

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUIZ FELIPE FERNANDES PEIXOTO

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO DIABETES GESTACIONAL NA PRÓSTATA DE
RATOS NEONATOS E PRÉ-PÚBERES**

UBERLÂNDIA – MG

2023

LUIZ FELIPE FERNANDES PEIXOTO

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO DIABETES GESTACIONAL NA PRÓSTATA DE
RATOS NEONATOS E PRÉ-PÚBERES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC), vinculado ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro

Linha de Pesquisa: Biologia da Reprodução.

UBERLÂNDIA – MG

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P379a Peixoto, Luiz Felipe Fernandes, 1998-
2023 Avaliação do impacto do diabetes gestacional na próstata de ratos neonatos e pré-púberes [recurso eletrônico] / Luiz Felipe Fernandes Peixoto. - 2023.

Orientadora: Daniele Lisboa Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5002>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

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

CDU: 573

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 04/2023, do PPGBC				
Data:	26 de Abril de 2023	Hora de início:	14:35	Hora de encerramento:	17:30
Matrícula do Discente:	12112BCE001				
Nome do Discente:	Luiz Felipe Fernandes Peixoto				
Título do Trabalho:	Avaliação do impacto do diabetes gestacional na próstata de ratos neonatos e pré-pubescentes				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia da Reprodução				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudo da próstata de ratos descendentes de mães diabéticas				

Reuniu-se, por Videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Rejane Maira Góes** – UNESP; **Patricia Simone Leite Vilamaior** – UNESP; e **Daniele Lisboa Ribeiro** – UFU, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dr(a). **Daniele Lisboa Ribeiro**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente **Luiz Felipe Fernandes Peixoto** 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). Ultimeada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

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 **Daniele Lisboa Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 20:35, 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 **Patricia Simone Leite Vilamaior, Usuário Externo**, em 27/04/2023, às 10:02, 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 **Rejane Maira Goes, Usuário Externo**, em 27/04/2023, às 13:36, 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 **4438242** e o código CRC **F8FEBEA0**.

AGRADECIMENTOS

É com imenso prazer que concluo esta fase de minha jornada. Com ingresso no início de 2021, ainda em tempos de pandemia, a família, grupo de pesquisa e os colegas foram essenciais durante esta etapa. Sou grato a todos aqueles que contribuíram de alguma forma na conquista de meus sonhos. Expresso aqui minha gratidão àqueles que fizeram parte desta conquista:

Agradeço aos meus pais Ana Paula e Fábio por sempre me guiarem, incentivarem e me apoiarem a sempre estudar e buscar meus sonhos. Agradeço ao meu irmão Marcos Paulo pelas conversas, estímulos e incentivos durante toda a minha trajetória acadêmica.

Aos meus professores da educação básica por se dedicarem ao ensino e os responsabilizo por me encantarem com o universo das áreas biológicas e da saúde. Dentre os professores, destaco Maria Marta e Kamila, sempre me apoiando e me estimulando a seguir a área das Ciências Biológicas.

Aos meus professores do ensino superior por terem fornecido recursos, ideias e incentivos para que eu fosse para a área da Biologia Celular. Dentre estes, destaco a professora Maria Rita como principal influenciadora, se tornando meu primeiro modelo a ser seguido desde o primeiro período da graduação.

À equipe da banca de qualificação por terem contribuído com argumentos, ideias e valiosas sugestões, permitindo o aprimoramento deste trabalho. Destaco as professoras Neide e Tatiana, juntamente ao professor Anderson por terem feito parte desta trajetória.

Aos meus colegas da pós-graduação pelo convívio harmonioso e por se disponibilizarem a ajudar sempre que precisei. Dentre estes, destaco a Elusca pela amizade, pelas conversas, pelo incentivo e pela ajuda sempre que necessário.

Agradeço ao colegiado e à secretaria do PPGBC pela proatividade e pelo desempenho, principalmente durante a pandemia. Dentre o colegiado, destaco a professora Bellisa e a secretária Renata pelo ótimo desempenho e por se mostrarem presentes e dispostas sempre que necessário para com os estudantes.

Às alunas de graduação Laura e Marina por se esforçarem e por contribuírem com o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Daniele por me acolher em um momento de pandemia, por sempre estar disposta a me ensinar e a me treinar na área da morfologia, pelos conselhos e pelas valiosas sugestões ao longo deste trabalho. Agradeço por sempre estar presente quando solicitada, à sua proatividade, ao apoio emocional e profissional, à preocupação e à dedicação durante estes anos de mestrado, se mostrando uma excelente orientadora. Serei sempre grato aos seus ensinamentos e ao companheirismo.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado, se tornando um ótimo incentivo, fornecendo recurso necessário para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

O diabetes mellitus gestacional (DG) é a complicação médica mais comum durante a gravidez. Ele cria um ambiente hiperglicêmico e afeta o desenvolvimento da prole, aumentando o risco de desordens a longo prazo, incluindo obesidade, metabolismo da glicose diminuída e doenças cardiovasculares. O impacto do DG na próstata do descendente em fase adulta já está descrito, porém não há certeza se esses efeitos são devidos apenas à condição materna ou se a prole as desenvolve ao longo da vida. Essa investigação avaliou a próstata da prole neonatal e pré-púbere de ratas diabéticas e o possível efeito da condição materna na programação do desenvolvimento da glândula, tentando responder ao questionamento anterior. Para isso, o diabetes foi induzido em ratas *Wistar* prenhas com estreptozotocina (50mg/kg, i.p.) e filhotes de 7 ou 30 dias de idade de mães saudáveis (PC7, PC30) ou diabéticas (PD7, PD30) tiveram a próstata avaliada. DG reduziu o peso corporal em PD7 e PD30 e o peso da próstata em PD30. Embora o número de brotos não tenha sido afetado houve uma redução nos níveis apoptóticos associada à diminuição na canalização prejudicada na próstata dos neonatos. Além disso, o DG reduziu a fosforilação de ERK1/2 e também a proliferação celular e quantidade de colágeno na próstata de PD7. Em PD30, o DG levou a uma redução no epitélio secretor e no estroma, mas aumentou a área luminal. Adicionalmente, a marcação de células musculares lisas e colágeno diminuiu nesses filhotes juvenis, implicando em prejuízo no desenvolvimento estromal. Esses dados indicam que DG inativa uma importante via de sinalização para proliferação celular na próstata já nos primeiros dias pós-natais que, embora seja restaurado no período pré-púbere, não foi suficiente para evitar a atrofia epitelial. Dessa forma, este impacto do DG no desenvolvimento do epitélio e do estroma pode afetar a capacidade reprodutiva da prole na vida adulta.

Palavras-chave: Reprodução; *Diabetes mellitus*; Desenvolvimento prostático; Ambiente hiperglicêmico.

ABSTRACT

Gestational diabetes mellitus (GD) is the most common medical complication during pregnancy. It creates a hyperglycemic environment and impacts offspring development, increasing the risk of long-term complications, including obesity, impaired glucose metabolism and cardiovascular disease. The impact of GD on the prostate of adult offspring is already described, however it is not known whether these effects are due only to the maternal condition or if the offspring develops them throughout life. This investigation evaluated the prostate of the neonatal and prepubertal offspring of diabetic rats. Diabetes was induced in pregnant Wistar rats with streptozotocin (50mg/kg, i.p.) and the 7 or 30-days old pups from healthy (PC7, PC30) or diabetic (PD7, PD30) rats had the prostate evaluated. GD reduced body weight in PD7 and PD30 and the prostate weight in PD30. The prostate branching was not affected but a reduction in apoptotic levels was associated to impaired acinar bud canalization in neonates. Additionally, GD reduced ERK1/2 phosphorylation, cell proliferation and collagen quantity in PD7. In PD30, GD led to a reduction in the secretory epithelium and stroma but increased the luminal area. Moreover, smooth muscle cells and collagen was decreased in these prepubertal pups which may impair stromal normal development. These data indicate that GD inactivates an important cell proliferation signaling in the prostate in the first postnatal days which is restored in prepubertal period but it was not sufficient to avoid epithelial atrophy. This effect of GD on epithelium and stroma development can impact the reproductive capacity of the offspring at adult life.

Keywords: *Reproduction; Diabetes mellitus; Prostate development; Hyperglycemic environment.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diabetes gestacional.....	21
Figura 2 – Próstata.....	23
Figura 3 – Mecanismo de sinalização androgênica na próstata via receptor de andrógeno (AR).....	26
Figura 4- Estereologia da próstata de ratos neonatos e pré-púberes.....	38
Figura 5 – Avaliação da proliferação celular.....	39
Figura 6- Western blotting para AKT e ERK1/2.....	40
Figura 7 – Caspase-3.....	41
Figura 8 – Avaliação de colágeno e musculatura lisa.....	43
Figura 9 – TGF- β	43
Figura 10 – MMP-2.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados no ensaio de Western blotting.....	33
Tabela 2 - Parâmetros biométricos e glicêmicos das mães saudáveis (PC) ou diabéticas (PD) em períodos pré-gestacional, gestação no 17º dia e pré-gestacional ao parto.....	35
Tabela 3 - Parâmetros biométricos, metabólicos e hormonais da prole de ratos de mães normais (PC) ou diabéticas (PD) aos 7 ou 30 dias de idade.	36

LISTA DE ABREVIACOES

AKT Proteína quinase B

Apaf1 Fator 1 de ativação da protease apoptótica

AR Receptor de andrógeno

BSA Albumina de soro bovino

C₃H₁₀ Xilol

CEUA Comissão de Ética na Utilização de Animais

CH₃CH₂OH Etanol

CH₃OH Metanol

CHCl₃ Clorofórmio

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTLA-4 Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos

DG Diabetes mellitus gestacional

dL Decilitro

DM Diabetes mellitus

DMT1 Diabetes mellitus tipo 1

DMT2 Diabetes mellitus tipo 2

DNA Ácido desoxirribonucleico

EGF Fator de crescimento epidérmico

ERK 1/2 Quinase regulada por sinal extracelular

FGF Fator de crescimento de fibroblastos

H&E Hematoxilina-Eosina

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

i.p. Intraperitoneal

IGF Fatores de crescimento semelhantes à insulina

MAPK Cinases ativadas por mitógenos

MEC Matriz extracelular

mg Miligramas

mL Mililitro

MMP Metaloprotease de matriz

MMP-2 Metaloprotease de matriz 2

mTOR

Na₃C₆H₅O₇ Citrato de sódio

NCD Doenças não transmissíveis
NF- κ B Fator nuclear-kappa beta
nm Nanometros
pg Picogramas
pH Potencial hidrogeniônico
PI3K Fosfatidil-inositol 3-quinase
pró-MMP Metaloprotease de matriz em forma de zimógeno
REBIR Rede de Biotério de Roedores
RNA Ácido ribonucleico
siRNA Pequeno RNA de interferência
STZ Estreptozotocina
TBST Tampão Tris salino com Tween 20
TDAH Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TGF- β Fatores de crescimento transformador beta
TNF- α Fator de necrose tumoral α
UFU Universidade Federal de Uberlândia
UGM Mesênquima urogenital
UGS Seio urogenital
Zn Zinco

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Diabetes mellitus</i>	17
2.2 Ambiente intrauterino hiperglicêmico e desenvolvimento fetal	19
2.3 Próstata e regulação androgênica	22
2.4 Desenvolvimento da próstata	26
3.0 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Indução do diabetes gestacional e eutanásia	30
4.2 Análise morfológica	30
4.3 Imunohistoquímica	31
4.4 <i>Western blotting</i>	32
4.5 Avaliação de apoptose	33
4.6 Quantificação de TGF- β por ELISA	33
4.7 Dosagem de testosterona	34
4.8 Análise estatística	34
5.0 RESULTADOS	35
5.1 Diabetes gestacional reduz o peso corporal e da próstata na prole	35
5.2 O desenvolvimento pós-natal da próstata é afetado pelo diabetes gestacional	36
5.3 A proliferação celular é reduzida em associação com fosforilação ERK1/2 prejudicada em descendentes neonatais de ratas diabéticas	36
5.4 O diabetes gestacional reduziu a ativação da caspase-3 na prole neonatal	37
5.5 Redução de colágeno e células musculares lisas na próstata de filhos de mães diabéticas ..	41
6.0 DISCUSSÃO	44
7.0 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1.0 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica considerada um alarmante problema de saúde pública que afeta cerca de 11,9 milhões de indivíduos entre as faixas etárias de 20 a 79 anos (CASARIN *et al.*, 2022). Segundo estudos recentes, cerca de 9,6% dos homens e 9,0% das mulheres possuíam algum tipo da doença no ano de 2019, e esse número tende a crescer em todo o planeta. Estima-se que até 2045 haja um aumento de 10,9% no número total de pessoas acometidas pela doença em relação a 2019 (SAEEDI *et al.*, 2019).

O diabetes é atualmente classificado em três principais tipos, sendo tipo 1 (DMT1), tipo 2 (DMT2) e *diabetes mellitus* gestacional (DG). O tipo 1 é causado por processos autoimunes que levam à danos e morte das células β pancreáticas. Já o tipo 2, sendo considerado o mais comum, possui causa multifatorial expressando como fenótipos principais a desregulação das células produtoras de insulina seguido de resistência periférica ao hormônio (WEINERT *et al.*, 2011, BLAIR, 2016, PADHI; NAYAK; BEHERA, 2020). O *diabetes mellitus* gestacional (DG) é considerado pela literatura como intolerância à glicose iniciada durante a gravidez ou que tenha sido detectada durante o mesmo período (BUCHANAN; XIANG 2005, COUTINHO; SILVA JÚNIOR, 2015, ALAM *et al.*, 2021). A interação entre genitora e prole nessas condições favorece o surgimento de alterações embrionárias devido à exposição a um ambiente rico em glicose e citocinas pró-inflamatórias que entram em contato com o sangue do feto através da placenta (CHALLIER *et al.*, 2006, BAR *et al.*, 2012, COUTINHO; SILVA JÚNIOR, 2015, EDLOW *et al.*, 2019).

Durante a gestação em condição de DG, o metabolismo materno com altas taxas de glicose contribui com o aparecimento de síndromes metabólicas e complicações para os descendentes. Estudos já descreveram alguns dos efeitos negativos causados pelo ambiente intrauterino nestas condições, os quais discutem que a hiperglicemia pode causar má formações no feto ao longo do tempo (BAR *et al.*, 2012, COUTINHO; SILVA JÚNIOR, 2015).

A próstata é um órgão acessório do sistema reprodutor masculino responsável por produzir diversos componentes do fluido seminal, localizando-se na base da bexiga e rodeando a uretra prostática (MIOTTI; MOLLERACH; BARQUEZ, 2017, FRANCIS; SWAIN, 2018). O desenvolvimento da próstata se inicia durante a vida intrauterina e possui seu término somente na puberdade, quando há a completa maturação do órgão (FRANCIS; SWAIN, 2018). A próstata origina-se no embrião a partir do seio urogenital (UGS), uma estrutura endodérmica em que as células epiteliais formam brotos sólidos que penetram no

ambiente mesenquimal circundante em diferentes direções por volta do 17º dia de gestação em camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2016). O desenvolvimento pós-natal inclui crescimento epitelial, ramificação de brotos e formação dos ductos (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986). Vilamaior, Taboga e Carvalho (2006) descrevem que após o nascimento há intensa proliferação celular, marcando o crescimento da próstata, culminando com um aumento do peso da glândula. Então, há um período de repouso entre a quarta e a sexta semana, em que o aumento da próstata é proporcional ao aumento do corpo, e o crescimento reinicia na sétima semana até a fase adulta. Nesse cenário, quaisquer alterações metabólicas e/ou hormonais ocorridas no período pós-natal podem interferir no funcionamento da próstata em desenvolvimento (CASSIMIRO *et al.*, 2020).

Recentemente, foi descrito que o ambiente com alta concentração de glicose durante os primeiros 3 dias pós-natal afetou o desenvolvimento *ex vivo* da próstata (CASSIMIRO *et al.*, 2020). Adicionalmente, o impacto negativo do DG já foi descrito na próstata de ratos para a prole de adultos e púberes (DAMASCENO *et al.*, 2014, SANTOS *et al.*, 2014), contudo ainda não há estudos consistentes se o impacto negativo do DG é devido à próstata ter se desenvolvido sob o ambiente hiperglicêmico ou devido a perturbações acumuladas ao longo da vida ou ambos.

Nesse contexto, considerando a incidência mundial de diabetes materno, a investigação dos efeitos da condição na próstata dos descendentes no período neonatal e pré-púbere são inexistentes e necessárias para elucidar como o diabetes gestacional pode afetar o desenvolvimento da próstata, sua estrutura tecidual e função glandular até a idade adulta. Assim, para tentar esclarecer esta questão, as próstatas de ratos filhotes de mães diabéticas foram avaliadas aos 7 e 30 dias pós-natais.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus (DM) é uma doença que vem causando cada vez mais impacto e preocupação na saúde pública mundial devido sua alta incidência. Ele é considerado como uma doença crônica que atingiu cerca de 537 milhões de pessoas em todo o mundo em 2021 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2023), sendo 9,6% dos homens e 9,0% das mulheres, incluindo todos os subtipos da doença, e esse número tende a crescer. Estima-se que até 2045 haja um aumento de 10,9% no número total de pessoas com DM (SAEEDI *et al.*, 2019). Segundo dados recentes, na América do Sul foram diagnosticados 32 milhões de casos de *diabetes mellitus*, possuindo estimativa de aumento para 45 milhões até 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2023). O Brasil se destaca na estatística, sendo considerado pela *International Diabetes Federation* (2017) como o 4º país com maior número de casos em adultos, chegando à marca de 13 milhões de portadores da doença em 2017, e supõem-se que em 2035 haverá aumento de 25%, chegando ao ano de 2045 com aproximadamente 20 milhões de casos (GUARIGUATA *et al.*, 2014, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

O DM possui como principal característica a hiperglicemia, acrescido de resistência e/ou produção insuficiente do hormônio insulina (FRÁGUAS; SOARES; BRONSTEIN, 2009). A doença é considerada multifatorial envolvendo fatores genéticos, imunológicos e até mesmo ambientais, que juntos, geram sua patogenicidade. A mesma possui grande heterogeneidade devido às disfunções fisiológicas, as quais levam o indivíduo a desenvolver resistência ou secreção alterada de insulina (FRÁGUAS; SOARES; BRONSTEIN, 2009, BLAIR, 2016). É notável o impacto da mesma na vida dos portadores, visto as alterações da rotina e qualidade de vida que necessitam de adequação devido às limitações causadas pela doença, como modificação dietética, monitoramento periódico da glicemia e até mesmo aplicações insulínicas diárias (MOREIRA *et al.*, 2003).

O diabetes é atualmente classificado em três principais tipos, sendo tipo 1 (DMT1), tipo 2 (DMT2) e *diabetes mellitus* gestacional (DG). O tipo 1 é causado por processos autoimunes que levam à danos e morte das células β pancreáticas já na infância e a necessidade de reposição de insulina exógena. O tipo 2, considerado o mais comum, a hiperglicemia possui causa multifatorial, expressando como fenótipos principais a desregulação das células produtoras de insulina seguido de resistência ao hormônio. Já o diabetes gestacional pode ser caracterizado como qualquer nível de resistência à insulina

desenvolvido durante o período gestacional (WEINERT *et al.*, 2011, BLAIR, 2016, PADHI; NAYAK; BEHERA, 2020).

O *diabetes mellitus* tipo 1 (DMT1) está relacionada ao ataque do sistema imunológico às células β -pancreáticas. Essa relação entre células β -pancreáticas e o sistema imunológico foi traçada a partir do gene CTLA-4, envolvido na transcrição de antígenos leucocitários humanos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015, ZACCARDI *et al.*, 2016). Segundo a literatura, esse gene possui importância significativa no controle da resposta imune, pois regula a atividade de linfócitos T auto reativos. O gene citado é um dos responsáveis por codificar proteínas de superfície celular participantes em respostas imunológicas. Variações nos genes codificadores de antígenos leucocitários, bem como alterações nas sequências de aminoácidos das proteínas transcritas por estes podem resultar em perda parcial ou total da funcionalidade das células β -pancreáticas, podendo potencializar complicações e até mesmo restringir a auto tolerância, resultando em doenças autoimunes, como DMT1, no qual os linfócitos T atacam as células β -pancreáticas limitando a produção de insulina no órgão (MURPHY, 2014, ZACCARDI *et al.*, 2016).

O *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) é considerado o mais comum entre as classificações, sendo aproximadamente 90% dos casos diagnosticados. O DMT2 possui como característica principal alterações fisiológicas causadas por combinações de efeitos danosos ao organismo, sendo a baixa secreção de insulina nas células β -pancreáticas acrescida de alta secreção de glucagon nas α -pancreáticas, o aumento da produção de glicose no fígado, resistência à insulina e comprometimento na absorção da glicose nos tecidos, sendo esses fatores os responsáveis pelos principais sintomas e consequências da doença (PADHI; NAYAK; BEHERA, 2020). Pessoas com sobrepeso e obesidade possuem tendência a desenvolverem DMT2, uma vez que o excesso de tecido adiposo prejudica a sinalização e a sensibilidade da insulina (PAIM; DESCONSI; OLIVEIRA, 2022). A hiperglicemia decorrente de qualquer condição de DM pode favorecer o aparecimento de complicações associadas, sendo comuns os casos de neuropatia, retinopatia, cegueira, dificuldade na cicatrização de feridas, necrose, amputações e nefropatia (MUZY *et al.*, 2021).

O *diabetes mellitus* gestacional (DG), ou diabetes gestacional, é considerado pela literatura como intolerância à glicose iniciada durante a gravidez ou que tenha sido detectada durante o mesmo período (BUCHANAN; XIANG, 2005). Esse tipo de diabetes ocorre devido às alterações na produção hormonal durante a gravidez, podendo apresentar como consequência níveis reduzidos de sensibilidade à insulina prejudicando a absorção do

hormônio pelas células (PADHI; NAYAK; BEHERA, 2020). A gestante é diagnosticada com DG quando apresenta taxas de glicemia em jejum $\geq 92\text{mg/dL}$ no início da gestação, ou mesmo $\geq 92\text{mg/dL}$ entre 24 e 28 semanas, incluindo glicemia $\geq 180\text{mg/dL}$ após 1 hora ou $\geq 153\text{mg/dL}$ após 2 horas em jejum (MENDES *et al.*, 2019).

A literatura mostra que o ambiente intrauterino hiperglicêmico está relacionado ao desenvolvimento da doença em neonatos com baixo peso, sendo o peso contraposto por altos níveis de pró-insulina no sangue, remetendo ao possível desenvolvimento de diabetes ao longo da vida, demonstrando não somente o impacto na mãe, como também na prole (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019, ZHAO *et al.*, 2022).

Segundo a literatura, gestantes com idade a partir dos 35 anos possuem maior tendência ou predisposição ao DG em comparação as gestantes com idades inferiores (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Além disso, mães que desenvolvem DG possuem cerca de 30% de chances a mais de desencadear outros tipos de diabetes ou tolerância à glicose prejudicada após o parto em comparação às não acometidas pela condição. Estudos apontam ainda que o diabetes em genitores masculinos não interfere significativamente na prole, confirmado que o ambiente intrauterino alterado é o principal responsável por perturbações aos descendentes, sendo o papel do pai restrito à pré-disposição genética ao desenvolvimento da doença (JOVANOVIC; PETTITT, 2001).

Estudos anteriores reúnem informações sobre a relação entre DG e o desenvolvimento intrauterino de humanos e em modelos animais, discutindo que a condição possui impacto na programação metabólica da prole (URBONAITE *et al.*, 2022). Já é sabido que distúrbios no crescimento e desenvolvimento da prole durante a gestação podem permanecer e/ou desencadear perturbações no período pós-natal que podem ou não persistir até a vida adulta dos descendentes (NERI; EDLOW, 2016).

2.2 Ambiente intrauterino hiperglicêmico e desenvolvimento fetal

Os principais metabólitos essenciais para o início do desenvolvimento fetal são a glicose, o lactato e os aminoácidos (BAUER *et al.* 1998). A placenta é o órgão que faz a mediação nutricional entre mãe e feto, de modo que em condições de hiperglicemia materna, ocorre a transferência de altas taxas de glicose por difusão facilitada, favorecendo o surgimento de perturbações fetais (BAUER *et al.*, 1998, LIRA *et al.*, 2015, EDLOW *et al.*, 2019). Através das artérias espiraladas da placenta existe a interação de nutrientes e alguns anticorpos do sistema imune materno. Essa relação permite que o feto possua imunidade

passiva limitada. Entretanto, a exposição exagerada de anticorpos e citocinas no desenvolvimento intrauterino pode causar impactos negativos ao feto (BAYNES; THORPE, 1999, SCHOENWOLF *et al.*, 2009).

Durante o período gestacional em condição diabética, o metabolismo materno alterado e também rico em citocinas pró-inflamatórias através da placenta cria um ambiente hiperglicêmico e nocivo ao feto. Essa situação contribui para o surgimento de alterações metabólicas e complicações durante a gestação, comprometendo a interação saudável entre genitora e prole, podendo interferir no desenvolvimento normal do feto (CHALLIER *et al.*, 2006, BAR *et al.*, 2012, EDLOW *et al.*, 2019, SALVADORI; SILVA, 2022). A gestação, segundo a literatura, é considerada como um processo inflamatório natural devido a produção de citocinas e ativação de leucócitos. Contudo, a condição de DG nesse processo gera um agravamento dessa resposta tornando-a exagerada, o que acaba por levar possíveis consequências gestacionais ao feto (CHALLIER *et al.*, 2006). Além disso, a condição materna agrava a produção de radicais livres, sendo as maiores representantes as espécies reativas de oxigênio (ERO). Esse evento, comum nos diabéticos, promove a síntese de fatores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator nuclear-kappa beta (NF- $\kappa\beta$) através do estresse oxidativo. Esses fatores contribuem para o comprometimento de vias de sinalização, atividade enzimática, funcionalidade de proteínas celulares e fatores de transcrição (BAYNES; THORPE, 1999), afetando o desenvolvimento fetal.

Estudos já demonstraram algumas das consequências geradas pelo DG à prole (Figura 1), tais como influência negativa no desenvolvimento cerebral, tendências ao espectro autista, déficits cognitivos, transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), problemas cardiovasculares, tendência aumentada a desenvolver *diabetes mellitus* e/ou algum nível de intolerância à glicose na vida adulta, além de maior pré-disposição à obesidade (Figura 1) (SKOGEN; ØVERLAND, 2012, PEREIRA *et al.*, 2014, LIRA *et al.*, 2015, EDLOW *et al.*, 2019).

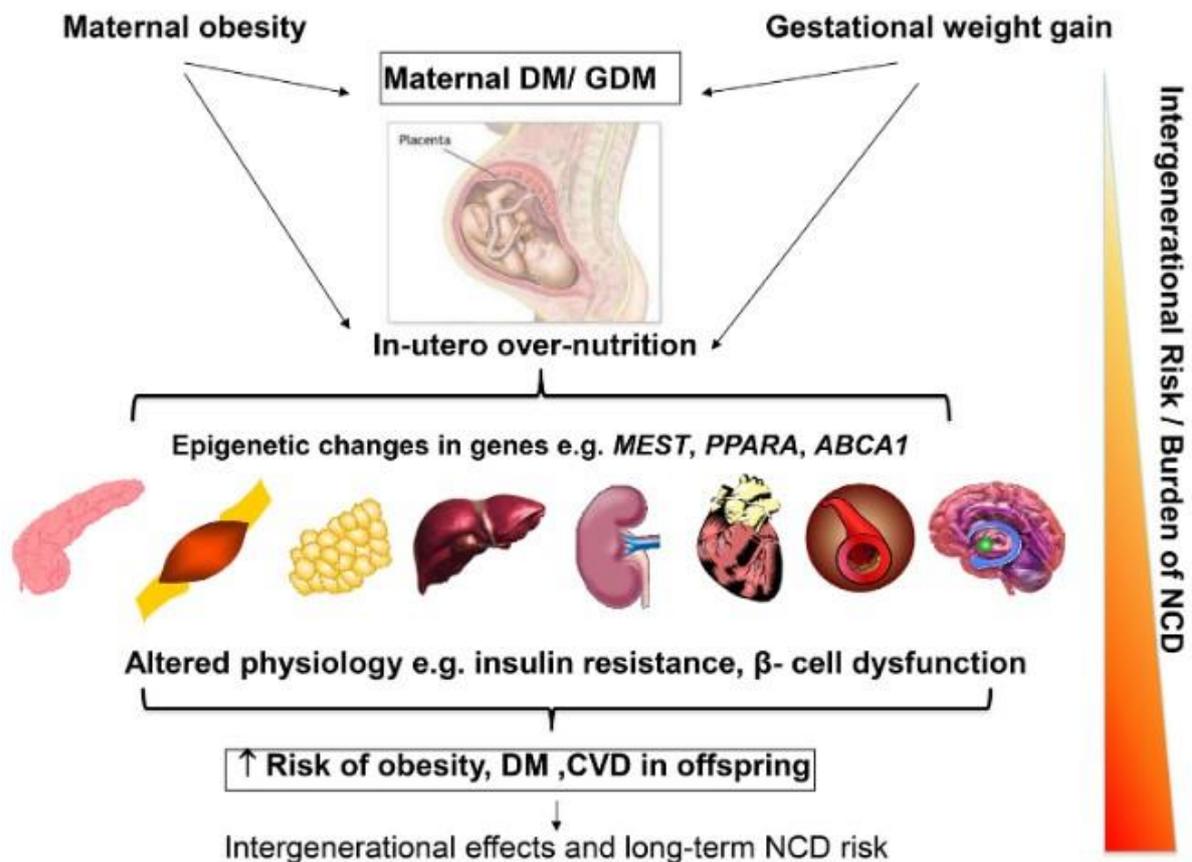


Figura 1 – Diabetes gestacional: Imagem representando as possibilidades de danos à prole pela gestação em condição diabética. O meio ambiente hiperglicêmico contribui com altos índices de glicose, favorecendo o aparecimento de alterações epigenéticas que contribuem para maiores chances de a prole desenvolver resistência à insulina e disfunção de células β -pancreáticas. Fonte: (MA *et al.*, 2015).

Recentemente, tem se observado intenso esforço dedicado à busca por respostas para demonstrar o impacto dos altos níveis de glicose na próstata de ratos. Assim, foi demonstrado que altas concentrações de glicose altera o desenvolvimento da próstata nos primeiros dias da vida pós-natal, incluindo alterações na sinalização celular essenciais para a formação ideal da glândula (CASSIMIRO *et al.*, 2020). Outros estudos demonstraram o efeito do diabetes gestacional na próstata da prole púbere e adulta, apontando além de perturbações metabólicas e hormonais, maior proliferação celular, maior atividade de metaloprotease de matriz 2 (MMP-2) associada à menor distribuição de colágeno (DAMASCENO *et al.*, 2014) e redução da expressão de receptores de andrógenos (AR) (DAMASCENO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014). Tais resultados reforçam o efeito negativo do DG no desenvolvimento tanto do parênquima quanto do estroma da próstata da prole.

2.3 Próstata e regulação androgênica

A próstata é um órgão acessório do sistema reprodutor masculino que está presente apenas nos mamíferos placentários, sendo encontrada abaixo da bexiga em volta à uretra (KIERSZENBAUM, 2008, PAWLINA, 2021). Dentre as principais funções exercidas pelo órgão, destacam-se a função secretora e sua participação na ejaculação pela secreção de conteúdo rico em zinco (Zn) com pH alcalino, sendo este importante na neutralização do ácido vaginal e fornece nutrientes que irão auxiliar no transporte dos espermatozoides pela uretra prostática (KIERSZENBAUM, 2008, AARESTRUP, 2012). A glândula é dividida em duas partes estruturais e funcionais, o parênquima e o estroma. O parênquima é formado por tecido epitelial glandular que se forma a partir do crescimento do endoderma do seio urogenital, já o estroma corresponde ao seu tecido conjuntivo e muscular, se originando a partir do mesoderma visceral (MIOTTI; MOLLERACH; BARQUEZ, 2017, FRANCIS; SWAIN, 2018).

A próstata humana adulta é classificada em 3 zonas, de acordo com um estudo anatômico detalhado e descritivo feito por McNeal (1968), designadas de periférica, transição e central. A zona periférica é a maior delas e o sítio de maior incidência de câncer, enquanto a hiperplasia benigna da próstata acomete mais a zona de transição (Figura 2A). A próstata de roedores possui classificação anatômica distinta à humana. A próstata destes animais é subdividida em 4 pares de lobos, chamados de ventral, lateral, dorsal e anterior na qual a uretra é o ponto de referência para a distinção entre eles. Os lobos apresentam diferenças morfológicas, resposta androgênica e padrão de secreção (FRANCIS; SWAIN, 2018). Embora a morfologia prostática humana e de roedores apresente distinções, o modelo experimental envolvendo esse grupo de animais tem se mostrado de satisfatória fidelidade devido as semelhanças fisiológicas ao se comparar ao modelo humano (RISBRIDGER; ALMAHBOBI; TAYLOR, 2005) (Figura 2C).

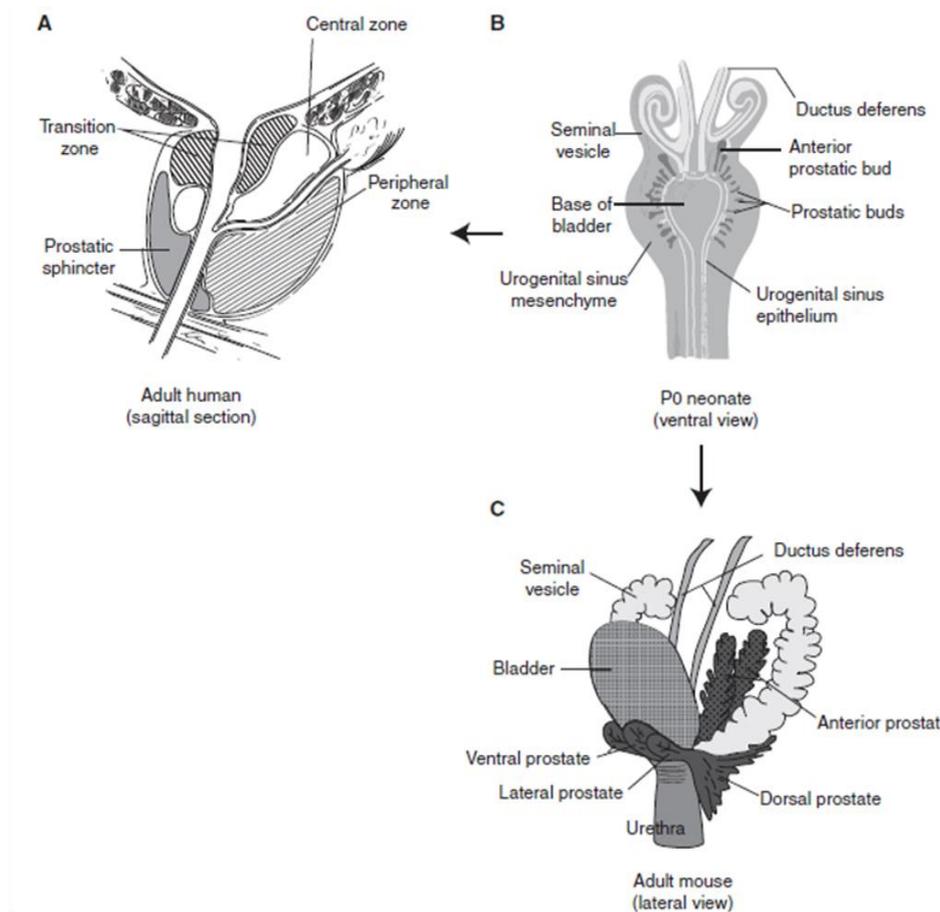


Figura 2 – Próstata: Esquema ilustrando a anatomia da próstata humana (A) e de roedores (B, C). A- Em humanos a próstata é compacta e classificada em zonas: periférica, central e transição. Em roedores ela se desenvolve na vida intrauterina a partir do seio urogenital. Em B temos um esquema da próstata de roedor no dia pós-natal 0 mostrando os brotos acinares que crescem como cordões em volta da uretra, na base da bexiga, em direção ao mesênquima do seio urogenital. C- Na fase adulta, a próstata de roedor apresenta 4 pares de lobos, nomeados de acordo com a sua posição em relação à uretra, em ventral, lateral, dorsal e anterior. Fonte: (FRANCIS; SWAIN, 2018).

Histologicamente, a próstata humana e de roedores é uma glândula túbulo-alveolar contendo ductos pseudoestratificados prismáticos (HAYWARD; CUNHA, 2000, KIERSZENBAUM, 2008). O epitélio secretor é composto de células luminiais responsáveis pela secreção da glândula e que margeiam o lúmen onde tal secreção fica armazenada. As células luminiais se apoiam em células basais que são fonte de renovação do epitélio e entre elas, escassas células neuroendócrinas de função ainda desconhecida podem ser encontradas (HAYWARD *et al*, 1996).

O estroma fibromuscular é situado adjacente à lâmina basal dos ácinos. Esse estroma é composto de fibroblastos, células musculares lisas e uma matriz extracelular rica em fibras colágenas que se interpõem os ácinos secretores. Outros elementos estromais incluem células endoteliais, fibras nervosas autônomas e gânglios associados e células imunológicas

(BARRON; ROWLEY 2012). Na matriz extracelular do estroma prostático existem metaloproteases (MMPs), que atuam de formas diversas na regulação estromal. Essas MMPs são proteínas conhecidas por degradar colágeno e vários outros constituintes da matriz extracelular (MEC), exercendo função modeladora da arquitetura tecidual. Sua atividade é extremamente dependente de íons metálicos para sua função catalítica, tendo o zinco (Zn) como seu principal dependente. Quando não ativas, estão presentes em forma de zimógenos (pró-MMP), as quais permanecem em estado de latência até serem ativadas (LAGENTE *et al.*, 2005). A MMP-2, um subtipo de metaloprotease é uma molécula de suma importância no desenvolvimento inicial da próstata. Estudos envolvendo o seu silenciamento demonstraram que, em sua ausência, há inibição *in vitro* na morfogênese do lobo ventral da próstata de roedores, gerando perturbação que impactam na ramificação epitelial, o que reforça a importância da MMP-2 na ideal formação da glândula (BRUNI-CARDOSO *et al.*, 2010).

Ainda no estroma, outro componente protagonista no desenvolvimento da próstata é o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Dentre suas diversas funções na homeostase celular e tecidual, destaca-se seu papel na regulação da produção do estroma prostático pela secreção de componentes da MEC. Dentre estes elementos, está a deposição de colágeno e diferenciação da musculatura lisa (GILBERT; BARRESI, 2019). Essa citocina também é importante no desenvolvimento prostático, atuando na adesão, migração e angiogênese, sendo coadjuvante em diversos processos morfogênicos da glândula (CHAMBAZ *et al.*, 1996, CARDILLO *et al.*, 2000). Outras fontes complementam que o TGF- β está presente tanto em células acinares quanto estromais, atuando na inibição da proliferação das células do estroma prostático, garantindo que haja a ideal manutenção e diferenciação dos componentes celulares da glândula, como miofibroblastos e, já citadas, células da musculatura lisa, evitando que haja um crescimento descontrolado (HISATAKI *et al.*, 2003).

A próstata possui suas funções reguladas por andrógenos, desde o desenvolvimento intrauterino quanto pós-natal. Esses hormônios ativam os receptores de andrógenos (ARs). A estimulação da glândula por hormônios androgênicos se faz de suma importância para seu ideal funcionamento, sendo desde a morfogênese, ramificação, canalização e citodiferenciação são estimuladas por essas moléculas (HAYWARD; CUNHA, 2000). Na próstata, o principal hormônio androgênico é a 5 α -dihidrotestosterona (DHT), produzida através da testosterona testicular pela enzima 5 α -redutase (Figura 3A). A DHT ativa o AR que desencadeia a sinalização para o interior da célula até o núcleo, em que a síntese de mRNA é

ativada e ocorre a síntese de proteínas secretoras. Essas proteínas produzidas no citoplasma são secretadas para o lúmen prostático a partir de impulsos neurológicos desencadeados por comandos neurológicos durante o processo de ejaculação (FRICK; AULITZKY, 1991).

Durante o desenvolvimento prostático e na próstata adulta, os AR têm papel fundamental na regulação da relação epitélio-estroma. A musculatura lisa expressa AR que, ao ativado, regula o crescimento totalmente diferenciado do epitélio a partir de fatores de crescimento (FRICK; AULITZKY, 1991, HAYWARD; CUNHA, 2000). A formação da glândula é dependente da função dos andrógenos, sendo que estes regulam a proliferação, diferenciação, manutenção, maturação e diferenciação das células epiteliais e estromais do órgão (ARCOLINO *et al.*, 2010).

As células prostáticas recebem forte estimulação por esta via, visto que a partir da ativação dos AR, as células epiteliais do lúmen iniciam a cascata de sinalização permitindo a síntese de conteúdo da secreção prostática (Figura 3A,B), como por exemplo, o antígeno prostático específico (PSA), sendo este um alvo muito utilizado na busca por patologias na glândula (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986, GAO; ISAACS, 1998, ARCOLINO *et al.*, 2010). A proliferação e sobrevivência de células do epitélio dos ácinos é também controlada por estimulação androgênica através da mediação estromal (Figura 3B). As células estromais da próstata produzem fatores de crescimento que auxiliam na modelação da matriz extracelular e no desenvolvimento do parênquima, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF). Outros hormônios como os estrógenos também possuem função reguladora do metabolismo da próstata, atuando na ideal fisiologia da glândula, desenvolvimento e maturação (CLEUTJENS *et al.*, 1997, UZGARE; XU; ISAACS, 2003; D'ANTONIO; GRIEND; ISAACS, 2009).

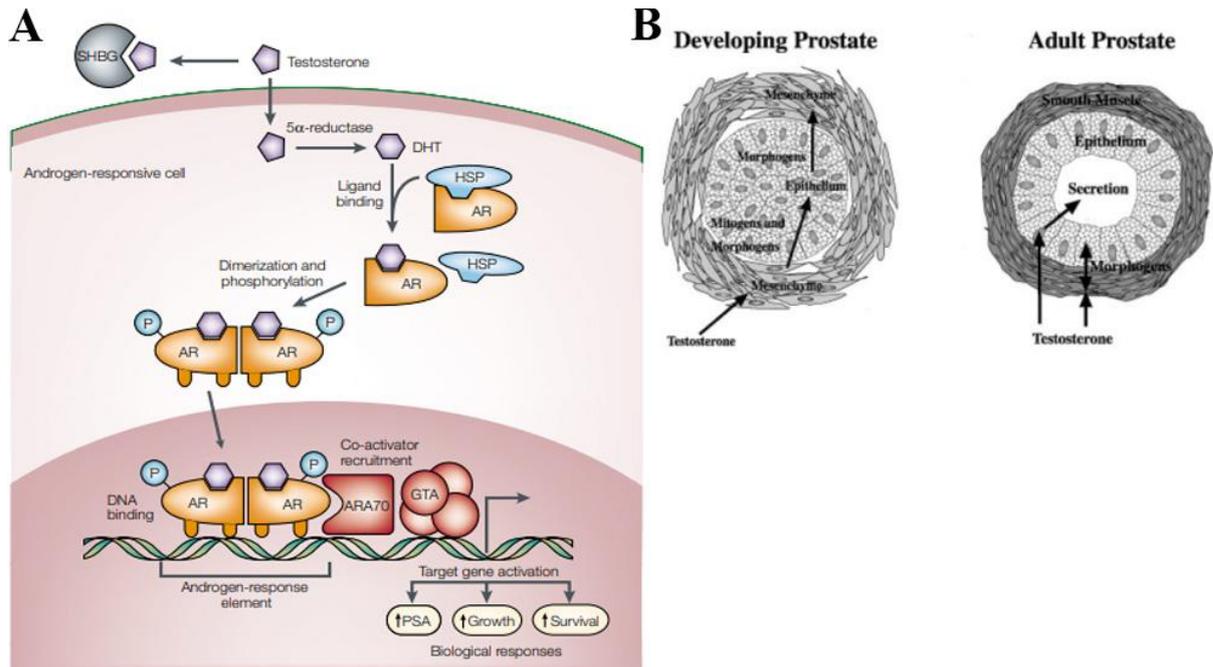


Figura 3 – Mecanismo de sinalização androgênica na próstata via receptor de andrógeno (AR). **A:** Na próstata, a testosterona é convertida em diidrotestosterona (DHT) pela 5- α -redutase. A DHT se liga aos AR no citoplasma, ocorrendo dimerização e translocação para o núcleo. No núcleo o AR atua como cofator da transcrição de genes que levam a transcrição na glândula, bem como diferenciação e sobrevivência das células epiteliais. **B:** Na interação epitélio-estroma a testosterona age também em AR das células estromais que produzem sinais parácrinos de atuação nas células epiteliais estimulando a proliferação e diferenciação celular, tanto no desenvolvimento quanto na próstata adulta. Fonte: (adaptado de FELDMAN; FELDMAN, 2001, CUNHA; HAYWARD; WANG, 2002).

2.4 Desenvolvimento da próstata

O desenvolvimento inicial da próstata se inicia na vida intrauterina por volta do 17º dia de gestação em ratos, e se torna completo somente na puberdade, etapa em que ocorre sua completa maturação (FRANCIS; SWAIN, 2018). Como já citado, a glândula inicia seu desenvolvimento no seio urogenital, a partir do qual as células endodérmicas envaginam, formando brotos, que penetram no mesênquima circundante em diversas direções (OLIVEIRA *et al.*, 2016) que crescem a partir da vida pós-natal. Durante a vida intrauterina, a próstata se desenvolve a partir da mediação de andrógenos testiculares, sendo estes responsáveis pelos processos de diferenciação dos brotos epiteliais e estrutura dos ductos secretores. Esses andrógenos possuem atuação no mesênquima, responsável pela mediação entre epitélio-estroma, também atuando na regulação do crescimento e diferenciação celular (HAYWARD; CUNHA, 2000).

O desenvolvimento pós-natal é marcado por intenso crescimento epitelial, ramificação e canalização dos brotos epiteliais (SUGIMURA; CUNHA; DONJACOUR, 1986). Vilamaior, Taboga e Carvalho (2006) já descrevem que o desenvolvimento inicial da glândula possui crescimento marcado por abundante atividade proliferativa, acrescido de aumento do

peso prostático, sendo procedido por um período de repouso entre a 4ª e a 6ª semana de vida pós-natal, em que o aumento da próstata é considerado proporcional ao aumento corporal. O crescimento se torna novamente abundante após a 7ª semana e perpetua até a fase adulta. Durante esse processo, quaisquer alterações metabólicas e/ou hormonais ocorridas podem permitir que haja perturbações no funcionamento da glândula.

Segundo a literatura, o brotamento prostático possui início na vida pré-natal, e começa a partir da uretra em direção às extremidades da glândula, permitindo que haja a separação da próstata em lobos. Ao nascimento, os brotos se alongam em direção ao estroma e começam a bifurcar, formar ramos laterais e também a canalizar (BRUNI-CARDOSO; CARVALHO 2007). O desenvolvimento inicial da glândula é mediado principalmente por hormônios androgênicos e sua morfogênese adulta possui início na puberdade, quando os níveis de circulação de andrógenos é significativamente aumentado, tendo como marco inicial a ramificação da glândula (MCNEAL, 1980, HAYWARD; CUNHA, 2000). A ramificação possui início nos ductos primários próximos à uretra, ponto de partida da formação dos ramos. As células epiteliais das pontas dos ramos da glândula são células com grande potencial metabólico, possuindo altas taxas de síntese de DNA, RNA e proteínas. Já as células proximais, ou seja, mais próximas à uretra, possuem menor atividade proliferativa (LEE; HOLLAND, 1987).

Durante o desenvolvimento, a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR possui diversas funções na morfogênese da glândula. O brotamento, crescimento e ramificação prostática são algumas de suas principais funções devido ao seu papel no controle da quiescência e proliferação celular. A ativação dessa via é importante na ação da invasão dos ductos epiteliais prostáticos no mesênquima durante o início da formação da glândula, além de contribuir no alongamento do ducto durante sua morfogênese pós-natal (GHOSH *et al.*, 2011). Outra via de sinalização que participa ativamente no desenvolvimento prostático é a família das MAP quinases, também conhecidas como quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (RUBINFELD; SEGER, 2005). Dentre inúmeras possibilidades da cascata da via MAPK, destaca-se a via ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular), sendo esta responsável por diversas funções reguladoras da proliferação, adesão, diferenciação, sobrevivência e senescência celular, participando também do metabolismo, transcrição de genes e também nos processos de morte celular por apoptose. Essa via é ativada por fosforilação nas regiões serina/treonina quinase, possuindo afinidade com grupos de fosfatases proteicas, possibilitando que a fosforilação e desfosforilação da via MAPK/ERK

seja um processo reversível (ROSKOSKI, 2012). Vias como AKT e ERK1/2 são essenciais na formação dos brotos e na morfogênese inicial da glândula (RUBINFELD; SEGER, 2005, ROSKOSKI, 2012).

A canalização é um evento importante durante a morfogênese da próstata. A formação de canais em órgãos tubulares é resultante da atividade coordenada de células, onde a apoptose é a principal envolvida na eliminação das células para a canalização. A apoptose é um tipo de morte celular programada com envolvimento de proteases citoplasmáticas, chamadas caspases. Na via intrínseca do processo de apoptose, diferentes sinalizações atingem a membrana mitocondrial, havendo consequente liberação de citocromo c presente no espaço intermembrana da organela. O citocromo c interage com Apaf1 (fator 1 de ativação da protease apoptótica), que desencadeará a ativação da pró-caspase 9, iniciando uma cascata de amplificação de caspases efetoras, dentre elas caspase-3. A partir da caspase-3, ocorre a ativação irreversível de morte celular através da clivagem e destruição do arcabouço proteico celular, incluindo núcleo e citoesqueleto (PORTT *et al.*, 2011, JAN; CHAUDHRY, 2019). O processo de apoptose é de suma importância para a formação inicial da próstata. Essa etapa do desenvolvimento já é conhecida na literatura, sendo que o processo ocorre a partir da ativação da morte celular, que elimina as células do interior do broto, permitindo que haja a canalização dos ductos e também a formação do lúmen da próstata (BRUNI-CARDOSO; CARVALHO, 2007).

Durante a diferenciação do parênquima e do estroma da glândula, um mediador chave nessa interação é a musculatura lisa. Segundo a literatura, a ativação dos AR do mesênquima urogenital (UGM) pelos andrógenos desencadeia os primeiros estímulos de proliferação epitelial, formação de ductos e diferenciações celulares da próstata, permitindo sua organização inicial. O músculo liso, localizado ao redor dos brotos, possui como uma de suas funções a mediação epitélio-estroma, de modo que um não se desenvolve sem o outro (HAYWARD; CUNHA, 2000).

Para se compreender os impactos da hiperglicemia crônica causada pelo diabetes materno, faz-se necessário o estudo da interação e das vias de sinalização atuantes no desenvolvimento inicial da próstata.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da hiperglicemia causada pela indução do *diabetes mellitus* gestacional na próstata de descendentes em fase neonatal e pré-pubere.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar os níveis de testosterona dos filhotes pré-puberes desenvolvidos sob condição hiperglicêmica.
- Avaliar as consequências morfológicas do diabetes gestacional no desenvolvimento prostático de proles com 7 e 30 dias pós-natais;
- Quantificar as taxas de proliferação celular e apoptose;
- Estudar a influência do diabetes gestacional na expressão de TGF- β ; α -actina de músculo liso, metaloprotease de matriz 2 (MMP-2) e na deposição de colágeno no estroma glandular das próstatas dos ratos descendentes;
- Analisar a fosforilação de AKT e ERK1/2, relacionando sua expressão com a os níveis de proliferação celular;

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Indução do diabetes gestacional e eutanásia

Ratos *Wistar* machos e fêmeas foram mantidos sob temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo claro-escuro (12 horas), com livre acesso a água e ração sólida em grãos (Purina) na Rede de Biotério de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) para fins de acasalamento (Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais CEUA/UFU; Protocolo 056/18). A prenhez em ratas foi identificada por esfregaço vaginal no qual a presença de espermatozóides foi considerada como primeiro dia de gestação.

As ratas prenhas foram aleatoriamente separadas em grupo controle e grupo de indução de diabetes gestacional. As fêmeas do grupo controle ($n=12$) receberam injeção intraperitoneal de solução tampão citrato (0,01M e pH 4,5). No mesmo período, o grupo diabético ($n=11$) recebeu injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ) na quantidade de 50mg/kg (Santa Cruz Biotechnologies®) diluída em tampão citrato (0,01M e pH 4,5), tendo acesso a glicose a 15% diluída em água por 24 horas. Ambas administrações foram feitas no quinto dia de gestação, sendo escolhido este dia para evitar aborto espontâneo devido ao estresse causado pela STZ. A glicemia foi avaliada diariamente por tiras e glicosímetro (Contour Plus®). Ratas prenhas com glicemia de jejum ≥ 200 mg/dL foram consideradas diabéticas.

Ao nascer, os filhotes machos foram eutanasiados aos 7 e 30 dias de idade e os grupos foram denominados PC7 ($n=15$) e PC30 ($n=10$) filhos de mães normais; PD7 ($n=17$) e PD30 ($n=10$) filhos de mães diabéticas. Os filhotes foram eutanasiados seguindo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), por overdose de Quetamina (Zetnil®) e Cloridrato de Xilazina 2% (Zetnil®) na proporção de 1:1 (0,2 mL/100g) por via i.p. (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008). O peso corporal e da próstata foram avaliados no momento da eutanásia, bem como os níveis de glicose no sangue.

4.2 Análise morfológica

A próstata de todos os grupos ($n=5$ /grupo) foi fixada por imersão em solução de Metacarn (60% metanol (CH_3OH), 30% clorofórmio (CHCl_3) e 10% ácido acético (CH_3COOH) por 3 horas sob refrigeração a 4°C . Após a fixação, o tecido foi desidratado passando por bateria de álcool etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), sendo 30 minutos em cada álcool (70%, 80%, 90% e três 100%). Os tecidos foram clarificados em imersão em xilol seguido de infiltração e inclusão em parafina. A próstata de PC7 e PD7 foi seccionada ($4\mu\text{m}$)

seriadamente em um micrótomo rotativo (Leica), selecionando uma secção e descartando as próximas seis, até que toda a próstata fosse seccionada. A próstata de PC30 e PD30 não foi seccionada em série. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para estudos de histoarquitetura geral e Picosirius - hematoxilina para caracterização da deposição de colágeno.

Nos grupos de 7 dias de idade, os cortes equatoriais da próstata corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) foram usados para avaliar o número de brotos prostáticos. Para isso, foi utilizada a lâmina número 10 dos cortes histológicos seriados para todos os grupos, que representa aproximadamente o meio da próstata em corte transversal equatorial. Neste corte histológico, foi contado o número total de brotos acinares ($n = 5$ animais/grupo).

Nos grupos de 30 dias de idade, lâminas H&E foram utilizadas para análise estereológica para avaliar a frequência relativa do epitélio, lúmen e estroma da próstata usando o método Weibel de contagem de pontos (WEIBEL, 1974), que consiste da aplicação de um retículo contendo 100 pontos sobre a imagem histológica, com auxílio do software IMAGE J (National Institute of Health, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij>). Cada ponto que se sobrepôs ao epitélio, lúmen ou estroma foi contado e os dados foram expressos como uma porcentagem da área total (frequência relativa). Esta análise histológica foi realizada na próstata de cinco animais/grupo, 10 imagens por corte.

A distribuição de colágeno foi quantificada em todos os grupos usando imagens de próstata coradas com Picosirius-hematoxilina ($n=5$; 10 imagens/corte). A quantificação foi realizada com contraste aprimorado e a ferramenta de limiar limite do software IMAGE J (National Institute of Health, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij>). Assim, a densidade integrada de pixels foi medida sistematicamente como uma porcentagem da área rotulada.

4.3 Imunohistoquímica

Cortes histológicas em parafina da próstata de todos os grupos foram usados para análise imuno-histoquímica. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato de sódio pH 6,0 a 90°C por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% em solução de metanol para bloquear a peroxidase endógena. Para bloqueio de interações proteicas inespecíficas, foram incubadas com albumina de soro bovino (BSA) 5% diluída em tampão Tris salino com Tween 20 (TBST) por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários: α -actina de músculo liso de camundongo (sc-32251, Santa Cruz Biotechnology) e antígeno de proliferação nuclear de camundongo (PCNA; sc-56, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:100 em 1% BSA, durante a noite.

Os complexos antígeno-anticorpo foram detectados pelo sistema anti-polímero de camundongo (Biocare®) seguido de reação/coloração DAB (Biocare®) e contracoloração de hematoxilina (por 8 segundos).

Os cortes histológicos foram digitalizados usando o Scanner de lâminas com software Aperio ImageScope 12.4.6 (Leica Biosystems®) e capturadas com ampliação de 40X. 15 áreas de imagem foram analisadas por corte histológico, 5 animais/grupo. A frequência relativa de células musculares lisas foi determinada usando o método de Weibel descrito anteriormente (WEIBEL, 1974). As células positivas para PCNA foram contadas visualmente com ampliação de 40X. O índice de proliferação foi calculado como o número de núcleos positivos para PCNA dividido pelo total de núcleos celulares e expresso como uma porcentagem (frequência relativa de células positivas para PCNA).

4.4 Western blotting

Análises de *Western blotting* foram realizadas em todos os grupos, mas para as próstatas do dia 7 cada amostra (n = 4 por grupo) foi composta por um pool de 3-4 próstatas. Os tecidos da próstata foram homogeneizados em tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA *buffer* - R0278, Sigma Aldrich®) com inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail - Sigma Aldrich - P8340® (contendo AEBSF 104 mM, Aprotinina 80 µM, Bestatina 4 mM, E64 1.4 mM, Leupeptina 2 mM and Pepstatina A 1.5 mM)). O homogeneizado foi centrifugado a 18800g a 4°C por 20 minutos e a proteína foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, alíquotas contendo 15µg de proteína foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida TRIS-glicina 10 ou 12% e eletrotransferidas sobre membranas de nitrocelulose. Os sítios de ligação de proteínas inespecíficas foram bloqueados com BSA 5% diluída em TBST a 0,2% por 60 minutos em temperatura ambiente.

As membranas foram incubadas durante a noite (4°C) com os anticorpos primários coelho anti-pERK; coelho anti-ERK 1/2; coelho anti-pAKT; anti-AKT pan de camundongo; coelho anti-MMP2; coelho anti-β-actina (Tabela 1). As membranas foram incubadas com anticorpos secundários, por 1 hora, em temperatura ambiente diluídos a 1:5000 em BSA 3% com TBST (anti-camundongo HRP sc516102 ou anti-coelho HRP L3012 Signal Antibody). Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit de detecção ECL (GE HealthCare®) e a quimioluminescência foi detectada em um fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences®). As bandas de proteína foram quantificadas pelo software Image J (versão 1.34; Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute

of Health, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij>). Os valores de densitometria de ERK 1/2 e AKT fosforiladas foram normalizados em relação ao total de ERK 1/2 e AKT pan respectivamente. Os valores de densitometria de MMP2 foram normalizados em relação a β -actina.

Tabela 1 – Anticorpos primários utilizados no ensaio de *Western blotting*.

ANTICORPOS	DILUIÇÃO (anticorpo/BSA 3%)	MARCA	CÓDIGO
Coelho anti-pERK1/2	1:900	Cell Signaling	#4370
Coelho anti-ERK1/2	1:800	Cell Signaling	#9102
Coelho anti-pAKT	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc135651
Anti-AKT pan de camundongo	1:1000	Cell Signaling	#2920
Coelho anti-MMP-2	1:500	Cell Signaling	#87809
Coelho anti- β -actina	1:300	Santa Cruz Biotechnology	sc130656

4.5 Avaliação de apoptose

A apoptose foi avaliada em amostras de próstata pelo kit EnzCheck Caspase-3 Assay (Thermo Fisher®), que quantifica os níveis de caspase-3 em sua forma ativa. O conteúdo de caspase-3 foi expresso como intensidade de fluorescência normalizada pela concentração de proteína em cada amostra. Para cada grupo experimental, foram usadas 5 amostras, no qual em 7 dias, cada uma continha um pool de 3 a 4 próstatas, já em 30 dias, 1 próstata = 1 indivíduo. As amostras foram homogeneizadas em tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA *buffer* - R0278, Sigma Aldrich®) com inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail - Sigma Aldrich - P8340 (contendo AEBSF 104 mM, Aprotinina 80 μ M, Bestatina 4 mM, E64 1.4 mM, Leupeptina 2 mM and Pepstatina A 1.5 mM)) utilizando-se o protocolo de extração de proteínas previamente descrito para *Western blotting*. As amostras de proteína foram diluídas 20X em tampão reagente e incubadas por 30 minutos em uma microplaca escura de 96 poços em triplicata. A fluorescência (excitação/emissão 342/441 nm) foi medida em um fluorímetro de microplacas.

4.6 Quantificação de TGF- β por ELISA

A detecção de TGF- β na forma ativa foi avaliada usando o kit ELISA humano/camundongo TGF- β 1 Uncoated (#88-8350 Invitrogen®), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Foram utilizados 20 μ L de amostra em duplicata para cada

homogeneizado (n=5 por grupo). Resumidamente, as amostras foram adicionadas à placa de ELISA previamente revestida com MAB murino anti-TGF- β 1. Em seguida, foram adicionados o anticorpo de detecção biotilado e, posteriormente, o complexo avidina-HRP. Finalmente, a placa foi lavada e a imunorreação foi revelada pelo substrato tetrametilbenzidina (TMB). A atividade do TMB foi interrompida pela incubação com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M por 15 minutos. A intensidade da cor foi medida a 450 nm no espectrofotômetro de microplaca e o limite de detecção foi de 8-1000 pg/mL. Para esta abordagem, a próstata com 7 dias de idade foi analisada e cada amostra (n = 5 por grupo) foi composta por um pool de 3-4 próstatas e as próstatas com 30 dias (n = 5 por grupo), sendo 1 amostra = 1 próstata.

4.7 Dosagem de testosterona

A dosagem de testosterona foi realizada com o kit Testosterone ELISA (Cayman® 582701), de modo que a detecção foi realizada por captura sanduíche (anticorpo-antígeno-anticorpo), seguindo as instruções do fabricante. O experimento foi realizado com amostras de plasma (coletado a partir do sangue centrifugado sob refrigeração a 4°C a 1500g por 5 minutos - sobrenadante) de ratos com 30 dias de idade (PC30 - n=5 e PD30 - n=5). O ensaio foi baseado em uma reação de competição entre a testosterona da amostra e a testosterona conjugada com acetilcolinesterase (AChE - Testosterone Tracer) e realizada de acordo com as instruções do fabricante. A sensibilidade mínima do teste foi de 6pg/mL. Com o auxílio de um espectrofotômetro de microplaca, foi verificada a quantidade de testosterona pelo comprimento de onda de 412nm.

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism® (software GraphPad Prism, v.5.0). Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student não pareado. Nos casos em que as amostras não passaram no teste de normalidade, foram utilizados o teste não paramétrico de Mann-Whitney e o teste t de Student com correção de Welch.

5.0 RESULTADOS

5.1 Diabetes gestacional reduz o peso corporal e da próstata na prole

Quando observados os dados maternos, observou-se que as ratas diabéticas ganharam menos peso durante o período gestacional ao comparadas às mães controle em mesmo período, e em contrapartida, os níveis glicêmicos, assim como esperado, são elevados devido ao *diabetes mellitus* induzido (Tabela 2).

Quanto aos filhotes, houve uma redução notável no peso corporal da prole de mães diabéticas em ambas as idades estudadas. O grupo PD7 teve uma redução de aproximadamente 30% no peso corporal médio em comparação com o grupo controle. Esse efeito também foi observado no grupo de 30 dias, que apresentou redução de 28% no peso corporal médio em relação ao controle (Tabela 3). Considerando o peso da próstata, embora não tenha havido diferença nos filhotes de 7 dias, foi encontrado redução de aproximadamente 42% no grupo PD30 em relação ao seu controle, demonstrando que o diabetes gestacional interferiu no peso corporal e no peso da glândula da prole (Tabela 3).

Tabela 2 - Parâmetros biométricos e glicêmicos das mães saudáveis (PC) ou diabéticas (PD) em períodos pré-gestacional, gestação no 17º dia e pré-gestacional ao parto.

<i>PERÍODO</i>	<i>PARÂMETRO</i>	<i>MÃES CONTROLE</i>	<i>MÃES DIABÉTICAS</i>
<i>Pré-gestacional</i>	Peso corporal (g)	202 ± 18	212 ± 33
	Glicemia (mg/dL)	87 ± 13	79 ± 9
<i>Dia gestacional 17</i>	Peso Corporal (g)	285 ± 39	369 ± 30
	Glicemia (mg/dL)	79 ± 15	361 ± 94*
<i>Pré-gestacional ao Parto</i>	Ganho de peso (g)	82 ± 34	57 ± 18*

*p<0,05 em relação ao respectivo controle.

Os níveis de testosterona plasmáticos não foram alterados no grupo PD30, conforme demonstrado na Tabela 2. Da mesma forma, o índice glicêmico da prole aos 7 e 30 dias não foi alterado pelo diabetes gestacional (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros biométricos, metabólicos e hormonais da prole de ratos de mães normais (PC) ou diabéticas (PD) aos 7 ou 30 dias de idade.

GRUPO	NÍVEIS DE TESTOSTERONA (pg/mL)	GLICEMIAS (mg/dL)	PESO CORPORAL (g)	PESO DA PRÓSTATA (g)
PC7	--	113 ± 14	15,3 ± 1,4	0,019 ± 0,004
PD7	--	114 ± 17	10,7 ± 2,7*	0,018 ± 0,005
PC30	439 ± 51,7	121 ± 25	100,9 ± 7,4	0,17 ± 0,02
PD30	557 ± 189	113 ± 19	72,6 ± 31,3*	0,095 ± 0,04*

*p<0,05 em relação ao respectivo controle.

5.2 O desenvolvimento pós-natal da próstata é afetado pelo diabetes gestacional

A ramificação da glândula foi avaliada por meio da quantificação de brotos acinares aos 7 dias pós-natal. Verificou-se que, embora o número de brotos não tenha mudado, houve uma redução significativa de 57% de brotos com canalização iniciada. Assim, houve atraso no processo de canalização causado pelo diabetes gestacional (Figura 4 A, B, C, D, I).

Em filhotes com 30 dias de idade, notou-se redução de 25% da frequência relativa do epitélio secretor e de 38% do estroma da glândula (Figura 4, E, F, G, H, J). Adicionalmente, notou-se um aumento significativo de 130% na área do lúmen prostático em PD30 em relação a PC30, demonstrando que o diabetes gestacional interferiu tanto no parênquima prostático quanto no estroma alterando a histoarquitetura esperada da glândula (Figura 4E, F, G, H, J).

5.3 A proliferação celular é reduzida em associação com fosforilação ERK1/2 prejudicada em descendentes neonatais de ratas diabéticas

Houve uma redução de 15% no número de células PCNA-positivas em PD7, demonstrando uma diminuição na proliferação celular na próstata neonatal (Figura 5A, B, E). No grupo PD30, apenas as células estromais tiveram a proliferação celular reduzida pelo diabetes gestacional (Figura 5C, D, E).

Na tentativa de encontrar os mecanismos relacionados à redução da proliferação celular, 2 importantes vias de sinalização foram avaliadas: AKT e ERK1/2. O ensaio de *Western blotting* para ativação de AKT não mostrou alteração nos grupos PD7 ou PD30 (Figura 6A, B). Por outro lado, a via ERK 1/2 exibiu uma diminuição nos níveis de fosforilação no grupo PD7 em comparação ao controle. Não houve diferença na fosforilação de ERK1/2 entre os grupos de 30 dias (Figura 6A, B).

5.4 O diabetes gestacional reduziu a ativação da caspase-3 na prole neonatal

A partir da análise da morte celular, observou-se uma redução significativa de 32% nos níveis de ativação da caspase-3 no grupo PD7 em relação ao seu controle, o que representa diminuição de apoptose neste grupo. Com relação aos ratos de 30 dias de idade, não houve diferença entre os grupos, conforme mostra a Figura 7.

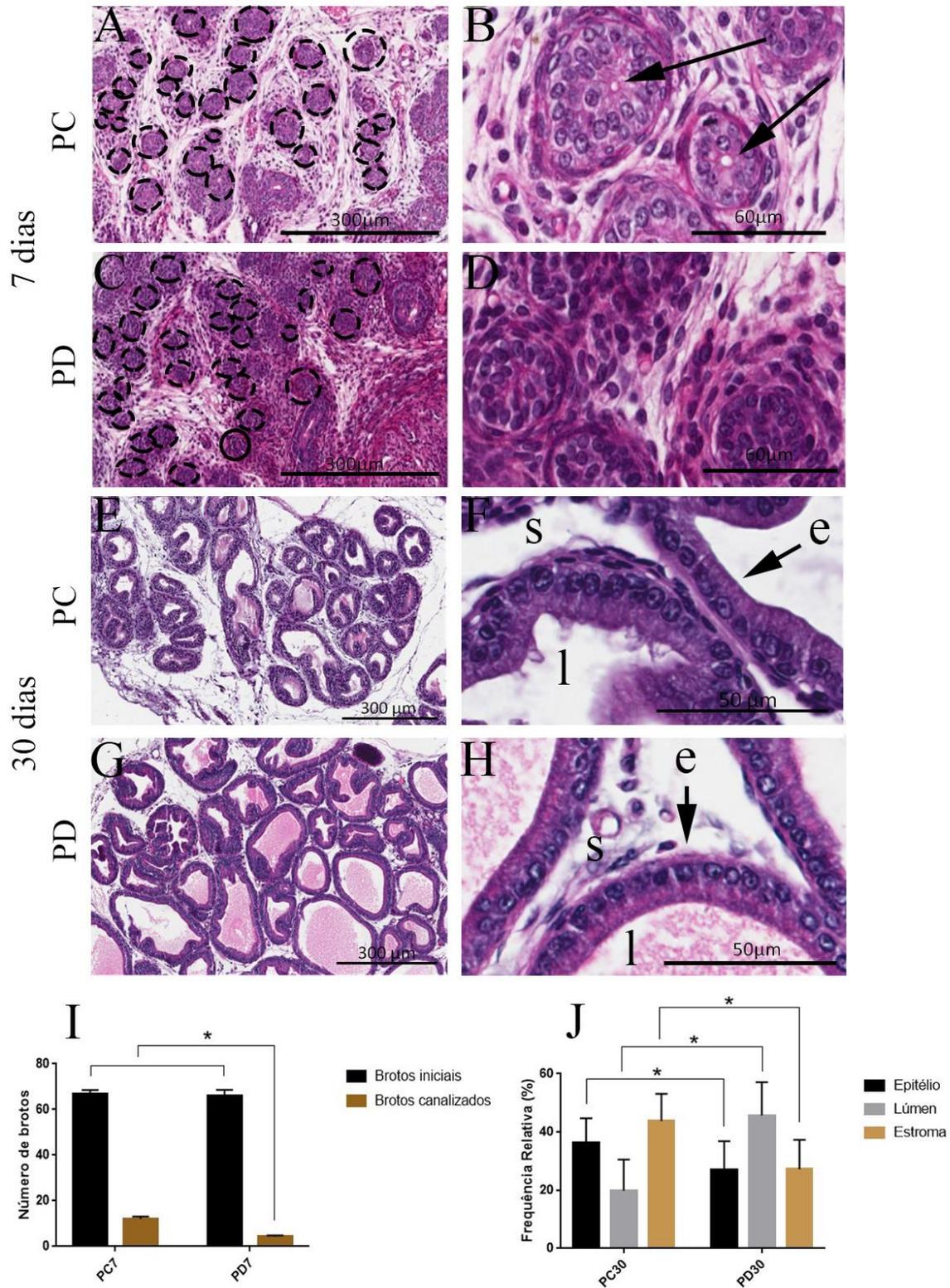


Figura 4- Estereologia da próstata de ratos neonatos e pré-púberes. (A-H) Imagens representativas da coloração H&E da próstata de ratos descendentes de mães normais (PC) ou diabéticas (PD) no 7º ou 30º dia pós-natal. **A,B-** Os brotos acinares estão circundados e aqueles em processo de canalização estão apontados pelas setas. **C-D** Em PD7 nota-se uma redução nos brotos canalizados. **E,F-** Em 30 dias, a próstata já é formada por ácinos contendo epitélio (e), lúmen (l) entremeados pelo estroma (s). **G e H** observam-se redução da altura epitelial e maior amplitude luminal em PD30. **I-** Representação gráfica da contagem de brotos na próstata dos grupos de neonatos. **J-** Representação gráfica da quantificação da frequência relativa de epitélio, lúmen e estroma na próstata dos grupos de idade pré-púbere. * $p < 0,05$.

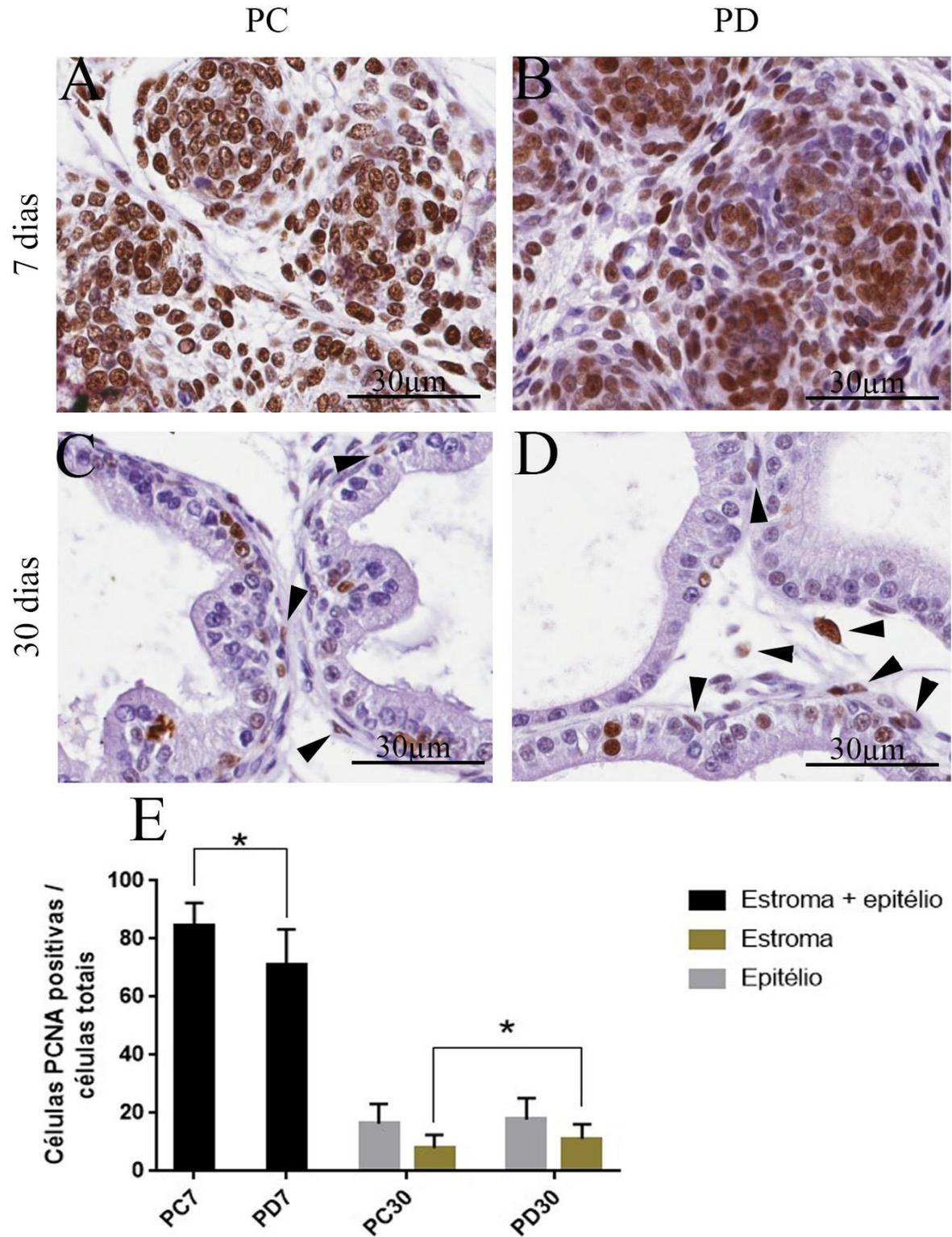


Figura 5 – Avaliação da proliferação celular. A-D Imagens representativas de imuno-histoquímica para PCNA na próstata de ratos descendentes de mães normais (PC) ou diabéticas (PD) no 7º ou 30º dia pós-natal. Células proliferativas são representadas pelos núcleos marcados em marrons e as estromais estão apontadas pelas cabeças de seta. E- Gráfico da média=desvio padrão da quantificação de células PCNA-positivas divididas pelo total de células na próstata de ratos com 7 e 30 dias pós-natais. * $p < 0,05$.

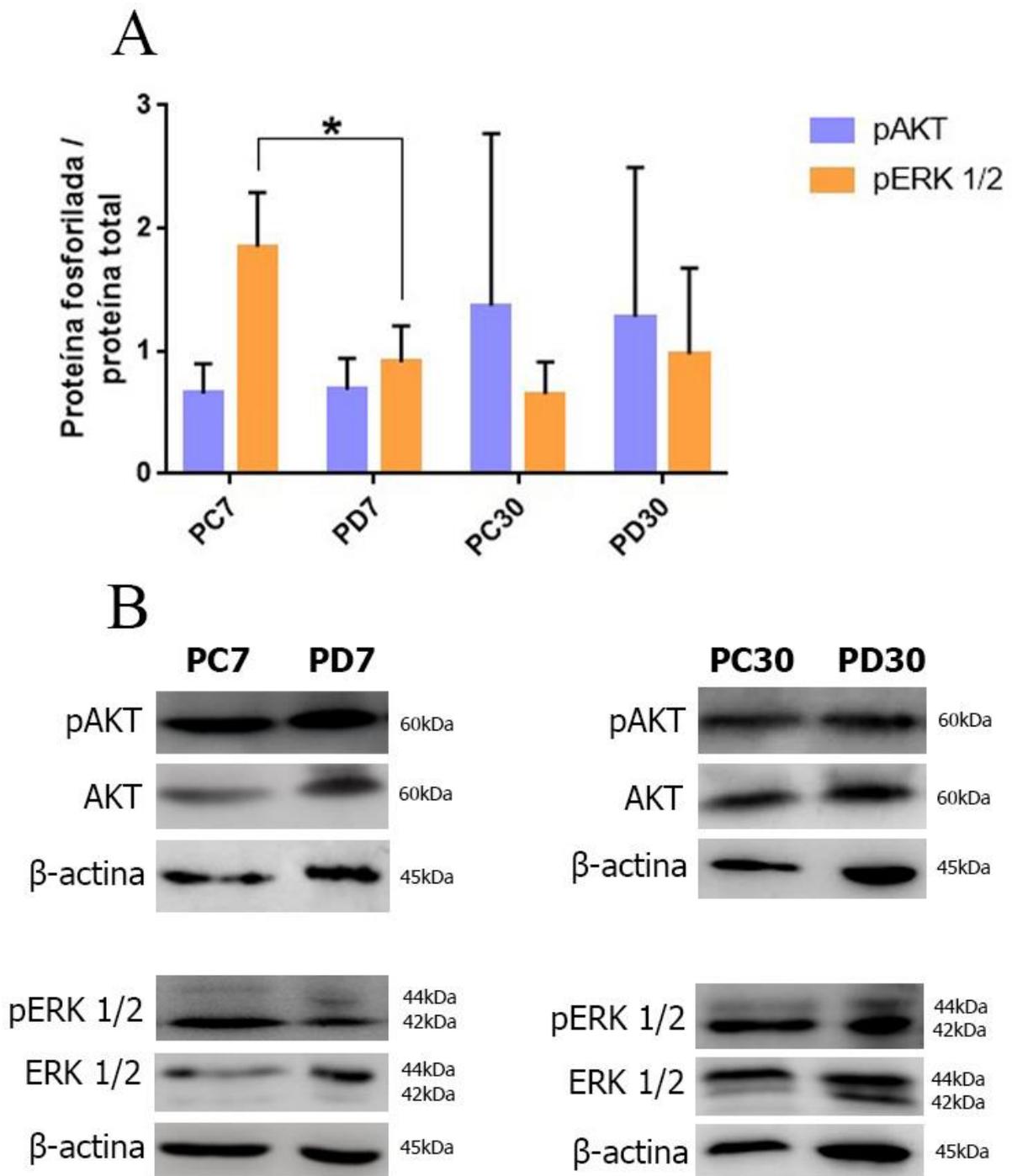


Figura 6- *Western blotting* para AKT e ERK1/2. (A) Gráfico das médias \pm desvio padrão dos níveis de fosforilação das vias AKT e ERK1/2 após normalização pela quantidade total da proteína na próstata de ratos descendentes de mães normais (PC) ou diabéticas (PD) no 7^o ou 30^o dia pós-natal. (B) *Western blotting* para AKT e ERK1/2 em suas formas totais e fosforiladas em ambas as idades estudadas. * $p < 0,05$.

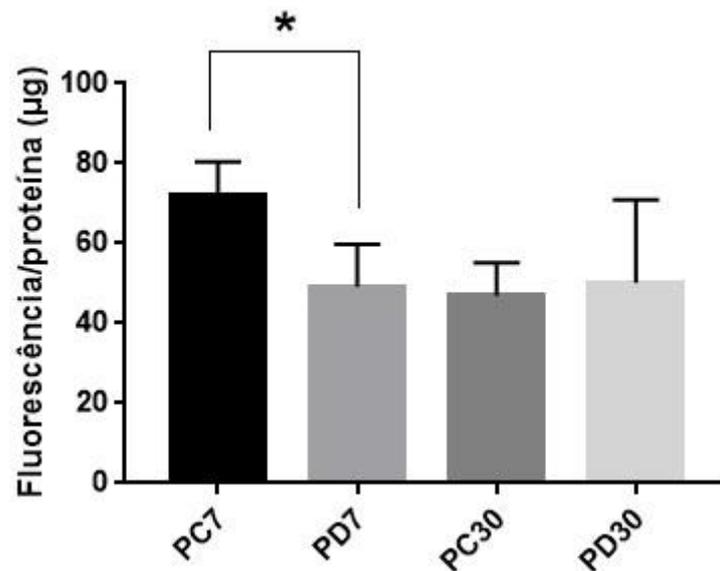


Figura 7 – Caspase-3. Gráfico da média± desvio padrão dos níveis de caspase-3 ativa no extrato proteico da próstata aos 7 e 30 pós-natal de filhotes de mães controle (PC) ou diabéticas (PD). * $p < 0,05$.

5.5 Redução de colágeno e células musculares lisas na próstata de filhos de mães diabéticas

Essa investigação mostrou que a distribuição de colágeno foi reduzida na próstata dos filhotes de mães diabéticas de ambas as idades. Verificou-se que o diabetes gestacional causou redução do colágeno de 7% em PD7 e 35% em PD30 em comparação com os respectivos controles (Figura 8A-D, I). Ainda no estroma, a imunomarcação para α -actina mostrou que enquanto no grupo PD7 não houve alteração, foi encontrada uma redução de 22% no PD30 em relação ao seu controle (Figura 8E-H, J). Essas análises demonstram que o diabetes gestacional influenciou a organização do estroma durante o desenvolvimento pós-natal da próstata da prole.

Para aprofundar a compreensão dos mecanismos relacionados com essa alteração no colágeno causado pelo diabetes gestacional na prole, realizamos uma quantificação de TGF- β (um dos principais fatores estimuladores da deposição de colágeno) e de MMP-2 (enzima proteolítica do colágeno). Dessa forma, encontramos que o diabetes gestacional não alterou os níveis prostáticos de TGF- β em nenhum grupo (Figura 9). Da mesma forma, ao analisar o conteúdo de MMP-2, observou-se que não houve alteração dessa metaloprotease em nenhuma das idades estudadas (Figura 10A, B).

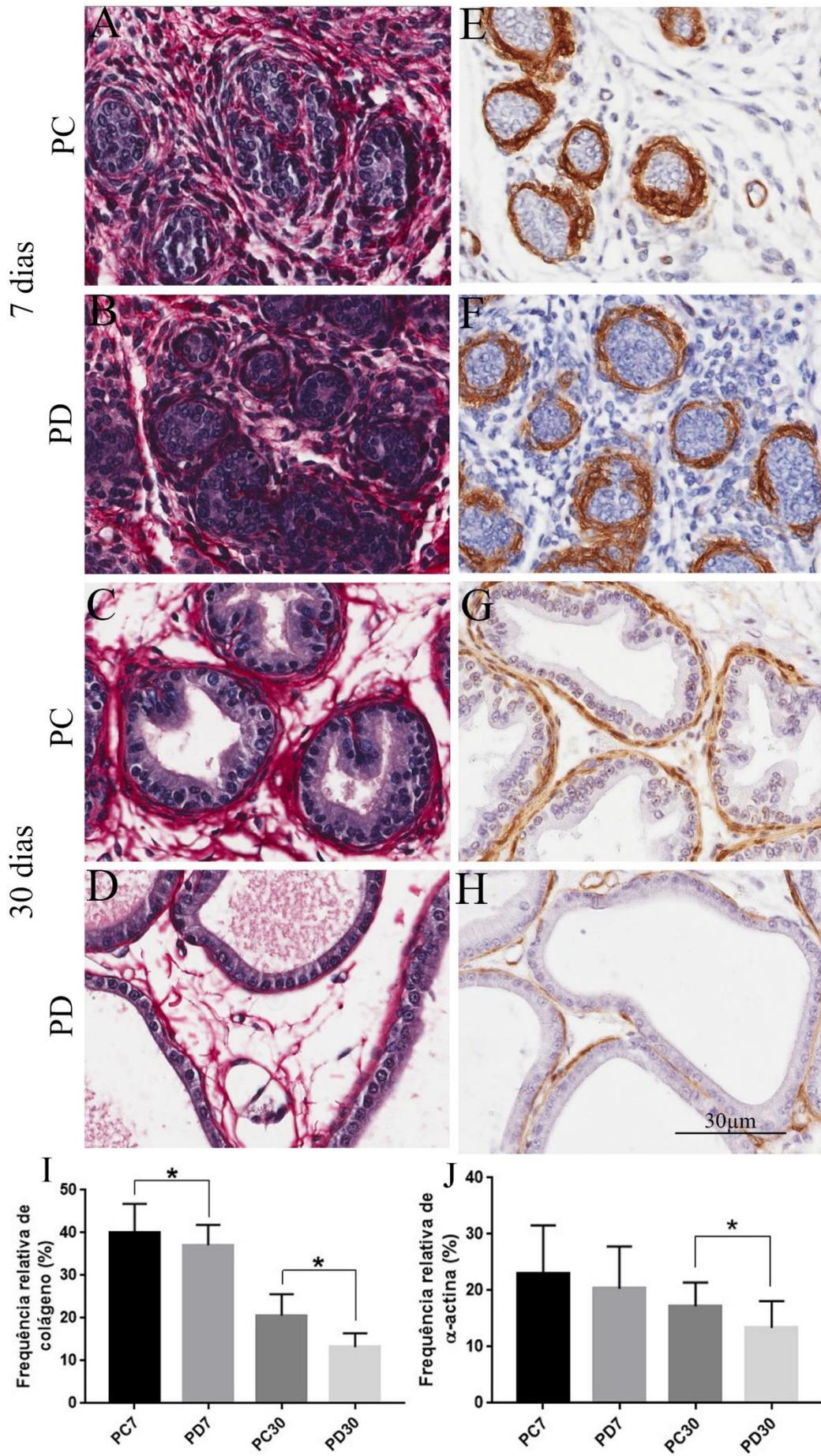


Figura 8 – Avaliação de colágeno e musculatura lisa. Imagens representativas de cortes histológicos da próstata de ratos filhotes de ratas normais (PC) ou diabéticas (PD) no 7º ou 30º dia pós-natal corados por picrossírius-hematoxilina (A-D) ou Imuno-histoquímica para alfa-actina de músculo liso (E-H). Os gráficos representam a média \pm desvio padrão da frequência relativa (%) de colágeno (I), e células musculares lisas (J) pela marcação de α -actina e mostram redução de colágeno em ambas as idades e de células musculares na próstata de PD30. A barra de escala representa todas as imagens, 3cm = 30 μ m. * $p < 0,05$.

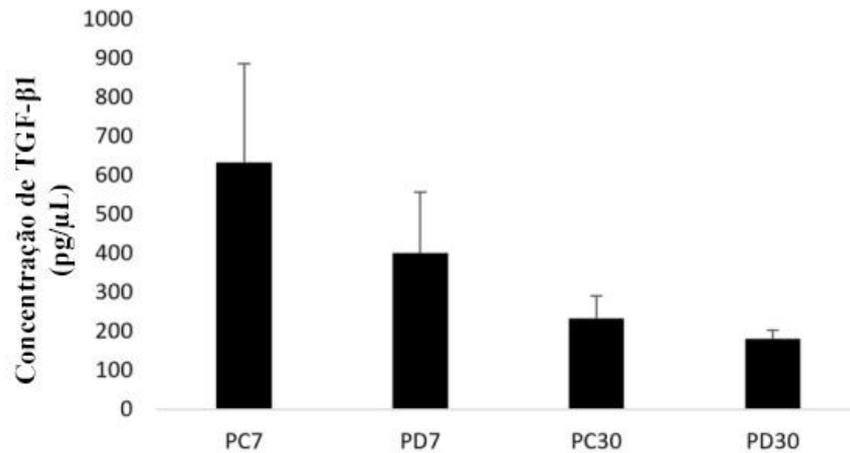


Figura 9 – TGF- β . Gráfico da média \pm desvio padrão dos níveis ativos de TGF- β na próstata de descendentes de mães normais (PC) ou diabéticas (PD) no 7º ou 30º dia pós-natal.

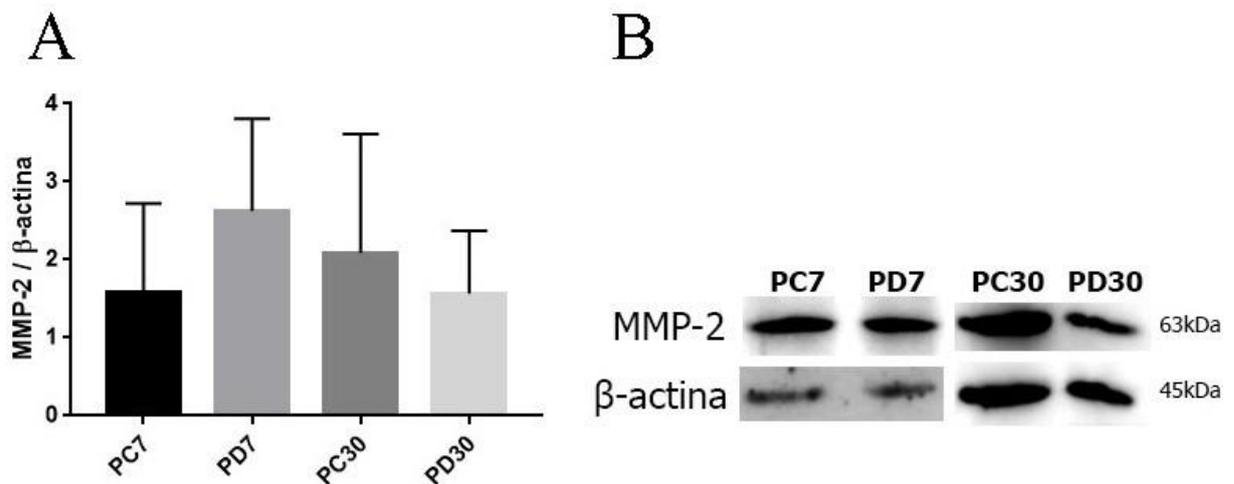


Figura 10 – MMP-2. Imagens representativas de *Western blotting* para metaloproteinase-2 na próstata de ratos, descendentes de mães normais (PC) ou diabéticas (PD) no 7º ou 30º dia pós-natal. O gráfico representa o conteúdo médio de MMP-2 no extrato da próstata normalizado em relação à β -actina.

6.0 DISCUSSÃO

A avaliação biométrica e hormonal mostrou que, embora os níveis de glicose e testosterona não tenham sido alterados na prole neonatal e juvenil, os descendentes de ratas diabéticas estavam mais magros comparados ao controle. Considerando os níveis de glicose, Ma *et al.* (2015) discutem que o DG não altera os níveis de glicose e insulina na prole neonatal, mas afeta os indivíduos a longo prazo. Nesse mesmo estudo, os descendentes de 5-19 anos e 20-24 anos de mulheres com tolerância anormal à glicose durante a gravidez apresentaram maior concentração plasmática de glicose e maior prevalência de diabetes. Estudos usando modelos animais de diabetes gestacional exploraram apenas os efeitos a longo prazo na prole. Nesse contexto, já foi demonstrado que a concentração de glicose foi significativamente aumentada em filhotes adultos (DAMASCENO *et al.*, 2014, KERMANI *et al.*, 2018). Assim, nossos achados sugerem que, embora o diabetes materno não afete a glicemia nas fases pós-natais mais iniciais na prole, deve causar reprogramações metabólicas tornando-a propensa a desenvolver hiperglicemia ao longo da vida, visto a semelhança dos resultados encontrados e os dados clínicos dissertados na literatura.

Em relação ao peso corporal, o modelo de DG utilizado neste estudo interferiu no ganho de massa corporal nos filhotes tanto na fase neonatal quanto pré-púbere. A literatura traz divergências quanto ao peso corporal da prole em condição de DG, mas a maioria dos estudos mostram descendentes com excesso de peso (macrossomia), tendo como principal explicação o crescimento acelerado devido ao ambiente hiperglicêmico intrauterino, contrariando o achado neste estudo (BOERSCHMANN *et al.*, 2010, PEREIRA *et al.*, 2014). Por outro lado, baixos níveis de insulina causados pelo *diabetes mellitus* tipo 1 podem causar atraso no desenvolvimento fetal (ORNOY *et al.*, 2021). Tendo em vista a heterogeneidade da condição materna em apresentar diferentes estados e níveis hiperglicêmicos, resultados divergentes não são surpreendentes. A esse respeito, o modelo de indução de diabetes tipo 1 com STZ é caracterizado por uma grande elevação da glicemia, atingindo níveis acima de 400 mg/dL em ratas grávidas. Essa condição metabólica causa graves danos sistêmicos associados à diminuição da massa corporal materna, sintoma comum em pacientes com diabetes não controlada. Assim, considerando o baixo peso corporal das mães, a redução no peso corporal dos descendentes também é justificada (Tabela 2, 3).

As fases neonatal e pré-púbere são períodos importantes para o desenvolvimento da próstata. A morfogênese do brotamento da glândula ocorre em roedores após o nascimento, e os padrões de ramificação específicos do lobo estão completos entre 15 e 20 dias de idade

(OLIVEIRA *et al.*, 2016). A ramificação é responsável pela formação da próstata, caracterizada por brotos epiteliais que crescem da uretra proximal em direção ao tecido conjuntivo circundante (WILSON, 2011). Ao nascer, a próstata do roedor consiste em ductos sólidos não ramificados e alongados que se estendem até o mesênquima do UGS ventral, lateral e dorsal para formar os lobos prostáticos separados (HUANG *et al.*, 2009). A citodiferenciação de células mesenquimais e epiteliais com formação de lúmen é coordenada com a morfogênese ramificada, começando nos ductos proximais e estendendo-se lentamente em direção às pontas distais em um processo de canalização entre o dia pós-natal 3-15, variando entre as espécies de roedores (HUANG *et al.*, 2009). Segundo Bruni-Cardoso e Carvalho (2007), simultaneamente à diferenciação das células epiteliais ocorre a eliminação das células da região central dos brotos por apoptose, sendo este processo de fundamental importância para a canalização da próstata. Na presente investigação, foi mostrado que, embora o número de brotos prostáticos não tenha mudado, a apoptose foi reduzida em associação com uma diminuição de brotos canalizados na prole neonatal de mães diabéticas, demonstrando um atraso no processo de canalização. A redução nos níveis de canalização pode indicar um retardo nos processos de diferenciação celular epitelial e estromal, em que a relação no início do desenvolvimento prostático é de suma importância para a formação ideal da glândula (HAYWARD; CUNHA, 2000). Foi descrito recentemente na literatura que um ambiente *in vitro* com altas taxas de glicose prejudicou o desenvolvimento pós-natal da próstata, reduzindo o número e o tamanho dos brotos epiteliais (CASSIMIRO *et al.*, 2020). Nesse contexto, é notável que o ambiente hiperglicêmico é prejudicial ao processo de ramificação e canalização, que é uma etapa crucial no desenvolvimento pós-natal da próstata e pode impactar na formação da estrutura glandular para o funcionamento ideal na vida adulta.

A proliferação celular também é um processo importante para a ramificação da próstata e formação acinar. Nesse estudo, encontramos redução do índice de proliferação celular na próstata de filhos neonatais de mães diabéticas. Embora a ativação da via de sinalização AKT não tenha mudado, níveis reduzidos de fosforilação ERK1/2 foram notados no grupo PD7. A importância desta via no desenvolvimento inicial da próstata, que controla os processos de brotamento da glândula, já é conhecida (HU *et al.*, 2021). A inibição da via ERK 1/2 reduz o crescimento prostático e prejudica a ramificação, afetando negativamente a formação de ductos e o desenvolvimento ideal do órgão (HU *et al.*, 2021). Estudos anteriores contribuem para esta relação, descrevendo que a redução da via ERK1/2 está intimamente

relacionada com a diminuição dos níveis de PCNA (YU *et al.*, 2005). Pode-se sugerir que a inativação de ERK1/2 está relacionada à redução da proliferação celular na próstata da prole neonatal, podendo interferir na correta formação dos cordões ramificados e futuro compartimento epitelial. Curiosamente, foi encontrada uma tendência de normalização da ERK1/2 na prole pré-púbere, bem como a proliferação celular e a apoptose. Segundo Yue e López (2020), a via ERK1/2 atua tanto suprimindo a apoptose, pois ativa a proliferação e sobrevivência celular, quanto ativando o sinal apoptótico por meio de sua relação com p53 em casos de dano ao DNA ou estresse oxidativo. Contudo, essa tendência à normalização em 30 dias não foi suficiente para evitar danos ao compartimento epitelial, pois ocorreram em um momento importante do desenvolvimento pós-natal da próstata, onde a proliferação celular é crucial. Consequentemente, foi encontrada área epitelial e estromal reduzidas na prole pré-púbere de mães diabéticas, mostrando o impacto negativo do DG na prole prostática.

O colágeno é essencial na organização e integridade dos tecidos conjuntivos. Anormalidades, redução ou aumento desta proteína podem comprometer a força, resistência e histoarquitetura ideal dos tecidos e órgãos, incluindo a próstata (ZORN, 2022). Ao analisar os efeitos do DG no estroma da glândula, foi encontrada redução de colágeno em PD7 e PD30 em relação aos seus respectivos controles. Não existem estudos com avaliação estromal da próstata de descendentes de mães diabéticas nas fases pós-natais iniciais, mas Damasceno *et al.* (2014) demonstraram redução de colágeno em descendentes adultos, enquanto Santos *et al.* (2014) tenham encontrado o contrário em ratos púberes. Embora tenha-se encontrado essa redução na distribuição de colágeno na próstata, tal alteração não foi acompanhada de menores níveis de TGF- β ou maior expressão MMP-2 que justificassem menor estímulo à produção ou aumento na degradação do colágeno. Entretanto, a imunomarcagem para vimentina já está sob análise e a redução no número de fibroblastos no estroma dos animais filhotes de mães DG é uma possibilidade que está em investigação neste estudo. Independente do mecanismo que levou à redução de colágeno, essa alteração implica em alteração estrutural importante na glândula que pelo visto se mantém do início do desenvolvimento até a fase adulta.

O DG também afetou o peso úmido da próstata em ambos os grupos de ninhadas de mães diabéticas (PD7 e PD30) em relação aos controles. Essa redução também foi encontrada por outros estudos na prole adulta de ratas com DG (DAMASCENO *et al.*, 2014). Acredita-se que a diminuição do peso da próstata na presente investigação possa estar relacionada às reduções das áreas epiteliais e estromal. Resultado semelhante no peso e atrofia epitelial foi

encontrado na próstata de ratos púberes cujo o diabetes foi induzido aos 40 dias de idade (PORTO *et al.*, 2011), mas diferente daqueles quando a indução do diabetes aconteceu na fase adulta onde ocorre um anabolismo estromal (RIBEIRO *et al.*, 2006; RIBEIRO; TABOGA; GOÉS, 2009; GOBBO *et al.*, 2012). Especula-se que, talvez o impacto da reprogramação causada pelo diabetes/hiperglicemia tenha efeitos diferentes a depender da fase de vida da sua atuação. De qualquer forma, esse é o primeiro estudo que mostra os efeitos do DG na próstata de ratos em fase neonatal e pré-púbere. Curiosamente, Santos *et al.* (2014) ao avaliarem os efeitos do DG na próstata de animais púberes e adultos notaram resultados diferentes, como aumento de epitélio, estroma e de colágeno, sem alteração de peso da próstata em ambas as fases estudadas por esses pesquisadores. Cabe destacar que o estudo citado só usou ratas prenhas com diabetes entre 120 e 240 mg/dL de glicemia, o que difere consideravelmente do protocolo utilizado neste estudo, que obteve ratas diabéticas com glicemia muito elevada, em torno de 400 mg/dL. Assim, nota-se que o diabetes materno afeta de alguma forma a morfogênese da próstata desde a vida embrionária impactando em seu volume no período neonatal que persiste até a vida adulta; e que provavelmente o grau de hiperglicemia da mãe interfere no nível de alteração na glândula.

A partir da imunomarcagem para α -actina, notou-se que, embora não haja alteração entre os grupos de 7 dias, há redução da musculatura lisa em PD30. Já foi demonstrado anteriormente o efeito do diabetes gestacional no estroma da glândula adulta, reduzindo as células musculares lisas (DAMASCENO *et al.*, 2014). Durante desenvolvimento da próstata, essas células são essenciais para induzir proliferação do epitélio secretor, através interação epitélio-estroma (CUNHA, 2008). Nem o epitélio, nem o estroma são capazes de se desenvolver na ausência um do outro (CUNHA *et al.*, 1996, HAYWARD; CUNHA, 2000). Na vida adulta, além de sua função contrátil, essas células estão envolvidas na homeostase do órgão, regulando as células epiteliais através de sinalização parácrina dependente de andrógeno (PEINETTI *et al.*, 2018). Dessa forma, associando os resultados coletados ao longo do tempo, não é difícil observar que o DG, através da redução nas células musculares lisas, traz impacto na interação epitélio-estromal desde a fase pré-púbere até a fase adulta e pode prejudicar a homeostase da glândula dos descendentes. Segundo aponta Cassimiro *et al.* (2020) ao evidenciar a importância das células musculares, este efeito pode ter influência negativa na função reprodutiva através de produção de secreção prejudicada (se o epitélio não tem estímulo estromal adequado para manter a sua diferenciação) e também na eliminação da secreção (por déficit na contração).

Este estudo buscou investigar os possíveis impactos do diabetes gestacional de ratas na próstata de filhotes neonatais e pré-púberes, analisando aspectos morfológicos e bioquímicos. Os resultados encontrados ajudarão a entender como a próstata da prole é influenciada pelo ambiente hiperglicêmico durante o período intrauterino e também o impacto no seu desenvolvimento pós-natal. Esses dados poderão auxiliar a elaborar e divulgar estratégias preventivas e evitar prejuízos na vida reprodutiva adulta.

7.0 CONCLUSÃO

O diabetes gestacional tem influência negativa nos descendentes, afetando a morfologia da próstata de ratos na idade neonatal e pré-púbere. Embora a condição materna não tenha impactado no brotamento da próstata, causou retardo na canalização dos brotos através da redução de apoptose. Além disso, já na fase neonatal há uma redução na ativação da via ERK1/2, causando diminuição na proliferação celular na vida neonatal e redução epitelial na fase pré-púbere. No estroma, o DG também tem efeitos negativos, reduzindo a área estromal, a deposição de colágeno e a distribuição de células musculares lisas. Assim, além de afetar a estrutura tecidual, a interação epitélio-estroma e a contração que a glândula precisa ter para manter sua função reprodutivas são prejudicadas na prole dos descendentes de mães diabéticas. Em conjunto com dados anteriores do grupo, concluímos que essas alterações do DG ocorrem desde o período neonatal e muitas delas perduram na fase pré-púbere até a vida adulta, podendo impactar de alguma forma a função reprodutiva.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B. J. Sistema Reprodutor Masculino. *In*: AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 18, p. 371-388. ISBN 978-85-277-2058-8.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Tolerância Imunológica e Autoimunidade. *In*: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. cap. 15, p. 320-321. ISBN 978-85-352-8320-4.
- ALAM, S. *et al.* Diabetes Mellitus: Insights from Epidemiology, Biochemistry, Risk Factors, Diagnosis, Complications and Comprehensive Management. **Diabetology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 36-50, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/diabetology2020004>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-4540/2/2/4#B37-diabetology-02-00004>. Acesso em: 2 jan. 2023.
- 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**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 144-154, 2010. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00696.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2613.2009.00696.x>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- BAR, J. *et al.* Placental histopathological findings in obese and nonobese women with complicated and uncomplicated pregnancies. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 286, p. 1343–1347, 2012. DOI <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2450-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00404-012-2450-z>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- BARROM, D. A.; ROWLEY, D. R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. **Endocrine-Related cancer**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 187-204, 2012. DOI 10.1530/ERC-12-0085. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22930558/>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- BAUER, M. K. *et al.* Fetal growth and placental function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 140, p. 115-120, 1998. DOI [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00039-2). Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720798000392?casa_token=qHVBGwZIRNgAAAAA:aX5ImexwS77M0XlpSoZb9srf1h4DWygJI9ULh8L1nVMHvB6G287hxiPtj1Slq1_F_g2lmGj2Bss. Acesso em: 19 nov. 2022.
- BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 1-9, 1999. DOI <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.1.1>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/48/1/1/12305/Role-of-oxidative-stress-in-diabetic-complications>. Acesso em: 4 nov. 2022.
- BLAIR, M. Diabetes Mellitus Review. **Urologic Nursing**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 27-36, 2016. DOI 10.7257/1053-816X.2016.36.1.27. Disponível em: <https://web.p.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=79d5cb30-8f21-4cb9-aad2-9538150b588c%40redis>. Acesso em: 15 jul. 2022.

BOERSCHMANN, H. *et al.* Prevalence and Predictors of Overweight and Insulin Resistance in Offspring of Mothers With Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes care**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1845-1849, 2010. DOI <https://doi.org/10.2337/dc10-0139>. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/care/article/33/8/1845/39120/Prevalence-and-Predictors-of-Overweight-and>. Acesso em: 29 nov. 2022.

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**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. DOI <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>. Acesso em: 3 abr. 2023.

BRUNI-CARDOSO, A. *et al.* MMP-2 regulates rat ventral prostate development in vitro. **Developmental Dynamics**, [s.l.], v. 239, p. 737-746, 2010. DOI <https://doi.org/10.1002/dvdy.22222>. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.22222>. Acesso em: 08 mar. 2023.

BRUNI-CARDOSO, A.; CARVALHO, H. F. Dynamics of the epithelium during canalization of the rat ventral prostate. **Anatomical Record (Hoboken)**, [s. l.], v. 290, n. 10, p. 1223-1232, 2007. DOI [10.1002/ar.20591](https://doi.org/10.1002/ar.20591). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17847055/>. Acesso em: 30 mar. 2023.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **The American Society for Clinical Investigation**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 485-491, 2005. DOI <https://doi.org/10.1172/JCI24531>. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/24531?pagewanted=all>. Acesso em: 3 nov. 2022.

CARDILLO, M. R. *et al.* transforming growth factor- β expression in prostate neoplasia. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1-10, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10696454/>. Acesso em: 1 abr. 2023.

CASARIN, D. E. *et al.* Diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 10062-10075, 2022. DOI [10.34117/bjdv8n2-107](https://doi.org/10.34117/bjdv8n2-107). Disponível em: <https://scholar.archive.org/work/2kexelpir5gfbnke5dcuz2pagq/access/wayback/https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/download/43837/pdf>. Acesso em: 6 fev. 2023.

CASSIMIRO, I. S. *et al.* Rat postnatal prostate development is impaired by in vitro high-glucose environment. **Reproduction**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 469-480, 2020. DOI <https://doi.org/10.1530/rep-20-0091>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32520720/>. Acesso em: 2 dez. 2022.

CHALLIER, J. C. *et al.* Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. **Placenta**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 274-281, 2006. DOI [10.1016/j.placenta.2007.12.010](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.12.010). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284075/pdf/nihms633924.pdf>. Acesso em: 4 nov. 2022.

CHAMBAZ, E. M. *et al.* Transforming growth factor- β s: a multifunctional cytokine family. **Hormone Research**, [s. l.], v. 45, p. 222-226, 1996. DOI <https://doi.org/10.1159/000184792>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/184792>. Acesso em: 1 abr. 2023

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, 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/138/12/5293/2987530>. Acesso em: 13 abr. 2023.

COUTINHO, W. F.; SILVA JÚNIOR, W. S. Diabetes Care in Brazil. *Annals of Global Health*, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 735-741, 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.12.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214999615013077#bib6>. Acesso em: 6 fev. 2023.

CUNHA, G. R. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. **Differentiation**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 578-586, 2008. DOI 10.1111/j.1432-0436.2008.00290.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18557761/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

CUNHA, G. R. *et al.* Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. **Acta Anatomica (Basel)**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 63-72, 1996. DOI <https://doi.org/10.1159/000147791>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8811117/>. Acesso em: 14 mar. 2023.

CUNHA, G. R.; HAYWARD, S. W.; WANG, Y. Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, [s. l.], v. 70, n. 9-10, p. 473-485, 2002. DOI <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700902.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1432-0436.2002.700902.x>. Acesso em: 13 abr. 2023.

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, 2014. DOI 10.1007/s00441-014-1941-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24988912/>. Acesso em: 1 dez. 2022.

D'ANTONIO, J. M.; GRIEND, D. J. V.; ISAACS, J. 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, 2009. DOI 10.1677/ERC-08-0205. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19240183/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

DOS SANTOS, P. A. *et al.* Gestational Diabetes in the Population Served by Brazilian Public Health Care: Prevalence and Risk Factors. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 12-18, 2019. DOI <https://doi.org/10.1055/s-0039-1700797>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbgo/a/SyR4qTWs9jnP958X8szXSrd/?format=html&lang=en>. Acesso em: 6 fev. 2023.

EDLOW, A. G. *et al.* Placental Macrophages: A Window Into Fetal Microglial Function in Maternal Obesity. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 77, p. 60-68, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.11.004>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6527487/>. Acesso em: 4 nov. 2022.

FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 1, p. 34-45, 2001. DOI <https://doi.org/10.1038/35094009>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35094009>. Acesso em: 13 abr. 2023.

- FRÁGUAS, R.; SOARES, S. M. de S. R.; BRONSTEIN, M. D. Depressão e diabetes mellitus. **Archives of Clinical Psychiatry**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 93-99, 2009. DOI <https://doi.org/10.1590/S0101-60832009000900005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpc/a/YwLmfZk78yT97DcsYgzvbGt/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- FRANCIS, J. C.; SWAIN, A. Prostate Organogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2018. DOI 10.1101/cshperspect.a030353. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29229667/>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- FRICK, J.; AULITZKY, W. Physiology of the Prostate. **Infection**, [s. l.], v. 19, p. 115-118, 1991. DOI <https://doi.org/10.1007/BF01643679>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01643679>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/FIOCRUZ**. Rio de Janeiro: Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA), 2008. Disponível em: http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camaras-tecnicas/Manual_procedimentos.pdf. Acesso em: 4 abr. 2023.
- 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**, [s. l.], v. 58, n. 15, p. 3299–3306, 1998. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/15/3299/504286/Development-of-an-Androgen-Receptor-null-Model-for>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- GHOSH, S. *et al.* PI3K/mTOR signaling regulates prostatic branching morphogenesis. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 360, p. 329-342, 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.027>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22015718/>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. Comunicação célula a célula: Mecanismos de morfogênese. *In*: GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Biologia do Desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. cap. 4, p. 95-142. ISBN 978-85-8271-513-0.
- GOBBO, M. G. *et al.* Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. **Micron**, [s. l.], v. 43, n. 2-3, p. 326-333, 2012. DOI 10.1016/j.micron.2011.09.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22014851/>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- GUARIGUATA, L. *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 137-149, 2014. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>. Disponível em: [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(13\)00385-9/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(13)00385-9/fulltext). Acesso em: 2 nov. 2022.
- HAYWARD, S. W. *et al.* Smooth Muscle-Epithelial Interactions in Normal and Neoplastic Prostatic Development. **Acta Anatomica**, [s. l.], v. 155, p. 63–72, 1996. DOI <https://doi.org/10.1159/000147791>. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/147791>. Acesso em: 13 abr. 2023.

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. **Radiologic Clinics of North America**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 1-14, 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0033-8389\(05\)70146-9](https://doi.org/10.1016/S0033-8389(05)70146-9). Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033838905701469?casa_token=cFs8gVj-7WoAAAAA:WhHpc8P4v23M6KSr9Rzfs_oBdwZcEcWsEfCyMgLUpD_-pVDPA2sbE3Erz3bjGqYVTOG9hqMikOo. Acesso em: 23 nov. 2022.

HISATAKI, T. *et al.* Modulation of phenotype of human prostatic stromal cells by transforming growth factor-betas. **The Prostate**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 174-182, 2003. DOI <https://doi.org/10.1002/pros.10320>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pros.10320>. Acesso em: 1 abr. 2023.

HU, W. Y. *et al.* Morphometric Analysis of Rat Prostate Development: Roles of MEK/ERK and Rho Signaling Pathways in Prostatic Morphogenesis. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 12, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/biom11121829>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/12/1829>. Acesso em: 2 dez. 2022.

HUANG, L. *et al.* The role of Wnt5a in prostate gland development. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 328, n. 2, p. 188-199, 2009. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160609000190>. Acesso em: 2 abr. 2023.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas 2021**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Acesso em: 9 fev. 2023.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF DIABETES ATLAS**: Eighth edition 2017. 8. ed. [S. l.: s. n.], 2017. 150 p. ISBN 978-2-930229-87-4. Disponível em: https://diabetesatlas.org/upload/resources/previous/files/8/IDF_DA_8e-EN-final.pdf. Acesso em: 14 jul. 2022.

JAN, R.; CHAUDHRY, G. S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 205-218, 2019. DOI 10.15171/apb.2019.024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6664112/>. Acesso em: 1 dez. 2022.

JOVANOVIC, L.; PETTITT, D. J. Gestational Diabetes Mellitus. **JAMA**, [s. l.], v. 286, n. 20, p. 2516–2518, 2001. DOI 10.1001/jama.286.20.2516. Disponível em: https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/194398?casa_token=WYoCOTSvzNkAAAAA:churghbQqxiefRnnmQ1CYZizAvst5mhGyYTxuIoZ9xe00qXeLv-oWCSf2kR75b5eIGzf7ZjbVM. Acesso em: 3 nov. 2022.

KERMANI, E. S. *et al.* Gestational diabetes influences the expression of hypertrophic genes in left ventricle of rat's offspring. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 525-528, 2018. DOI <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.25116.6233>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6000218/>. Acesso em: 3 abr. 2023.

KIERSZENBAUM, A. L. Espermatogênese. *In*: KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular**: Uma Introdução à Patologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 20, p. 572-600. ISBN 978-85-352-2513-6.

LAGENTE, V. *et al.* Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.

l.], v. 38, n. 10, p. 1521-1530, 2005. DOI <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005001000009>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16172745/>. Acesso em: 21 nov. 2022.

LEE, C.; HOLLAND, J. M. Accessory Male Sex Gland: Anatomy, Histology, and Ultrastructure (Correlation with Function), Prostate, Rat. In: JONES, T. C.; MOHR, U.; HUNT, R. D. **Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Genital System**. [S. l.]: Springer-Verlag, 1987. p. 237-252. ISBN 978-3-642-72550-0. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-72550-0_37. Acesso em: 20 fev. 2023.

LIRA, E. C. *et al.* Exposição ao diabetes gestacional: Alterações sobre os parâmetros de estresse oxidativo e acúmulo de ferro esplênico em ratos. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 205-213, 2015. DOI 10.14450/2318-9312.v27.e4.a2015.pp205-213. Disponível em: <https://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=1211&path%5B%5D=pdf>. Acesso em: 4 nov. 2022.

MA, R. C. W. *et al.* Maternal diabetes, gestational diabetes and the role of epigenetics in their long term effects on offspring. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 118, n. 1-2, p. 55-68, 2015. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.010>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079610715000358?casa_token=OSCLnJ408dcAAAAA:tDwGFSVHEWz5fapJWVYqDj4NpPSxviJEhkdPM1BD6Hx1DmRRuF61ZkWIEdV4RFnm5iRfsGBhfm0. Acesso em: 29 nov. 2022.

MCNEAL, J. E. Anatomy of the prostate: An historical survey of divergent views. **The Prostate**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 3-13, 1980. DOI <https://doi.org/10.1002/pros.2990010103>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pros.2990010103>. Acesso em: 24 nov. 2022.

MCNEAL, J. E. Regional morphology and pathology of the prostate. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 347-357, 1968. DOI 10.1093/ajcp/49.3.347. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5645095/>. Acesso em: 13 abr. 2023.

MENDES, F. S. *et al.* **GUIA DA GESTANTE COM DIABETES GESTACIONAL**. Belo Horizonte: Grupo Santa Casa de Belo Horizonte, 2019. 32 p. Disponível em: https://diabetes.org.br/wp-content/uploads/2021/05/E-BOOK_GUIA_DA_GESTANTE_COM_DMGM.pdf. Acesso em: 4 nov. 2022.

MIOTTI, M. D.; MOLLERACH, M. I.; BARQUEZ, R. M. Anatomy and histology of the prostate and glands of Cowper in three species of neotropical bats. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 279, n. 3, p. 294-301, 2017. DOI 10.1002/jmor.20771. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmor.20771>. Acesso em: 21 nov. 2022.

MOREIRA, R. O. *et al.* Diabetes mellitus e depressão: uma revisão sistemática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 19-29, 2003. DOI <https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000100005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/R9gV87zcXM9KKK7nz9dxGQN/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 3 nov. 2022.

MURPHY, K. Sistema imune na saúde e na doença: Autoimunidade e Transplante. *In*: MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap. 15, p. 612-613. ISBN 978-85-8271-040-1.

MUZY, J. *et al.* Prevalência de diabetes mellitus e suas complicações e caracterização das lacunas na atenção à saúde a partir da triangulação de pesquisas. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 1-18, 2021. DOI <https://doi.org/10.1590/0102-311X00076120>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/B9Fhg54pjQ677YVx9g3mHwL/>. Acesso em: 3 nov. 2022.

NERI, C.; EDLOW, A. G. Effects of Maternal Obesity on Fetal Programming: Molecular Approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 1-21, 2016. DOI <https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a026591>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4743074/>. Acesso em: 4 nov. 2022.

OLIVEIRA, D. S. M. *et al.* The mouse prostate: a basic anatomical and histological guideline. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 8-13, 2016. DOI 10.17305/bjbm.2016.917. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26773172/>. Acesso em: 22 mar. 2023.

ORNOY, A. *et al.* Diabetes during Pregnancy: A Maternal Disease Complicating the Course of Pregnancy with Long-Term Deleterious Effects on the Offspring. A Clinical Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1-36, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms22062965>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/2965>. Acesso em: 29 nov. 2022.

PADHI, S.; NAYAK, A. K.; BEHERA, A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 131, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110708>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333222030901X>. Acesso em: 15 jul. 2022.

PAIM, B.; DESCONSI, K.; OLIVEIRA, T. S. de. A epidemiologia da obesidade e sobrepeso na adolescência: Uma revisão sistemática. **Revista Gestão e Conhecimento**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 54–66, 2022. DOI: 10.55908/RGCV16N1-005. Disponível em: <https://revistagc.com.br/ojs/index.php/rgc/article/view/166>. Acesso em: 3 nov. 2022.

PAWLINA, W. Sistema Genital Masculino: Próstata. *In*: PAWLINA, W. **ROSS Histologia Texto e Atlas: Correlações com Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. cap. 22, p. 855-859. ISBN 978-85-227-3709-8.

PEINETTI, N. *et al.* The Response of Prostate Smooth Muscle Cells to Testosterone Is Determined by the Subcellular Distribution of the Androgen Receptor. **Endocrinology**, [s. l.], v. 159, n. 2, p. 945–956, 2018. DOI <https://doi.org/10.1210/en.2017-00718>. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/159/2/945/4675087>. Acesso em: 13 abr. 2023.

PEREIRA, T. J. *et al.* Influence of maternal overnutrition and gestational diabetes on the programming of metabolic health outcomes in the offspring: experimental evidence. **Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 438–451, 2014. DOI <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0141>. Disponível em: https://cdnsiencepub.com/doi/full/10.1139/bcb-2014-0141?casa_token=oTy5CkeUissAAAAA%3AH14qs1kiaymrSjq0UR-

- Ntwg5kHPFRXvws5a5GfUOZ18zz6OvVBhfVjvySgsqCcdSCrh4v0UgXFBrijQ. Acesso em: 4 nov. 2022.
- PORTO, E. M. *et al.* Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. **Microscopy Research & Technique**, [s. l.], v. 74, n. 11, p. 1040-1048, 2011. DOI <https://doi.org/10.1002/jemt.20991>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.20991>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- PORTT, L. *et al.* Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1813, n. 1, p. 238-259, 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910002764>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- RIBEIRO, D. L. *et al.* Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. **European Journal of Histochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 51-60, 2006. DOI <https://doi.org/10.4081/975>. Disponível em: <https://ejh.it/index.php/ejh/article/view/975>. Acesso em: 19 jan. 2023.
- RIBEIRO, D. L.; TABOGA, S. R.; GOÉS, R. M. Diabetes induces stromal remodelling and increase in chondroitin sulphate proteoglycans of the rat ventral prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 400-411, 2009. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00657.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2613.2009.00657.x>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- RISBRIDGER, G. P.; ALMAHBOBI, G. A.; TAYLOR, R. A. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 322, p. 173–181, 2005. DOI <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1121-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-005-1121-9>. Acesso em: 16 dez. 2022.
- ROSKOSKI, R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 105-143, 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661812000977?casa_token=SBbKUskLf2kAAAAA:yyMiHzKwUChhsCefvtGI60GYvSZIUWoTdss2dH2H0Zfq13WzpVCRfOuaFAwTfkCSS86RImVh0ec. Acesso em: 24 nov. 2022.
- RUBINFELD, H.; SEGER, R. The ERK cascade: A Prototype of MAPK Signaling. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 31, p. 151-174, 2005. DOI <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:151>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1385/MB:31:2:151>. Acesso em: 24 nov. 2022.
- SAEEDI, P. *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 157, n. 107843, 2019. DOI [10.1016/j.diabres.2019.107843](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31518657/>. Acesso em: 31 jan. 2023.
- SALVADORI, V.; SILVA, D. P. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL: Revisão da Literatura. *Revista Saúde Multidisciplinar*, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 73-78, 2022. DOI <https://doi.org/10.53740/rsm.v11i1.375>. Disponível em:

<http://revistas.famp.edu.br/revistasaudemultidisciplinar/article/view/375>. Acesso em: 6 fev. 2023.

SANTOS, S. A. A. *et al.* Impact of gestational diabetes and lactational insulin replacement on structure and secretory function of offspring rat ventral prostate. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 206, p. 60-71, 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648014002548>. Acesso em: 29 nov. 2022.

SCHOENWOLF, G. C. *et al.* Desenvolvimento fetal e o feto como paciente. In: SCHOENWOLF, G. C. *et al.* **Larsen Embriologia Humana**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. Capítulo 6, p. 157-180. ISBN 978-85-352-3136-6.

SKOGEN, J. C.; ØVERLAND, S. The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. **The Royal Society of Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 1-7, 2012. DOI <https://doi.org/10.1258/shorts.2012.012048>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1258/shorts.2012.012048>. Acesso em: 8 nov. 2022.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. [S. l.]: Clannad Editora Científica, 2019. 491 p. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2022.

SUGIMURA, Y.; CUNHA, G. R.; DONJACOUR, A. A. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 961-971, 1986. DOI [doi: 10.1095/biolreprod34.5.961](https://doi.org/10.1095/biolreprod34.5.961). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3730488/>. Acesso em: 19 mar. 2023.

URBONAITE, G. *et al.* The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 909762, 2022. DOI <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.909762>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9354026/#B116>. Acesso em: 4 nov. 2022.

UZGARE, A. R.; XU, Y.; ISAACS, J. 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. DOI <https://doi.org/10.1002/jcb.10764>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.10764>. Acesso em: 13 abr. 2023.

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**, [s. l.], v. 288A, n. 8, p. 885-892, 2006. DOI <https://doi.org/10.1002/ar.a.20363>. Disponível em: <https://anatomypubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.a.20363>. Acesso em: 19 mar. 2023.

WEIBEL, E. R. Selection of the best method in stereology. **Journal of Microscopy**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 261-269, 1974. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1974.tb03938.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4599320/>. Acesso em: 19 mar. 2023.

WEINERT, L. S. *et al.* Diabetes gestacional: um algoritmo de tratamento multidisciplinar. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 435-445, out. 2011. DOI <https://doi.org/10.1590/S0004-27302011000700002>. Disponível

em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/NLm7zgDx85LgZhsLKywtgCB/?lang=pt>. Acesso em: 17 jul. 2022.

WILSON, J. 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, 2011. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889852911000521?via%3Dihub>. Acesso em: 19 mar. 2023.

YU, F. Q. *et al.* ROLE OF ERK1/2 IN FSH-INDUCED PCNA EXPRESSION AND STEROIDOGENESIS IN GRANULOSA CELLS. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 10, p. 896-904, 2005. DOI <https://doi.org/10.2741/1584>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15569628/>. Acesso em: 14 dez. 2022.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 7, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2346>. Acesso em: 1 dez. 2022.

ZACCARDI, F. *et al.* Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, [s. l.], v. 92, n. 1084, p. 63-69, 2016. Disponível em: <https://pmj.bmj.com/content/92/1084/63.info>. Acesso em: 17 jul. 2022.

ZHAO, R. *et al.* Effect of Gestational Diabetes on Postpartum Depression-like Behavior in Rats and Its Mechanism. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 1229, 14 mar. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/nu14061229>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/6/1229/htm>. Acesso em: 17 jul. 2022.

ZORN, T. M. T. Tecido conjuntivo. In: JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 13. ed. Reimpressão. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022). cap. 5, p. 87-116. ISBN 978-85-277-3181-2.