maioria dos estímulos pró-necroptóticos são altamente pró-inflamatórios, como TNF- α (KEARNEY & MARTIN, 2017), e pelo fato

de RIP1/3 serem mediadores da síntese de quimiocinas inflamatórias (ZHOU & YUAN, 2014), fica claro que a necroptose é intrinsicamente associada à inflamação. Isso é relevante no presente trabalho pelo fato do diabetes, assim como a obesidade e outras síndromes metabólicas, estar ligado a um padrão de inflamação crônica de baixo grau caracterizado pela superexpressão prejudicial de várias citocinas (FISMAN; MOTRO; TENEMBAUM, 2003) podendo, então, induzir morte celular por necroptose. De fato, alguns estudos exibiram morte por necroptose em células cultivadas sob alta concentração de glicose. Liang e colaboradores (2017) demonstraram que glicose em alta concentração causa lesão, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de citocinas pró- inflamatórias (IL-1 e TNF-alfa) em cultura de células cardíacas H9c2. Além disso, a exposição à glicose elevou notoriamente a expressão de RIP3, uma das cinases já mencionadas que atuam na promoção de necroptose. Similarmente, Fang e colaboradores (2019) descreveram que a alta concentração de glicose reduz a viabilidade de cardiomiócitos de cultura primária e leva a aumento da expressão de citocinas pró- inflamatórias, RIP1/3 e MLKL; e a inibição da necroptose reduz o dano gerado pela glicose. Observou-se, ainda, em outro trabalho que altas concentrações de glicose induzem necroptose via RIP1/3 em podócitos da barreira de filtração renal. Os experimentos foram feitos *in vitro*, em cultura de podócitos de camundongo, e em biópsias renais de pacientes acometidos por nefropatia diabética (XU et al; 2019). Coletivamente, os resultados desses estudos mostram que morte celular por um mecanismo diferente de apoptose é possível sob altas concentrações de glicose e podem justificar a perda de células no grupo alta glicose.

A diminuição da proliferação celular e do número de figuras de mitose nos brotos prostáticos ainda pode ter correlação com a queda da expressão de ERK, responsável por regular a proliferação e sobrevivência celular. No grupo controle o conteúdo de ERK1/2 fosforilada (p-ERK) apresentou grande expressão no terceiro dia pós-natal, comparado às próstatas do dia do nascimento, o que justifica o pico de figuras de mitose e proliferação no mesmo período. Porém, a fosforilação de ERK1/2 teve redução importante no grupo tratado com glicose moderada e diminuiu ainda mais com a adição de glicose em alta concentração no meio de incubação da próstata. Há estudos performados com células em cultura que indicam que altas concentrações de glicose ativam a via de sinalização ERK (LIU; LIANG; ZHANG, 2016; ZHU et al., 2012). Por outro lado, há trabalhos que mostram que em circunstâncias similares a via pode ser inibida. Cao e colaboradores (2011), por exemplo, propõem a existência de um

mecanismo de retroalimentação positiva entre Raf-1 e ERK. Raf-1, sendo substrato de ERK, pode ser fosforilada por esta em sítios específicos, os quais são os resíduos de Ser289, Ser296 e Ser301. A intensa adição de fosfatos em tais sítios pode induzir a dessensibilização de Raf-1, o que inibe toda a cascata de sinalização MAPK/ERK. A redução do conteúdo de p-ERK encontrada no presente trabalho poderia se encaixar no mecanismo descrito. É possível que a alta concentração de glicose tenha, no terceiro dia de desenvolvimento, estimulado a via de sinalização de ERK ao ponto de dessensibilizá-la.

Independentemente do mecanismo, a redução da ativação dessa importante via de sinalização causada pelos meios hiperglicosados trará efeitos significativos ao desenvolvimento prostático. O prejuízo direto da hiperglicemia aos tecidos; a provável perda de receptores androgênicos; a ativação dos mecanismos de apoptose e, talvez, de necroptose; e a redução da ativação da via ERK acarretam sérios danos ao desenvolvimento prostático, haja vista o dano à proliferação e sobrevivência das células epiteliais e estromais que esses processos induzem. A redução da quantidade de brotos acinares implica em menor ramificação de ductos, o que resulta em uma glândula menos volumosa e de atividade secretora limitada. Isso certamente configura prejuízos à formação da próstata e pode ter reflexos em longo prazo na função sexual do indivíduo adulto.

Uma das alterações significativas observadas no compartimento estromal foi a redução da quantidade de α -actina nas próstatas tratadas com adição de glicose ao meio de cultura de concentração basal. Isso pode refletir uma diminuição do número de células musculares lisas no estroma glandular. O efeito deletério de concentrações elevadas de glicose sobre células musculares lisas foi observado por Peiró e colaboradores (2001). Eles relataram diminuição de 20% no número de células musculares lisas de aorta humana viáveis cultivadas sob alta concentração de glicose. Sugeriu-se que a redução pode ocorrer por morte celular induzida por estresse oxidativo ou pelo retardo do crescimento celular induzido pela glicose. É descrito na literatura um efeito indireto do diabetes sobre o fenótipo e proliferação de células estromais musculares e não musculares na próstata adulta (CARVALHO, 2003; RIBEIRO, 2006). Porém, muitas dessas alterações são semelhantes às observadas após a castração e, assim, podem ser interpretadas como resultado da diminuição do nível de testosterona durante o diabetes. Como os experimentos do presente trabalho foram conduzidos a partir de próstatas cultivadas sob a mesma concentração de testosterona, a diminuição do conteúdo de α -

actina observada, provavelmente como reflexo da morte celular, aparentemente é devida à ação direta da glicose.

Durante o desenvolvimento prostático, as células musculares lisas são fundamentais na indução de proliferação do epitélio secretor, pela fundamental interação epitélio-estroma, além de produzirem componentes regulatórios da matriz extracelular, o que favorece o crescimento de outros tipos celulares. Nem o epitélio nem o estroma são capazes de se desenvolver na ausência um do outro (ANTONIOLI; DELLA-COLLETA; CARVALHO, 2004; HAYWARD & CUNHA, 2000). As glândulas analisadas no atual trabalho estavam em desenvolvimento inicial e a metodologia em si não permite longos períodos experimentais. Entretanto, se essa condição for mantida num desenvolvimento *in vivo*, haverá impacto na interação-epitélio estroma de modo a prejudicar toda a formação da glândula. Ainda, a redução do número de células musculares lisas pode ter impactado, em sinergia com outros fatores já discutidos, a proliferação e secreção epitelial. Assim, se este padrão reduzido de proliferação de células estromais musculares for mantido até a vida adulta, a contração necessária à ejeção do fluido prostático, que é parte fundamental da composição do sêmen, durante a ejaculação será comprometida, prejudicando a função reprodutiva da glândula.

Ainda em relação ao estroma, observou-se redução importante da quantidade de colágeno, aumento da expressão de TGF- β e diminuição da expressão de MMP-2 nos grupos tratados. Esses dados se correlacionam intimamente e refletem mudança do estado homeostático da glândula submetida a concentrações elevadas de glicose.

Os fibroblastos são essenciais para o ambiente estromal por sintetizarem moléculas que não apenas fornecem um arcabouço estrutural à próstata, como o colágeno, mas também cuja sinalização é imprescindível à homeostase da glândula (AUMÜLLER & SEITZ, 1990; CUNHA; COOKE; KURITA, 2004). Assim, a redução da quantidade de colágeno no desenvolvimento pós-natal inicial implica em dano estrutural expressivo. Alguns estudos mostram resultados diferentes do obtido nesse trabalho, ao relatarem aumento, e não diminuição, da quantidade de colágeno e outros elementos de matriz em ratos diabéticos. Porém, esse aumento é relativo e atribuído à atrofia glandular e não ao aumento de síntese e deposição (RIBEIRO et al., 2006; GOBBO et al., 2012). No presente trabalho foi vista redução significativa da proliferação celular do estroma, composto majoritariamente por fibroblastos. Há um paralelo, portanto, entre a perda de células estromais e a diminuição da quantidade de colágeno a qual, provavelmente, ocorreu pela redução de sua síntese e deposição.

Trabalhos em que há maior síntese e deposição de matriz extracelular relacionadas ao diabetes, no geral, se referem a órgãos e estruturas altamente sensíveis à hiperglicemia como os rins e vasos sanguíneos e estão associados ao aumento da expressão de TGF- β (NGAI; LINO; BENDECK, 2018; GUO; LIU; GONG, 2019; WANG et al; 2007). Esta citocina regula uma variedade de funções biológicas, desde o desenvolvimento embrionário até reparo de feridas. Sua elevada expressão é encontrada em processos fibróticos (JAVELAUD & MAUVIE, 2004). No presente estudo, apesar de se ter observado redução do conteúdo de colágeno, também ocorreu aumento da expressão de TGF- β , de forma que seu papel pró-fibrótico não foi observado.

É possível inferir que o TGF- β não induziu maior deposição de colágeno em função do seu efeito sobre metaloproteinases. As MMPs são responsáveis por degradar e remodelar a matriz extracelular, a qual é composta majoritariamente por colágeno (LAUER-FIELDS; JUSKA; FIELDS, 2002). A atividade das MMPs é muito importante na morfogênese, visto que esta corresponde a um período de intensa proliferação celular e que exige rearranjos estromais (CUI; HU; KHALIL, 2017). Nas próstatas do grupo controle, no terceiro dia de desenvolvimento, foi observado um elevado conteúdo de MMP-2. Isso era esperado, já que a ramificação de brotos e o crescimento epitelial dentro do estroma circundante requer remodelação da matriz extracelular, porém, seus níveis foram reduzidos nas próstatas tratadas. Tal resultado reforça a ideia de que a redução da quantidade de colágeno não foi dada por aumento de degradação, mas sim por perda significativa de fibroblastos. Singh e colaboradores (2001) relataram que concentrações elevadas de glicose inibem a atividade MMP-2 em células mesangiais e estimulam a expressão do inibidor tecidual da metaloproteinase-2 (TIMP2). De fato, uma função chave desempenhada pelo TGF- β é a supressão da quebra de elementos da matriz extracelular pela inibição da síntese de MMPs e pelo estímulo à expressão de TIMPs (JAVELAUD & MAUVIEL, 2004). Assim, é possível que a superexpressão de TGF- β como estímulo pró-fibrótico, em resposta à diminuição da síntese e deposição de colágeno, tenha impactado negativamente a expressão de MMP-2. Fica evidente, portanto, que a glicose em concentrações elevadas induz grandes modificações no compartimento estromal. Desequilíbrios na síntese e deposição de colágeno e à expressão de MMP-2 certamente prejudicarão o desenvolvimento da próstata por alterarem a estrutura da glândula; modificarem o processo de remodelação estromal, que garante que as unidades epiteliais secretoras se estabilizem em suas localizações

adequadas; e por afetarem, potencialmente, a sinalização via moléculas estromais, a qual é fundamental para proliferação e manutenção da diferenciação do epitélio secretor.

Os dados expostos neste estudo deixam claro que concentrações elevadas de glicose têm impacto negativo sobre a morfogênese da próstata e seus mecanismos de proliferação e sobrevivência celular. É notório que o diabetes gestacional tem se tornado cada vez mais comum. Assim, é importante avaliar mais mecanismos subjacentes à hiperglicemia que tenham efeito sobre a prole de mães diabéticas. Investigar o efeito da glicose sobre outras proteínas e vias que se comunicam com MAPK, como Akt, mTOR, p38 e JNK1/2 e genes envolvidos no desenvolvimento prostático como Wnt5a e Nkx3.1 implica em grande contribuição no esclarecimento de como a glicose influencia período recém pós-natal e quais danos isso pode representar ao indivíduo sexualmente maduro. Ainda, elucidar esses mecanismos de base, sem dúvida, favorece a busca por novas terapias e ações preventivas que garantam melhor controle da glicemia e qualidade de vida às mães e seus filhos recém-nascidos.

7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos avaliados neste trabalho, conclui-se que:

1) Altas concentrações de glicose induzem diminuição da quantidade de mitoses nos primeiros dias pós-natais em células epiteliais prostáticas, bem como redução do número de brotos acinares, o que poderá influenciar a atividade secretória da glândula. Sugere-se que isso seja, ao menos parcialmente, em virtude da menor ativação da via de sinalização MAPK/ERK observada nas próstatas cultivadas em meios hiperglicosados;

2) Além de influenciar a proliferação celular, a glicose em concentrações aumentadas eleva a morte celular por apoptose e outros mecanismos. Em conjunto, esses efeitos se mostram prejudiciais por limitarem o pleno desenvolvimento glandular, fundamental para a manutenção da fertilidade no adulto;

3) A glicose altera o compartimento estromal por diminuir a quantidade de células musculares lisas; por reduzir a síntese e deposição de colágeno; elevar a expressão de TGF- β e reduzir a expressão de MMP-2. Isso implicará em alteração da interação epitélio-estroma, em menor capacidade contrátil e em modificações do processo de remodelação estromal, fundamental à sinalização e organização glandulares;

4) O período pós-natal é um momento chave para o desenvolvimento prostático. Levando em consideração os efeitos da glicose sobre a próstata observados no presente trabalho, é evidente a necessidade de que esse processo ocorra dentro de um cenário homeostase glicêmica. Desta forma, a próstata tem maior possibilidade de atingir um arranjo tecidual final ótimo, que auxilie na manutenção da fertilidade masculina.

REFERÊNCIAS

- AARON, Latayia; FRANCO, Omar E.; HAYWARD, Simon W.. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics Of North America**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.279-288, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes—2016: : Summary of Revisions. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.4-5, 22 dez. 2015. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc16-s003>
- ANTONIOLI, Eliane; DELLA-COLLETA, Heloisa H. M.; CARVALHO, Hernandes F. Smooth Muscle Cell Behavior in the Ventral Prostate of Castrated Rats. **Journal Of Andrology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.50-56, 2 jan. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02758.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00696.x>
- AUMÜLLER, G; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. **International Review Of Cytology**, [s.l.], v. 1, n. 121, p.127-231, jan. 1990. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60660-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60660-9)
- BAK, Ewelina et al. Relationships of Sexual Dysfunction with Depression and Acceptance of Illness in Women and Men with Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 14, n. 9, p.1073-1086, 16 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph14091073>.
- BANERJEE, Partha P et al. Androgen action in prostate function and disease. **American Journal Of Clinical And Experimental Urology** v. 6, n. 2, p 62-7, abr.. 2018. PMid: 29666834.
- BARCELO, Alberto et al. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean in 2015: Evidence for decision and policy makers. **Journal Of Global Health**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.38- 43, 10 nov. 2017. Edinburgh University Global Health Society. <http://dx.doi.org/10.7189/jogh.07.020410>
- BAZ, Baz; RIVELINE, Jean-pierre; GAUTIER, Jean-françois. ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus. **European Journal Of Endocrinology**, [s.l.], v. 174, n. 2, p.43-51, fev. 2016. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/eje-15-0378>.
- BELLASTELLA, G. et al. Anti-Pituitary Antibodies and Hypogonadotropic Hypogonadism in Type 2 Diabetes: In Search of a Role. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 36, n. 8, p.116-117, 23 jul. 2013. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/dc13-0637>.

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, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-20. <https://doi.org/10.1038/414813a>

BRUNI-CARDOSO, A. & CARVALHO, H. F. Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. **Anatomical Record**, v. 290, n. 10, p. 1223-1232, out. 2007. <https://doi.org/10.1002/ar.20591>

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. **Histochem Cell Biology**, v. 129, n. 6, p. 805-815, jun. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0407-x>

CAGNON, V.h.a. et al. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). **Tissue And Cell**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.275-283, ago. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/tice.2000.0123>.

CAO, Q. et al. Negative Feedback Regulation of Raf/MEK/ERK Cascade After Sublethal Cerebral Ischemia in the Rat Hippocampus. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.153-162, 15 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-010-0285-1>.

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. *Cell Biol* 1992;1:76–83. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10014>

CHEN, Kuan-chou et al. Benign prostatic hyperplasia complicated with T1DM can be alleviated by treadmill exercise—evidences revealed by the rat model. **Bmc Urology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.113-117, 17 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12894-015-0104-8>.

CLARK, Barbara J.; PROUGH, Russell A.; KLINGE, Carolyn M.. Mechanisms of Action of Dehydroepiandrosterone. **Dehydroepiandrosterone**, [s.l.], p.29-73, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2018.02.003>

CLEUTJENS, C. B. J. M. et al. Both Androgen Receptor and Glucocorticoid Receptor Are Able to Induce Prostate-Specific Antigen Expression, but Differ in Their Growth-Stimulating Properties of LNCaP Cells*. **Endocrinology**, [s.l.], v. 138, n. 12, p.5293-5300, 1 dez. 1997. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.138.12.5564>.

COLELLO, D. et al. Androgen and Src signaling regulate centrosome activity. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 123, n. 12, p.2094-2102, 25 maio 2010. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.057505>.

COLELLO, Diane et al. Integrins Regulate Microtubule Nucleating Activity of Centrosome through Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase (MEK/ERK) Signaling. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 287, n. 4, p.2520-2530, 22 nov. 2011. American

Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.254128>.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DIZDAROGLU, M; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 2003; 17:1195
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>

CUI, Ning; HU, Min; KHALIL, Raouf A.. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, [s.l.], p.1- 73, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>.

CUNHA, Gerard et al. Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. **Epithelial Cell Biology**, [s.i], v. 2, n. 1, p.76- 83, abr. 1992. PMID: 1307941.

CUNHA, G. R. et al. The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocrine Reviews**, v. 8, n. 3, p. 338–362, 1987. <https://doi.org/10.1210/edrv-8-3-338>

CUNHA, Gerald R. et al. Development of the human prostate. **Differentiation**, [s.l.], v. 103, p.24-45, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2018.08.005>.

CUNHA, Gerald R.; COOKE, Paul S.; KURITA, Takeshi. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. **Archives Of Histology And Cytology**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.417-434, 2004. International Society of Histology & Cytology.
<http://dx.doi.org/10.1679/aohc.67.417>.

D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.582-592, 25 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>.

DAMASCENO, A. A. et al. Effects of maternal diabetes on male offspring: high cell proliferation and increased activity of MMP-2 in the ventral prostate. **Cell And Tissue Research**, [s.l.], v. 358, n. 1, p.257-269, 3 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-014-1941-6>.

DANDONA, Paresh; DHINDSA, Sandeep. Update: Hypogonadotropic Hypogonadism in Type 2 Diabetes and Obesity. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 96, n. 9, p.2643-2651, set. 2011. The Endocrine Society.
<http://dx.doi.org/10.1210/jc.2010-2724>.

D'ANTONIO, Jason M; GRIEND, Donald J Vander; ISAACS, John T. DNA licensing as a novel androgen receptor mediated therapeutic target for prostate cancer. **Endocrine-related Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.325-332, jun. 2009. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1677/erc-08-0205>.

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. <https://doi.org/10.1097/00005392-199812020-00004>

DENMEADE, SR; LIN, XS; ISAACS, JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. **The Prostate**. [S.I], v, 28, n. 4, p.

251-265, abr. 1996 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(199604\)28:4<251::AID-PROS6>3.3.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(199604)28:4<251::AID-PROS6>3.3.CO;2-5)

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. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302011000600005>

DHINDSA, Sandeep et al. Frequent Occurrence of Hypogonadotropic Hypogonadism in Type 2 Diabetes. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 89, n. 11, p.5462-5468, nov. 2004. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0804>.

ENGELMAN, Jeffrey A; LUO, Ji; CANTLEY, Lewis C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews: Genetics**, [s.i.], v. 7, n. 8, p.606-619, ago. 2006. <https://doi.org/10.1038/nrg1879>

FALL, Caroline H. D.. Fetal Programming and the Risk of Noncommunicable Disease. **The Indian Journal Of Pediatrics**, [s.l.], v. 80, n. 1, p.13-20, 25 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12098-012-0834-5>.

FANG, T.T et al. Effects of high glucose induced primary cardiomyocytes injury on necroptosis and the related mechanism. **Chinese Journal Of Applied Physiology**, [s.l.], v. 2, n. 35, p.160-164, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.12047/j.cjap.5710.2019.035>.

FISMAN, Enrique Z; MOTRO, Michael; TENENBAUM, Alexander. Cardiovascular diabetology in the core of a novel interleukins classification: the bad, the good and the aloof. **Cardiovascular Diabetology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.11-21, 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-2-11>.

FRANKE, T F. PI3K/Akt: getting it right matters. **Oncogene**, [s.l.], v. 27, n. 50, p.6473-6488, out. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.313>.

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. PMID: 9699659.

GIUGLIANO, F et al. Determinants of erectile dysfunction in type 2 diabetes. **International Journal Of Impotence Research**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.204-209, 11 fev. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ijir.2010.1>.

GOBBO, Marina Guimarães et al. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. **Micron**, [s.l.], v. 43, n. 2-3, p.326-333, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.09.009>.

GORBACHINSKY, I; AKPINAR, H; ASSIMOS, DG. Metabolic Syndrome and Urologic Diseases. **Reviews in Urology**, v. 12, n. 4, p. 157–80, 2010. PMID: 21234260.

GUO, Jia; LIU, Zhangsuo; GONG, Rujun. Long noncoding RNA: an emerging player in diabetes and diabetic kidney disease. **Clinical Science**, [s.l.], v. 133, n. 12, p.1321-1339, 20 jun. 2019. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20190372>.

HAYWARD, Simon W; CUNHA, Gerard R. The prostate: development and physiology. **Radiologic Clinics Of North America**, [s.i.], v. 1, n. 38, p.1-14, jan. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0033-8389\(05\)70146-9](https://doi.org/10.1016/S0033-8389(05)70146-9)

HEMMINGS, B. A.; RESTUCCIA, D. F. PI3K-PKB / Akt Pathway. p. 1–4, 2012. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>

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. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.v12.i3.30>

JAVELAUD, Delphine; MAUVIEL, Alain. Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physio-pathological roles. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 36, n. 7, p.1161-1165, jul. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00255-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00255-3).

KAPOOR, Charu; VAIDYA, Sharad; WADHWAN, Vijay. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). **Journal Of Cancer Research And Therapeutics**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.28-35, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.157337>

KEARNEY, Conor J.; MARTIN, Seamus J.. An Inflammatory Perspective on Necroptosis. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.965-973, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.024>.

LABRIE, Fernand et al. DHEA and Its Transformation into Androgens and Estrogens in Peripheral Target Tissues: Intracrinology. **Frontiers In Neuroendocrinology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.185-212, jul. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/frne.2001.0216>.

LABRIE, Fernand. Hormonal Therapy of Prostate Cancer. **Neuroendocrinology - Pathological Situations And Diseases**, [s.l.], p.321-341, 2010. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123\(10\)82014-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123(10)82014-x)

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M.. MTOR signaling at a glance. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 122, n. 20, p.3589-3594, 7 out. 2009. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.051011>.

LAUER-FIELDS, Janelle L.; JUSKA, Darius; FIELDS, Gregg B.. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. **Biopolymers**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.19-32, 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.10201>.

LEE, K. L.; PEEHL, D. M. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **Journal of Urology**, v. 172, n. 5 I, p. 1784–1791, 2004. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000133655.71782.14>

LIANG, Weijie et al. A novel damage mechanism: Contribution of the interaction between necroptosis and ROS to high glucose-induced injury and inflammation in

H9c2 cardiac cells. **International Journal Of Molecular Medicine**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.201-208, 29 maio 2017. Spandidos Publications.
<http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2017.3006>.

LIRA, L. Q. & DIMENSTEIN, R. Vitamina A e Diabetes Gestacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 355-359, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000300023>

LIU, Di; LIANG, Xiaochun; ZHANG, Hong. Effects of High Glucose on Cell Viability and Differentiation in Primary Cultured Schwann Cells: Potential Role of ERK Signaling Pathway. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.1281-1290, 25 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-015-1824-6>.

LIU, H.S.; Wang, S.Z. Study on the expression of androgen receptor in testis, epididymis and prostate of adult rats with diabetes. **National Journal Of Andrology**, [s.l.], v. 12, n. 11, p.891-894, dez. 2005. PMID:16398356.

MACK, Lynn R.; TOMICH, Paul G.. Gestational Diabetes. **Obstetrics And Gynecology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.207-217, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ogc.2017.02.002>

MAIORINO, Maria Ida; BELLASTELLA, Giuseppe; ESPOSITO, Katherine. Diabetes and sexual dysfunction: current perspectives. **Diabetes, Metabolic Syndrome And Obesity: Targets and Therapy**, [s.l.], p.95-105, mar. 2014. Dove Medical Press Ltd.
<https://doi.org/10.2147/DMSO.S36455>

MALAVIGE, Lasantha S.; LEVY, Jonathan C.. Erectile Dysfunction in Diabetes Mellitus. **The Journal Of Sexual Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.1232-1247, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01168.x>.

MARCINIAK, Aleksandra et al. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [s.l.], v. 56, n. 2, p.133-138, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2017.01.001>.

MARKER PC, DONJACOUR AA, DAHIYA R, CUNHA GR. 2003. Hormonal cellular and molecular control of prostatic development. **Develop. Biol** 253:165-174.
[http://dx.doi.org/http://10.1016/s0012-1606\(02\)00031-3](http://dx.doi.org/http://10.1016/s0012-1606(02)00031-3)

MAUNEY, Joshua; OLSEN, Bjorn R.; VOLLOCH, Vladimir. Matrix remodeling as stem cell recruitment event: A novel in vitro model for homing of human bone marrow stromal cells to the site of injury shows crucial role of extracellular collagen matrix. **Matrix Biology**, [s.l.], v. 29, n. 8, p.657-663, out. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2010.08.008>

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. *The American Journal of surgical Pathology*, v. 12, n. 8, p. 619-633, ago. 1988. <https://doi.org/10.1097/0000478-198808000-00003>

MCNEAL, John E.. The Prostate and Prostatic Urethra: A Morphologic Synthesis. **Journal Of Urology**, [s.l.], v. 107, n. 6, p.1008-1016, jun. 1972. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)61195-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)61195-9).

NGAI, David; LINO, Marsel; BENDECK, Michelle P.. Cell-Matrix Interactions and Matricrine Signaling in the Pathogenesis of Vascular Calcification. **Frontiers In Cardiovascular Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 174, p.1-16, 7 dez. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2018.00174>.

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. ISSN:0100-2929

PADILHA, P. C. et al. Terapia nutricional no diabetes gestacional. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 1, p. 95-105, jan./fev., 2010. LIRA, L. Q. & DIMENSTEIN, R. Vitamina A e Diabetes Gestacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 355-359, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302010000300023>

PATEL, Aleena L.; SHVARTSMAN, Stanislav Y.. Outstanding questions in developmental ERK signaling. **Development**, [s.l.], v. 145, n. 14, p.1-12, 15 jul. 2018. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.143818>.

PEIRÓ, Concepción et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 133, n. 7, p.967-974, ago. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704184>.

PERRONE, Serafina et al. Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. **World Journal Of Clinical Pediatrics**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.172-181, 2016. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.5409/wjcp.v5.i2.172>.

PORTO, Elaine Manoela et al. Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. **Microscopy Research And Technique**, [s.l.], v. 74, n. 11, p.1040-1048, 20 abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.20991>.

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. <https://doi.org/10.1210/en.130.6.3703>

PUFALL, Miles A.. Glucocorticoids and Cancer. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p.315-333, 2015. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_14.

RATHMANN, W.; GIANI, G.. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 27, n. 10, p.2568-2569, 24 set. 2004. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.27.10.2568>.

RATO, Luís et al. Testosterone deficiency induced by progressive stages of diabetes mellitus impairs glucose metabolism and favors glycogenesis in mature rat Sertoli cells. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 66, p.1-10, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.001>

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. <https://doi.org/10.4081/975>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00591.x>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00657.x>

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00682.x>

SCHALKEN, Jack. Androgen receptor mediated growth of prostate (cancer). **European Urology Supplements**, [S.I.], v. 4, p. 4-11, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2005.08.006>

SCHIEKOFER, S. et al. Acute Hyperglycemia Causes Intracellular Formation of CML and Activation of ras, p42/44 MAPK, and Nuclear Factor B in PBMCs. **Diabetes**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.621-633, 1 mar. 2003. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.52.3.621>.

SHAW, Aubie; ATTIA, Steven; BUSHMAN, Wade. Prostate stromal and urogenital sinus mesenchymal cell lines for investigations of stromal–epithelial interactions. **Differentiation**, [s.l.], v. 76, n. 6, p.599-605, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00275.x>.

SILVA 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. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032009000100002>

SINGH, P. et al. Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer. **Endocrine-related Cancer**, v. 13, n. 3, p. 653-666, set. 2006. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00797>

SOUDAMANI, Singh 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**, [s.l.], v. 287, n. 2, p.1281- 1289, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.a.20250>.

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. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.961>

SUN, Yu et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal Of Receptors And Signal Transduction**,

[s.l.], v. 35, n. 6, p.600-604, 22 jun. 2015. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>.

TESSIER, D. M.; MATSUMURA, F.. Increased ErbB-2 Tyrosine Kinase Activity, MAPK Phosphorylation, and Cell Proliferation in the Prostate Cancer Cell Line LNCaP following Treatment by Select Pesticides. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.38-43, 1 mar. 2001. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/60.1.38>

THOMAS, Celeste C.; PHILIPSON, Louis H.. Update on Diabetes Classification. **Medical Clinics Of North America**, [s.l.], v. 99, n. 1, p.1-16, jan. 2015. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.015>.

THOMSON, Axel et al. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. **Development**, [s.i.], v. 129, n. 129, p.1905-1912, jan. 2002. PMID: 11934856

THORVE, Vrushali S. et al. Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. **Journal Of Diabetes And Its Complications**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.129-136, mar. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2010.03.003>.

TIMMS, Barry G.. Prostate development: a historical perspective. **Differentiation**, [s.l.], v. 76, n. 6, p.565-577, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x>.

TORRES-CABALA, C.; CURRY, J. **Genetics of Melanoma**. Edição 1, New York, NY: Springer-Verlag New York, 2016 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3554-3_13

TUXHORN, Jennifer et al. Stromal Cells Promote Angiogenesis and Growth of Human Prostate Tumors in a Differential Reactive Stroma (DRS) Xenograft Model. **Cancer Research**, [s.i.], v. 11, n. 62, p.298-307, jun. 2002. PMID: 12036948

UZGARE, Aarti R.; XU, Yi; ISAACS, John T.. In vitro culturing and characteristics of transit amplifying epithelial cells from human prostate tissue. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.196-205, 2003. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.10764>.

VÁRKONYI, Tamás; KEMPLER, Peter. Sexual dysfunction in diabetes. **Diabetes And The Nervous System**, [s.l.], p.223-232, 2014. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-53480-4.00017-5>.

VARMA, Shubha et al. Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. **American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 289, n. 4, p.1744-1751, out. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.01088.2004>.

VILAMAIOR, P. S. L.; TABOGA, S. R. & CARVALHO, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar Rats: a stereological and morphometrical study. **The Anatomical Record. Part A**, v. 288, n. 8, p. 885-892, ago. 2006. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20363>

WANG F, REECE EA, YANG P. Superoxide dismutase 1 overexpression in mice abolishes maternal diabetes—induced endoplasmic reticulum stress in diabetic embryopathy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2013;209:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.06.037>

WANG, Amy et al. Interference with TGF- β signaling by Smad3-knockout in mice limits diabetic glomerulosclerosis without affecting albuminuria. **American Journal Of Physiology-renal Physiology**, [s.l.], v. 293, n. 5, p.1657-1665, nov. 2007. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00274.2007>.

WANG, Huayi et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. **Molecular Cell**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.133-146, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.003>.

WEIBEL, Ewald R.. Selection of the best method in stereology. **Journal Of Microscopy**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.261-269, abr. 1974. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.1974.tb03938.x>.

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. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302011000700002>

WILD, S. et al. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.1047-1053, 26 abr. 2004. American Diabetes Association. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.27.5.1047>.

WILSON, Jean D.. The Critical Role of Androgens in Prostate Development. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.577-590, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.003>.

WONG, Y. C.; TAM, N. N. C.. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. **Differentiation**, [s.l.], v. 70, n. 9-10, p.633-645, dez. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700916.x>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevalence of obesity among adults: Estimates by country** (2017). Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.CTRY2450A?lang=en>. Acesso em: 01 jun. 2019

WORLD HEALTH ORGANIZATION.. **Global report on diabetes. World Health Organization** (2016). Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204871>. Acesso em: 01 jun. 2019

ZHOU, Wen; YUAN, Junying. Necroptosis in health and diseases. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 35, p.14-23, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.013>.

ZHU, Hao et al. High glucose levels increase the expression of neurotrophic factors associated with p-p42/p44 MAPK in Schwann cells in vitro. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], p.179-184, 2 maio 2012. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2012.896>.