

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

CESAR ALEXANDRE FABREGA CARVALHO

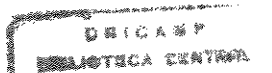
**"EFEITOS DO DIABETES INDUZIDO PELA ALOXANA E DO  
DIABETES ESPONTÂNEO, SOBRE O LOBO DORSAL DA  
PRÓSTATA E GLÂNDULA DE COAGULAÇÃO DE  
CAMUNDONGOS C57BL/6J E NOD"**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Cesar Alexandre  
Fabrega Carvalho  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

17/08/2001

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do título  
de Mestre em Biologia Celular e  
Estrutural na área de Anatomia

Orientador: Prof. Dr. Armando Mancio de Camargo  
Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

INIDADE 70  
 L. CHAMADA:  
T/ UNICAMP  
C253e  
 Ex.  
 OMBO BC/ 46907  
 ROC. 16-392/01  
 C ☐ D ☒  
 REC# R\$ 11,00  
 ATA 02/11/01  
 \* CPD

100161209-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C253e

**Carvalho, Cesar Alexandre Fabrega**

Efeitos do diabetes induzido pela aloxana e do diabetes espontâneo, sobre o lobo dorsal da próstata e glândula de coagulação de camundongos C57BL/6J e NOD /Cesar Alexandre Fabrega Carvalho. –Campinas, SP:[s.n.],2001.

99f.:ilus

Orientador: Armando Mancio de Camargo

Co-orientador: Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

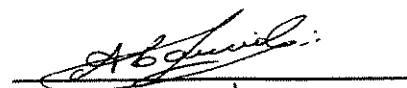
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
 Instituto de Biologia

1.Próstata. 2. Diabetes. I. Camargo, Armando Mancio de.  
 II. Quitete, Valéria Helena Alves Cagnon. III. Universidade  
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

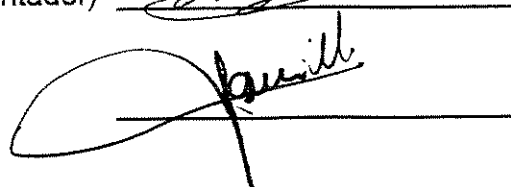
Data da defesa: 17 de Agosto de 2001.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Armando Mancio de Camargo (Orientador)



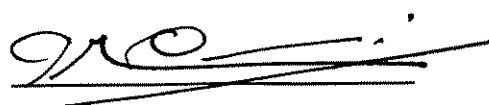
Prof. Dr. José Ângelo Camilli



Prof. Dra. Maria do Carmo Alberto Rincon



Prof. Dr. Atonio Marcos Orsi



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

À minha eterna amada  
Márcia e aos nossos frutos  
Jade & Alecsia

Dedico

### Agradecimentos especiais

A Deus, por não me deixar esmorecer nessa caminhada.

À amada Márcia pela paciência e incentivo em todos os momentos.

À Jade e Alecsia, pelo afeto e o louco amor.

À meus pais Vera e José e toda família.

À co-orientadora e amiga Dra.Valéria Helena Alves Cagnon Quitete.

Ao Dr. José Ângelo Camilli.

### Agradecimentos

UNIVERSIDADE  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos Professores Dr. José Ângelo Camilli, Dra. Maria do Carmo Alberto Rincon e Dr. Antonio Marcos Orsi, pelas valiosas sugestões para a redação final deste trabalho.

À Dra. Iara Maria Silva De Luca pelo auxílio nos estudos morfométricos.

Ao Professor Dr. Carlos Roberto Padovani pela análise estatística dos resultados.

Aos Professores Dr. Hernandes Faustino de Carvalho e Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos pela utilização dos microscópios ópticos.

Aos Srs. Norivaldo Celestino e Marcos Aurélio Ribeiro de Paula pelos valiosos serviços técnicos realizados.

À Sras. Ana Floriana Rodrigues, Lourdes Pinheiro e Silvia Helena Burghi Kalal.

À Sra. Marlene Lima pela valiosa contribuição no tratamento dos animais.

Às Sras. Antonia Maria Ferreira Lima e Adriani Sarti Sprogis, pela colaboração técnica prestada.

À Sra. Lilian Alves Senne Panagio, pela atenção e colaboração.

Aos amigos Iara de Cássia Gomes Coelho, Débora Cristina Coraça e Marcelo Rodrigues Cunha pelo companheirismo e amizade sincera.

Aos colegas de pós-graduação do Departamento de Anatomia.

Ao Sr. José Maurício Fabrega, pelo auxílio informático.

Aos docentes do Departamento de Anatomia/ I.B./ Unicamp pela colaboração na minha formação teórica.

À CAPES e FUNCAMP, pelo auxílio financeiro concedido.

..." só se vê bem com o  
coração, pois o  
essencial é invisível  
para os olhos".  
(Pequeno Príncipe)

Antonie De Sant  
Exuperri

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

## Sumário

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumo</b>                                                         | <b>9</b>  |
| <b>Abstract</b>                                                       | <b>10</b> |
| <b>I - Introdução</b>                                                 | <b>11</b> |
| <b>II – Objetivos</b>                                                 | <b>20</b> |
| <b>III – Materiais e Métodos</b>                                      | <b>22</b> |
| III.1 – Macroscopia                                                   | 24        |
| III.2 – Microscopia de luz                                            | 25        |
| III.3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão                         | 25        |
| III.4 – Morfometria em Nível de Microscopia de Luz                    | 26        |
| III.5 – Análise Quantitativa em Microscopia Eletrônica de Transmissão | 27        |
| III.6 – Análise Estatística                                           | 28        |
| <b>IV – Resultados</b>                                                | <b>30</b> |
| IV.1 – Análise da Urina                                               | 31        |
| IV.2 – Macroscopia                                                    | 33        |
| IV.2.1 – Grupo Controle                                               | 34        |
| IV.2.2 – Grupo Diabético por Aloxana                                  | 34        |
| IV.2.3 – Grupo Diabético Espontâneo NOD                               | 35        |
| IV.2.4 – Análise Estatística                                          | 36        |
| IV.2.5 – Documentação Fotográfica                                     | 37        |
| IV.3 - Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão                 | 46        |
| IV.3.1 – Próstata Dorsal                                              | 47        |
| IV.3.1.1 – Grupo Controle                                             | 48        |
| IV.3.1.2 - Grupo Diabético por Aloxana                                | 49        |
| IV.3.1.3 - Grupo Diabético Espontâneo NOD                             | 50        |
| IV.3.1.4 – Análise Estatística                                        | 52        |
| IV.3.1.5 – Documentação Fotográfica                                   | 53        |
| IV.3.2 – Glândula de Coagulação                                       | 63        |
| IV.3.2.1 – Grupo Controle                                             | 64        |
| IV.3.2.2 - Grupo Diabético por Aloxana                                | 65        |
| IV.3.2.3 - Grupo Diabético Espontâneo NOD                             | 66        |
| IV.3.2.4 – Análise Estatística                                        | 68        |
| IV.3.2.5 – Documentação Fotográfica                                   | 69        |
| <b>V – Discussão</b>                                                  | <b>79</b> |
| <b>VI – Conclusões</b>                                                | <b>88</b> |
| <b>VII – Referências Bibliográficas</b>                               | <b>91</b> |

O Diabetes Mellitus provoca distúrbios reprodutivos levando ao enfraquecimento da fertilidade por alterações morfofuncionais dos testículos e das glândulas sexuais acessórias. Contudo, dúvidas persistem sobre a biologia básica das células epiteliais da próstata dorsal bem como da glândula de coagulação de camundongos diabéticos. Assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar as possíveis alterações estruturais e ultra-estruturais da próstata dorsal e da glândula de coagulação de camundongos diabéticos induzidos quimicamente pela aloxana e dos espontaneamente diabéticos (Nod). No presente trabalho foram utilizados 16 camundongos da linhagem C57BL/6J, com três meses de idade e 8 camundongos Nod com cinco meses de idade. Os camundongos foram divididos em 3 grupos, sendo o grupo I controle e o grupo II diabético por aloxana e o grupo III diabético Nod. Os animais do grupo II receberam cinco injeções de aloxana com as três primeiras doses de 75mg/kg de peso para cada animal. Os animais do grupo I e III receberam apenas injeções de tampão citrato (pH 4.4, 0,1M) nas mesmas condições do grupo II. Após trinta dias da constatação do estado diabético do grupo II, todos animais foram sacrificados e fixados *in situ* por perfusão com solução de Karnovsky através do ventrículo cardíaco esquerdo. A seguir, a próstata dorsal e a glândula de coagulação foram retiradas e processadas para estudos estrutural e ultra-estrutural e análise morfométrica. Nos resultados histológicos observou-se: espessamento do estroma, mucosa pouco pregueada, atrofia do epitélio secretor. Ultra-estruturalmente verificou-se: involução das cisternas do retículo endoplasmático granular, desorganização das cisternas do aparelho de Golgi e vacuolização do citoplasma celular. Com base nos resultados, podemos concluir que tanto a próstata dorsal como a glândula de coagulação sofreram drásticas alterações morfológicas, principalmente nas organelas envolvidas no processo secretor frente ao diabetes mellitus do tipo I.

The Diabetes Mellitus causes alterations of the male reproductive system, leading a decrease in fertility as a result of morphophysiological alterations of the testes and accessory sex glands. There are doubts about the basic biology of epithelial cells from the dorsal prostate as well as from the coagulation gland of experimental diabetic mice. By this way, the goal of this present work is to analyze the possible structural and ultrastructural alterations of the dorsal prostate and the coagulation gland of spontaneous diabetic mice (Nod) and the alloxan chemical induced ones. At the present work, it was utilized 16 three-months old mice from the C57BL/6J lineage and 8 five-months old Nod mice. The mice were split into 3 groups, being control the group I, alloxan diabetic mice the group II and diabetic Nod mice the group III. The animals of group II got 5 alloxan injections with the three first doses of 75mg/kg of each animal weight. The animals of group III and I got injections of only citrate buffer (pH 4.4, 0.1M) in the same conditions of group II. After thirty days of diabetic state knowledge from group II, all animals were sacrificed and *in situ* fixed by Karnovsky solution perfusion through the left ventricle. Then, the dorsal prostate and the coagulation gland were removed and processed for structural and ultrastructural studies and morphometric analyses. At the histological evaluation, it was observed: stroma thickness, a few folding mucous membrane and the atrophy of secretor epithelium. Ultrastructural evaluation showed: involution of the rough endoplasmatic reticulum cisterns, disorganization of Golgi apparatus cisterns and cellular cytoplasmatic vacuolization. Based on this results, we conclude that not only the dorsal prostate but also the coagulation gland suffered drastic morphological alterations, mainly in the organelles involved in the secretor process of the group I diabetes mellitus.

## I - INTRODUÇÃO

## I - INTRODUÇÃO

O diabetes é uma doença tão antiga quanto a própria humanidade. Um documento chamado Ebers, descrito 1500 anos antes de Cristo, faz referência a uma doença caracterizada por emissão freqüente e abundante de urina. No ano 50 da era cristã, o diabetes foi descrito como uma “poliúria indolor, com emaciação (emagrecimento) e perigo”. Arateus, médico romano da era cristã, relatou uma doença cujos principais sintomas eram eliminação copiosa de urina, sede incontrolável e emagrecimento, levando a influência nociva sobre a bexiga urinária e os rins. Outro pesquisador da época notou que a retirada do pâncreas provocava vários sintomas, porém não correlacionou esses achados com o diabetes. A relação causal entre o diabetes e pâncreas foi caracterizada pela primeira vez por Cawley em 1788, ao observar a destruição do pâncreas na necropsia de um diabético. Em 1869, Langherans descobriu as ilhotas celulares no tecido pancreático confundindo-as com gânglios linfáticos. Mas foi Massiglia em 1912, quem demonstrou que a glicosúria era resultado da destruição dessas ilhotas. Todavia, Banting (apud, Arduíno,1962) foi quem descobriu e isolou a insulina e comprovou que a injeção desse hormônio diminuía a taxa de glicose em cães, submetidos a pancreactomia (Arduíno,1962).

O pâncreas é uma glândula anficrina, ou seja, tanto de secreção exócrina como endócrina. A porção endócrina está representada por cerca de um milhão de unidades celulares microscópicas denominadas “Ilhotas de Langherans”. As ilhotas são agregados de diferentes tipos celulares, das quais 70% estão representadas por células Beta. As células Beta sintetizam e secretam a insulina estimuladas pela concentração de glicose no sangue (Nattras e Halles,1988). A insulina é um polipeptídio composto por duas cadeias de aminoácidos. Esse hormônio tem importante papel na regulação de várias patologias do metabolismo, incluindo o de carboidrato, armazenamento de glicogênio, síntese de ácidos graxos, transporte de aminoácidos e síntese de

DNA, RNA e proteínas (Anderson, Suleiman, Garrett, 1994). Todavia, quando as células Beta deixam de executar suas funções, seja por fatores hereditários ou relacionados à obesidade, caracteriza-se um quadro patológico denominado Diabetes Mellitus (Byrne, 1996; Guyton, 1996).

Nos seres humanos, duas formas clínicas de diabetes são conhecidas: o diabetes do tipo I (infanto-juvenil) ou Diabetes Mellitus Dependente da Insulina (IDDM), que resulta em severa ou absoluta falta de insulina, além de grande tendência a cetose e o diabetes do tipo II (adulto) ou Diabetes Mellitus Não Dependente de Insulina (NIDDM) caracterizado por estabilidade e relativa insensibilidade à insulina, com ausência de cetoses. A obesidade é uma das características marcantes do diabetes tipo II, o qual leva a diminuição do número de receptores de insulina nas células alvo, tornando a quantidade de insulina ineficiente (Elenberg & Rifkin, 1962; Robbins, 1989).

É estimado que o diabetes do tipo I manifesta-se, aproximadamente, em 10% dos pacientes diabéticos do ocidente (Stefan, 1996). Dados recentes mostram que 7,8% para cada 100 mil habitantes, entre 30 e 65 anos de idade são portadores desse tipo de diabetes (Guia de Vigilância Epidemiológica do Brasil, 1998). Nos Estados Unidos, o diabetes é responsável por 2% dos óbitos estando entre as dez doenças que mais matam nesse país. Além disso, é uma doença que debilita os portadores levando-os a várias complicações como: deficiências renais, vasculares, oftálmicas, neurológicas e impotência sexual e, na maioria dos casos, leva o indivíduo ao afastamento das atividades de trabalho (Stefan, 1996).

Apesar do conhecimento das várias complicações que os indivíduos diabéticos apresentam, pouco se sabe sobre a etiologia dessa doença e isto se deve a vários fatores tais como: a idade com que a doença manifesta-se e a incidência nos diferentes grupos étnicos e geográficos (Creutzfeld, et.al, 1976). Contudo, várias tentativas tem sido realizadas para elucidar como, quando, porque

e quais os efeitos deletérios nos sistemas orgânicos e se esses podem ser revertidos através de tratamentos e ou dieta.

Isto posto, a utilização de animais que apresentam o diabetes, tanto por indução química ou por espontaneidade é muito comum. Para obtenção de um animal diabético por indução química são utilizadas drogas como a estreptozotocina e a aloxana. Essas, agem diretamente nas células beta do pâncreas provocando nos animais, um estado diabético irreversível. (Seethalakshmi, et al, 1987; Saprykina, et al,1998; Perez, et al,1998; Kovacs, et al,1998; Palomar-Morales, et al,1998; Lee, Park, Choi,1999; Yildirim, et al,1999; Orie e Anyaegbu,1999; Ravikumar e Anuradha,1999; Avedano, et al,1999). Os animais utilizados nesses experimentos são tanto cães como roedores. Além de alguns roedores, como o camundongo da linhagem C57BL/Ksj homozigotos diabéticos (db/db), o Wistar Chinês (Herberg & Coleman,1977) e Nod (diabético não obeso) (Makino et al.,1980) que apresentam síndrome semelhante ao diabetes humano tipo II e I, respectivamente. Tanto os animais tratados como os espontaneamente diabéticos, apresentam sintomas como: polidipsia, poliúria, polifagia e emaciação, sintomas esses próximos ao diabético humano. Além desses sintomas, vários autores demonstraram que esses animais manifestam varias doenças como aterosclerose, retinopatias, nefropatias e distúrbios sexuais (Gomore e Goldner,1943; Fushini et al.,1980; Shunk Mei-Ho, 1990).

Diferentes pesquisadores têm demonstrado que o diabetes provoca alterações no aparelho reprodutor masculino tanto em seres humanos quanto em animais de laboratório. Frenkel, et al.(1977) e Daubrese, et al.(1978) observaram distúrbios sexuais em pacientes diabéticos, cuja principal evidência era a impotência sexual e a diminuição da fertilidade. Estudos paralelos com ratos diabéticos, induzidos pela estreptozotocina demonstraram alterações similares nos órgãos sexuais acessórios desses animais como: diminuição do peso, e atrofia do epitélio secretor. A correlação da impotência sexual e da infertilidade em indivíduos diabéticos foi descrita por Oksanen (1975), que atribuiu essas mudanças ao desequilíbrio no eixo hipotálamo-hipófise-gônadal. No mesmo

trabalho ele constatou a diminuição dos pesos testiculares, da próstata e a redução do diâmetro do ducto deferente, da fertilidade e da espermatogênese. Jackson e Hutson (1984) associaram a diminuição do peso dos órgãos sexuais acessórios com redução do nível de testosterona e da gonadotrofina no soro sanguíneo. Paz, et al. (1978) e Seethalakshmi, et al. (1987) observaram diminuição da espermatogênese e da fertilidade acompanhadas por diminuição dos pesos dos órgãos sexuais acessórios em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Fukumoto, et al. (1993) verificaram diminuição significativa no nível médio de testosterona do plasma sanguíneo e no peso prostático de ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Crowe, et al. (1987) evidenciaram atrofia do epitélio secretor, do músculo liso, aumento do lúmen do ácino e diminuição do interstício da próstata ventral. Cagnon, et al. (2000) verificaram que o epitélio secretor da próstata ventral de camundongos diabéticos, à microscopia de luz sofreram marcada atrofia, núcleo ocupando grande parte do citoplasma, diminuição do pregueamento da mucosa e lúmen do ácino com restos celulares dispersos na secreção. Ultra-estruturalmente, os mesmos autores caracterizaram atrofia do citoplasma, dilatação das cisternas do Golgi, acúmulos de corpos densos e vacuolização do citoplasma. Também, existem estudos que atribuíram os efeitos do diabetes como responsável pela diminuição do número de receptores androgênicos nucleares, condição esta, que pode estar associada à diminuição de insulina ou aproveitamento da glicose no tecido (Shunk Mei-Ho, 1991). Contudo, se sabe que a manutenção das células prostáticas de camundongos em meio de cultura (in-vitro) reagem melhor quando a testosterona e a insulina são usados simultaneamente (Lostroh, 1971).

A próstata e a glândula de coagulação são glândulas sexuais acessórias cujas secreções têm fundamental importância no processo reprodutivo (Price & Williams-Ashmam, 1961; Cavazos, 1975; Mann & Lutwuk-Mann, 1981). Enquanto a próstata é encontrada em todas as ordens de mamíferos (Price, 1963), a glândula de coagulação está presente somente em coelhos, ratos, hamsters, cobaias e macacos (Sjostrand, 1965).

A próstata é uma glândula sexual acessória amplamente estudada devido às diferentes patologias que acometem esse órgão. Dentre essas destacam-se a hiperplasia prostática benigna e o carcinoma prostático. Nos Estados Unidos o câncer de próstata leva a óbito aproximadamente 2% da população. Essa doença acomete principalmente homens com mais de 60 anos de idade. Na fase avançada da doença, ela obstrui o canal da micção e, em alguns casos, provoca metástase. (Guyton & Hall, 1994).

A próstata humana é freqüentemente descrita como uma glândula compacta, com forma de “castanha” pesando aproximadamente 20g. Ela está localizada ao redor da uretra, inferiormente à bexiga urinária. Nela são descritas três regiões glandulares, sendo as zonas periférica, a central e a pré-prostática envoltas por uma fina camada fibromuscular (Setchell & Brooks, 1988). A secreção prostática tem aspecto líquido alcalino composto por ácido cítrico, cálcio, fosfatase ácida e enzimas coaguladoras. Esta composição permite aos espermatozóides condições ideais antes e após a ejaculação permitindo o sucesso na fertilização do óvulo (Huggins & Johanson, 1932; Guyton & Hall, 1994). Nos roedores, a próstata divide-se em três pares de lobos distintos sendo o ventral, o lateral e o dorsal de acordo com a localização ao redor da uretra prostática (Jesik, et.al.1982). Esses lobos estão conectados à uretra por uma série de ductos e são funcionalmente similares à próstata humana. (Brandes, 1966, 1974; Aumüller, 1979; Jesik, et.al.1982). Nos roedores, a glândula de coagulação faz parte do complexo prostático. Essa glândula localiza-se na concavidade da vesícula seminal e está ligada à uretra por um único ducto, (Jesik, et.al.1982) sendo conhecida também como próstata anterior. Embriologicamente é sugerida homologia entre a glândula de coagulação dos roedores e o lobo prostático médio no homem (Price,1963).

O lobo dorsal da próstata de ratos localiza-se dorsalmente à uretra (Jesik, et.al.1982). Dentre suas funções destacam-se a coagulação do sêmen, através da enzima transglutaminase (Aumüller 1988), secreção de proteínas dorsais I e II (Wilson, 1981) e carbono-anidrase II (Härkönen & Väänänen, 1988).

À microscopia de luz, a próstata dorsal é uma glândula túbulo-alveolar constituída por ácinos envoltos por estroma. O tecido estromal é constituído por vários elementos que incluem, terminações nervosas, vasos sanguíneos, fibras musculares, fibras colágenas, fibras elásticas e fibroblastos (Narbaitz, 1975; Flickinger, 1979). O epitélio secretor é simples com células colunares. Os núcleos das células são ovais e localizam-se na região central do citoplasma (Jesik, et.al. 1982). Ultra-estruturalmente, as células do lobo dorsal caracterizam-se pela dilatação das cisternas do retículo endoplasmático granular no citoplasma basal. O complexo de Golgi localiza-se na região apical e é formado por cisternas achatadas dispostas paralelamente. Lisosomas e vários tipos de corpos residuais são demonstrados. Vacúolos contendo produtos de secreção com aspecto fino e granular encontram-se localizados na zona apical das células. O núcleo é esférico com cromatina disposta centralmente e nucléolo evidente (Dahl, et.al. 1973).

A glândula coaguladora ou de coagulação está localizada na face côncava de cada vesícula seminal, intimamente aderida a elas por tecido conjuntivo. O primeiro estudo sobre a morfologia da glândula de coagulação foi realizado por Walker em 1910 (Cavazos, 1975).

Macroscopicamente, a glândula de coagulação em cobaias é descrita como órgãos piramidais lobulados de textura frouxa e cor rosada (Vicentinni, et al. 1984). A transglutaminase é o principal enzima secretado por essa glândula apresentando-se, primariamente, responsável pela coagulação das proteínas da vesícula seminal e formação do tampão copulatório na vagina das fêmeas após a cópula (Notides & Willians-Ashaman, 1967; Bradshal & Wolf, 1977), evitando o refluxo dos espermatozóides.

À microscopia de luz, a glândula de coagulação é formada por túbulos largos caracterizando os ácinos. Cada ácino é envolto por tecido conjuntivo e músculo liso. A mucosa forma extensas pregas. O epitélio secretor é simples com células colunares altas. O núcleo é oval e localiza-se no centro da célula com cromatina densa e visível nucléolo. O citoplasma é granular e insignificamente basófilo. (Wong & Tse, 1981; Vicentini, et.al. 1984). Ultra-estruturalmente, o epitélio

da glândula de coagulação é formado por células do tipo colunar entremeadas por pequenas e eventuais células basais que repousam sobre fina lâmina basal. O núcleo é oval com o envelope nuclear discretamente denteado localizado no centro da célula. O citoplasma da célula secretora é caracterizado por extensa dilatação das cisternas do retículo endoplasmático granular, contendo material granular de baixa eletrondensidade. As mitocôndrias distribuem-se uniformemente por todo citoplasma. O complexo de Golgi é bem desenvolvido na região supranuclear. Os vacúolos são poucos e contêm em seu interior materiais de baixa eletrondensidade. Eventuais vacúolos digestivos contendo corpos multivesiculares são observados (Wong & Tse, 1981). O mecanismo secretor das células epiteliais da glândula de coagulação é apócrino e o armazenamento desses produtos são realizados por longo período nas cisternas do retículo endoplasmático granular (Brandes, 1966, Hawkins & Geuse, 1977).

As glândulas sexuais acessórias masculinas são andrógeno-dependentes. Órgãos cuja manutenção da integridade estrutural e funcional depende da presença constante desses hormônios circulantes. Entretanto, a depleção andrógena seja por fotoperiodicidade, orquidectomia experimental ou anti-hormônios resulta em dramáticas alterações metabólicas, bem como declínio na atividade secretora, síntese de DNA e RNA e diminuição no número de receptores andrógenos (Renine, 1984). A testosterona é o andrógeno circulante mais importante no homem sendo 95% de origem testicular e os 5% restante produzido pelas glândulas adrenais (Aumüller & Ceeis, 1990). Do total de testosterona circulante, somente 10% entra nas células prostáticas por transporte passivo, onde são transformadas em dihidrotestosterona (DHT). Essa transformação é realizada pelo enzima  $5\alpha$ -redutase através da ativação dos receptores androgênicos ligado ao DNA nuclear. (Prins, 1989; Aumüller & Seitz, 1990). Nos roedores, a enzima  $5\alpha$ -redutase está presente em todos os lobos prostáticos. Entretanto, a inibição desse enzima impede a conversão da testosterona, na forma ativa que é a dihidrotestosterona (DHT), impedindo a manutenção do epitélio sec retor.

A castração é um dos métodos mais utilizados para o entendimento dos mecanismos da testosterona, para a manutenção e funcionamento das glândulas sexuais acessórias. É conhecido que essa condição induz a atrofia da vesícula seminal, ducto deferente, próstata e glândula de coagulação.(Martins & Valle,1938; Martins,1939; Wakade, et al.1975; Sjöstrand & Swendin, 1976), bem como, mudanças na excitabilidade, sensibilidade e contractibilidade dessas glândulas (Picarelli & Valle,1969; Jurkiewisk, et al.,1977; Markus, et al., 1980).

Segundo Shain, et al.(1975) e Prins (1989), em estudos com ratos castrados, observaram diferentes tipos de receptores androgênicos entre os três pares de lobos prostáticos. Além disso, os autores constataram que os receptores de membrana nuclear dos lobos dorsais e ventrais são primariamente regulados por andrógenos. Para os lobos laterais existe um fator independente da testosterona, sendo secundariamente regulados por esse hormônio. Cavazos (1975) descreveu as principais alterações celulares após a diminuição dos níveis de testosterona em ratos castrados sendo esses: atrofia celular, diminuição da atividade secretora, formação de lisossomos e desenvolvimento de grânulos de lipofucina.

## **II -OBJETIVO**

## **II – OBJETIVO**

Apesar do vasto conhecimento dos efeitos do diabetes sobre os diferentes sistemas orgânicos, dúvidas persistem em relação à morfologia glândulas sexuais acessórias. Dessa forma, o principal objetivo do presente estudo foi analisar as possíveis alterações estruturais e ultra-estruturais dos epitélios secretores da próstata dorsal e da glândula de coagulação de camundongos C57Bl/6j e NOD frente ao diabetes do tipo I.

### **III – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **III – MATERIAIS E MÉTODOS**

No presente trabalho foram utilizados 24 camundongos, sendo 16 da linhagem C57BL/6J, com 3 meses de idade pesando, em média, 23 gramas e 8 da linhagem NOD (diabético não obeso), com 5 meses de idade pesando, em média, 29 gramas. Os animais foram divididos em 3 grupos: um grupo controle, um grupo diabético por aloxana e outro diabético espontâneo, conforme segue abaixo:

Grupo I: controle (8 animais)

Grupo II: diabético pela aloxana (8 animais)

Grupo III: diabético espontâneo (NOD) (8 animais)

Os animais do grupo II receberam 5 injeções, via intraperitoneal, de 75mg/kg de aloxana monohidratada (Sigma Chemical Company) diluída em tampão citrato a 0,1M e pH4,4, com intervalos de 7 dias cada. Os animais dos grupos I e III receberam somente 0,1ml de tampão citrato a 0,1M e pH 4,4 nas mesmas condições experimentais que os do grupo diabético por aloxana. Antecedendo as injeções, os animais dos três grupos permaneceram em jejum durante 24 horas.

Nos animais pertencentes ao grupo diabético por aloxana realizou-se monitoramento da urina, tanto antecedendo como após as injeções da droga. A urina desses animais foi coletada através de compressão manual na região da bexiga urinária desprezando-se a primeira gota. A seguir, o concentrado de urina foi colocado em contato com fita reagente (Multistix 10SG, BAYER) para mensuração do nível de glicose, do pH e de proteína. É importante destacar que, no período que antecedeu o início do tratamento foram realizados dois testes de glicosúria tanto nos animais do grupo I como do grupo II. Esses testes foram feitos como controle padrão e para certificação da ausência de níveis de glicose que caracterizassem o estado diabético.

Os pesos corpóreos dos animais foram monitorados ao longo do experimento. É importante destacar que, todos os procedimentos realizados nos animais obedeceram o mesmo padrão de horário. Após 30 dias da constatação do

estado diabético do grupo II, os camundongos foram anestesiados com Francotar/Virbaxil (1/1), na dosagem de 0.25ml para cada 100g de peso corpóreo e procedeu-se a coleta de amostras da próstata dorsal e da glândula de coagulação. Simultaneamente, os animais pertencentes aos grupos I e III foram submetidos a procedimentos similares para coleta das amostras. Os animais dos três grupos experimentais receberam como dieta sólida ração Purina na forma de grânulos e água como dieta líquida ad-libitum.

Do total de animais experimentais, 12 foram analisados em nível de microscopia de luz e outros 12 submetidos à análise em nível de microscopia eletrônica de transmissão.

### III.1 – Macroscopia

Os animais foram anestesiados com Francotar/Virbaxyl (1/1), na dosagem de 0,25 ml para cada 100 gramas de peso corpóreo. A seguir foram colocados em decúbito dorsal e realizou-se incisão da parede abdômino-pélvica, expondo-se o complexo urogenital que inclui: próstata, vesícula seminal, glândula de coagulação, uretra, porção do ureter, testículo, ducto deferente e bexiga urinária. Após a dissecação, com o uso e auxílio do microscópio cirúrgico DF Vasconcelos, o complexo urogenital foi fotografado in situ. Na etapa seguinte esses órgãos foram retirados, pesados e fotografados com máquina modelo Stotimatic-F com objetiva macro 50 mm e filme Kodak Gold Asa 100.

É importante salientar que a próstata dorsal não foi pesada devido a continuidade com a próstata lateral, destacando-se, uma região de transição entre os lobos, conhecida como ístmo.

### III.2 – Microscopia de Luz

As amostras do lobo dorsal da próstata e da glândula de coagulação foram coletadas de quatro animais de cada grupo experimental e fixadas em solução de Bouin (solução aquosa saturada de ácido pícrico – 75 ml de formol – 25 ml, ácido acético glacial - 5 ml) por quatro horas.

Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool 70% por trinta minutos e a seguir sofreram desidratação em uma série crescente de álcoois (álcool 80% - duas vezes, álcool absoluto – três vezes; 1 a 2 horas cada). Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por 2 horas. Após essa etapa, os fragmentos foram incluídos em parafina (Paraplast Plus) a 56° C em estufa por uma hora. A seguir, o material foi seccionado em micrótomo (Biocut – Modelo 1130), obtendo-se cortes com espessura de 4 micrômetros. Posteriormente, esse cortes foram colocados em lâminas albuminizadas e levadas para estufa com temperatura de 60° C. Finalmente, o material foi corado com tricrômico de Masson e fotografado no fotomicroscópio (Nikon Eclipse E-400).

### III.3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Os animais destinados ao estudo ultra-estrutural foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução de salina heparinizada com posterior fixação com solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). A glândula de coagulação e o lobo dorsal da próstata foram coletados e fragmentados, com aproximadamente 5mm de espessura. Em seguida, os fragmentos foram submetidos ao complemento da fixação por imersão no mesmo fixador por 6 horas e, pós-fixados em tetróxido de Ósmio a 1% em tampão fosfato, 0,1M, pH7.4 por duas horas. A seguir, os fragmentos foram lavados em água destilada e contrastados com acetato de uranila a 0,5% em solução aquosa de sacarose por 12 horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em série crescente de acetona

e incluídos em resina (Polyscience). Em seguida, os blocos foram cortados em um ultramicrotomo LKB 8800 ultratome III com 0.5 a 0.8 micrômetros de espessura. Os cortes semifinos foram realizados com navalha de vidro, montados em lâminas e corados com azul de toluidina a 1%, para escolha da região desejada. A seguir, fizeram-se cortes ultrafinos os quais foram montados em telas de cobre de 200 mesh e pós-contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Posteriormente, foram examinados e fotografados em um microscópio eletrônico de transmissão LEO-906.

#### III.4 - Morfometria em Nível de Microscopia de luz

Para o estudo morfométrico foram utilizados 4 animais de cada grupo (controle, diabético por aloxana e diabético espontâneo). As secções da glândula de coagulação e o lobo dorsal da próstata foram provenientes das lâminas histológicas coradas com tricrômico de Masson.

Para quantificação do volume nuclear foram medidos os diâmetros de 50 núcleos tanto das células epiteliais da próstata dorsal quanto da glândula de coagulação, de cada animal, totalizando 200 núcleos em cada grupo estudado. A escolha dos núcleos foi casual, priorizando os com limites celulares definidos. As medidas foram realizadas com auxílio da ocular graduada (10X) acoplada ao microscópio de luz Olympus CBB, fixando-se as observações com a objetiva de 100X. A calibragem da ocular foi realizada através de lâmina especial, com divisões de 0,01mm (10 µm) para obtenção da unidade em micrômetros. A partir desses valores foram calculadas as médias dos volumes dos núcleos através da seguinte fórmula:  $V = \frac{4}{3} \pi (d/2)^2 D/2$ , sendo “d” diâmetro menor. “D” diâmetro maior e “r” raio do núcleo. Além disso, foram realizadas medidas para determinação quantitativa das frações de volume (Vv) ocupadas pelo núcleo e

pelo citoplasma das células epiteliais da próstata dorsal e da glândula de coagulação. Essas mensurações foram feitas através de uma ocular 10X contendo um retículo de integração quadrilátero com 100 pontos acopladas ao microscópio de luz Olympus CBB e objetiva de 100X. Através desse retículo foram observados e contados os pontos localizados sobre os núcleos e sobre o citoplasma das células de cinco campos previamente definidos. A fração de volume ocupada pelo núcleo em relação ao citoplasma foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$V_v = p/P$$

$V_v$  = densidade de volume ou fração de volume (%)

$p$  = número de pontos sobre o núcleo

$P$  = número total de pontos ou soma dos pontos sobre os núcleos e citoplasmas nos diferentes campos.

### III.5 – Análise Quantitativa em Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para o estudo morfométrico foram utilizadas eletromicrografias obtidas no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906, de quatro animais de cada grupo experimental. Tanto para a próstata dorsal como para glândula de coagulação foram escolhidas as regiões que apresentavam células com núcleo visível, lâmina basal e ápice evidentes. Três células com essas características foram fotografadas com aumento de 3597 vezes e ampliação de 3 vezes. O total de células fotografadas por grupo experimental foram 12. Para esta análise foi aplicado o Sistema-teste de Weibel. Esse sistema é representado por 84 segmentos de retas paralelas com 1,7 cm de comprimento os quais foram reproduzidos em acetato. O acetato foi fixado sobre as eletromicrografias com auxílio de grampos de papel. Para tais mensurações foram considerados como “hits” ou pontos sobre a estrutura, quando a extremidade de um segmento se encontrava sobre a organela em estudo e como “crosses” as intersecções desses

segmentos com as organelas avaliadas. O total de pontos sobre cada citoplasma celular foi obtido multiplicando-se os 84 segmentos por 2 e subtraindo-se aqueles que se encontravam sobre o núcleo e o espaço intercelular.

Para quantificar a densidade de área ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) e a área ( $\mu\text{m}^2$ ) ocupada pelos vacúolos digestivos, nas células epiteliais da próstata dorsal e da glândula de coagulação de cada grupo experimental, utilizou-se a estereologia. Esses cálculos foram realizados a partir do número total de pontos sobre o citoplasma ( $n'$ ) do total de pontos sobre cada tipo de grânulo ( $n$ ), da soma do total de intersecções ou “crosses” ( $c$ ), e do número da linha do sistema-teste ( $L$ ).

### III.6 – Análise Estatística.

O estudo estatístico foi realizado para as seguintes variáveis: peso corpóreo final (g), peso da glândula de coagulação (g), volume ( $\mu\text{m}^3$ ) e forma nuclear, volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ ) e densidade de área dos vacúolos digestivos ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) das células secretoras da próstata dorsal e glândula de coagulação. Para a avaliação dos pesos corpóreos utilizou-se análise de medidas repetidas, considerando-se os pesos finais médios dos grupos, complementados com a construção dos intervalos de confiança simultânea. Para os pesos das glândulas de coagulação, as avaliações foram realizadas através da técnica de análise de variância para o modelo com um fator de variação, complementado com teste de médias de Tukey. Para o volume nuclear, forma do núcleo ( $f$ ) e volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ ) utilizou-se o teste não paramétrico de K.W, complementado com o teste de comparações múltiplas de Glausier. Todas as análises foram realizadas com níveis de 5% de significância (Wichern & Johnson, 1992).

É importante destacar que, os animais do grupo diabético espontâneo (NOD), não tiveram os pesos corpóreos monitorados ao longo do experimento. Esse fato, deve-se à dificuldade de se obter animais machos com 3 meses de

idade diabético positivo. Os animais NOD manifestam a doença, geralmente, após 5 meses de idade. Da prole total (machos) apenas 5% manifestam a doença. Contudo, quando um animal fica diabético, há necessidade de rapidamente sacrificá-lo pois vai à óbito em poucos dias.

## **IV – RESULTADOS**

## **IV.1 – ANÁLISE DE URINA**

#### IV.1 - ANÁLISE DA URINA

Os níveis de glicose e proteína na urina dos animais do grupo diabético por aloxana e diabético NOD foram elevados quando comparados aos animais do grupo controle. Por outro lado, o pH foi similar entre os três grupos experimentais (Tabela 1)

Tabela 1– Caracterização dos níveis médios de proteínas, glicose e pH.

|                     | Controle | Diabético Aloxana | Diabético Nod |
|---------------------|----------|-------------------|---------------|
| Proteína<br>(mg/dl) | 30       | 100               | 100           |
| Glicose<br>(mg/dl)  | Negativo | 2000              | 2000          |
| pH                  | 6,0      | 6,0               | 6,5           |

## **IV.2 – MACROSCOPIA**

## **IV.2 - MACROSCOPIA**

### **IV.2.1 - Grupo Controle**

Os animais do grupo controle apresentam peso médio corpóreo final de 29,23g aos 30 dias de experimento ( Tabela 2 e Figura 1 A).

A próstata dorsal localiza-se dorsalmente à uretra. Cranialmente ela faz sintopia com as vesículas seminais e com as glândulas de coagulação (Figura 2B) Esta é formada por dois lobos de textura frouxa e cor rosada.

A glândula de coagulação localiza-se na face côncava da vesícula seminal, à qual esta intimamente aderida por tecido conjuntivo. É um órgão de forma piramidal, lobulado de textura frouxa e cor rosada (Figura 2 A e 2 B). O peso médio da glândula de coagulação é de 0,025g (Tabela 3).

### **IV.2.2 – Grupo Diabético por Aloxana**

O peso médio corpóreo final dos animais do grupo diabético por aloxana é 24,67g sendo esse, significativamente menor após 30 dias de caracterizado o estado diabético quando comparado ao controle (Tabela 2). Macroscopicamente, não são evidenciadas mudanças marcantes nesse grupo experimental quando comparado ao grupo controle (Figura 1 B).

A localização anatômica e os aspectos macroscópicos tanto da próstata dorsal como da glândula de coagulação são semelhantes aos animais do grupo controle (Figura 3 A e 3 B). O peso médio da glândula de coagulação é 0,030g sendo esse, numericamente maior que a dos animais do grupo controle (Tabela3).

**IV.2.3 – Grupo Diabético Espontâneo (NOD)**

A localização e os aspectos morfológicos da próstata dorsal e da glândula de coagulação são semelhantes aos animais do grupo controle (Figura 4 A e 4 B). Entretanto, o volume da glândula de coagulação encontra-se, aparentemente, exacerbado. Esse dado é confirmado pelo peso médio dessa glândula (0,052g), sendo significativo quando comparado aos animais dos grupos anteriores. (Tabela 3).

Tabela 2- Média, desvio padrão e resultado do teste do peso corpóreo (g) final dos animais controles e diabéticos por aloxana após 30 dias da constatação do estado diabético.

| Controle   | Peso final (PF)       |  | Resultado do teste |
|------------|-----------------------|--|--------------------|
|            | Diabético por aloxana |  |                    |
| 29,23±1,38 | 24,67±1,38            |  | (P< 0,05)          |

Tabela 3- Média, desvio padrão e resultado do teste estatístico da comparação do peso (g) da glândula de coagulação nos diferentes grupos experimentais.

| Grupos        |                   |               | Resultado do teste |
|---------------|-------------------|---------------|--------------------|
| Controle      | Diabético Aloxana | Diabético Nod |                    |
| 0,025±0,007 a | 0,030±0,015 a     | 0,052±0,021b  | 6,19 (P<0,01)      |

\* "a" e "b" = comparação média entre os grupos experimentais.

**Figura 1** Vista geral dos camundongos experimentais. A: Controle, B: diabético aloxana e C: diabético espontâneo, X1.

Figura - 1

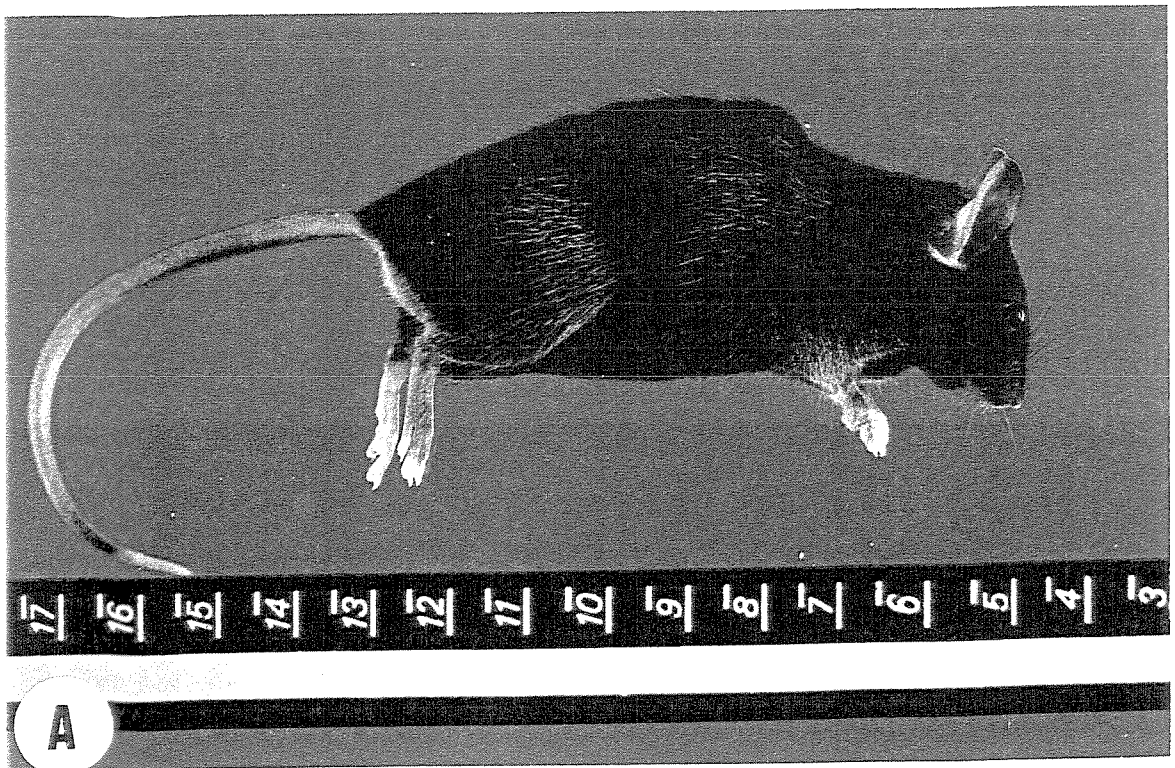
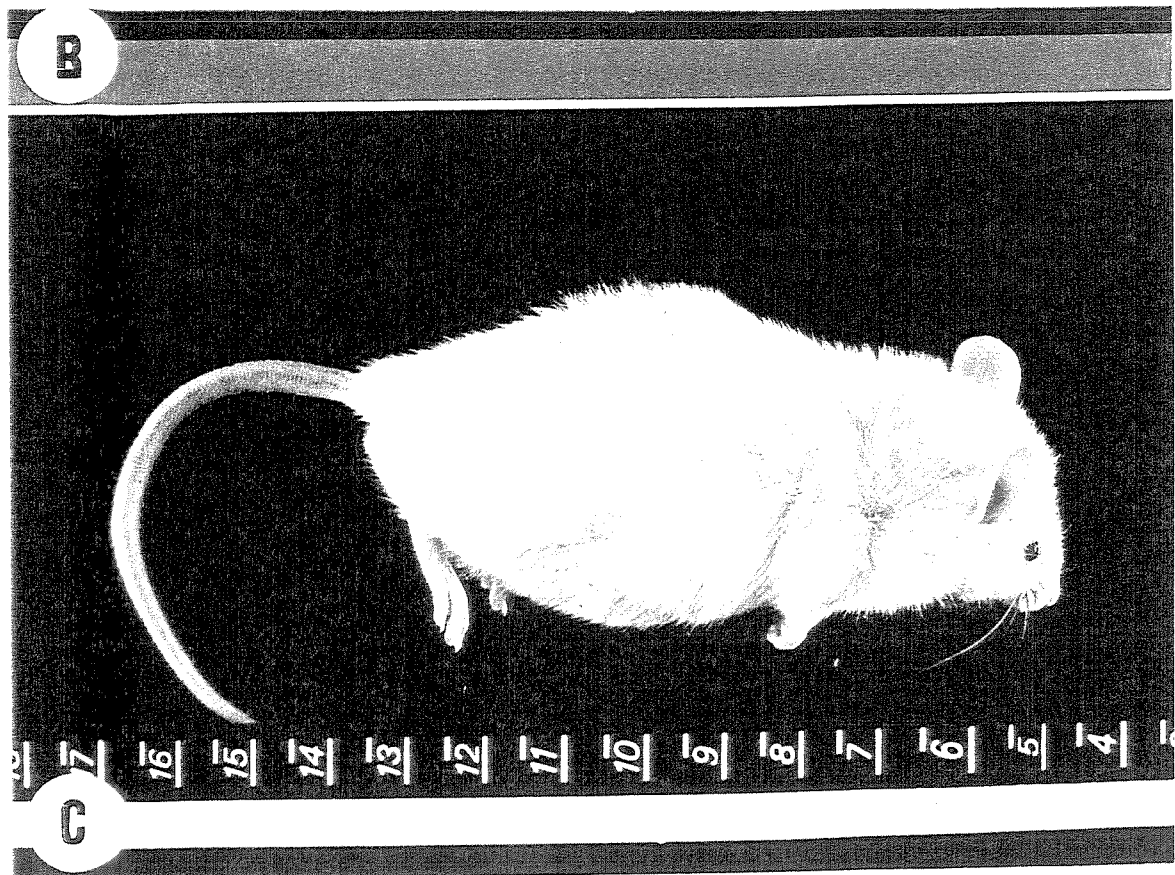
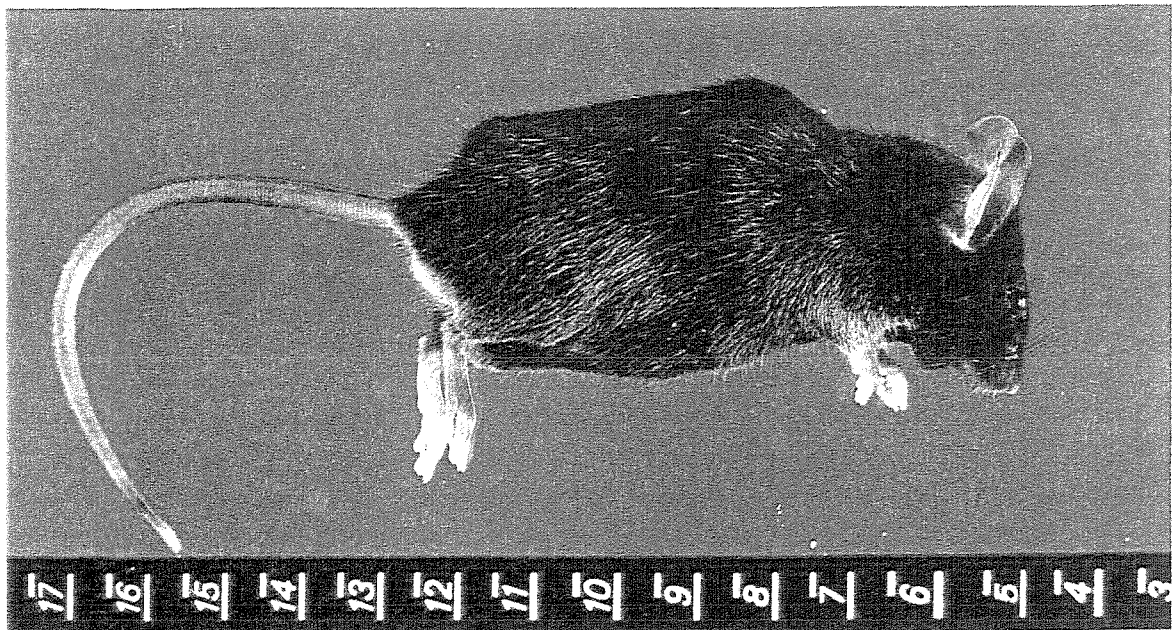


Figura - 1

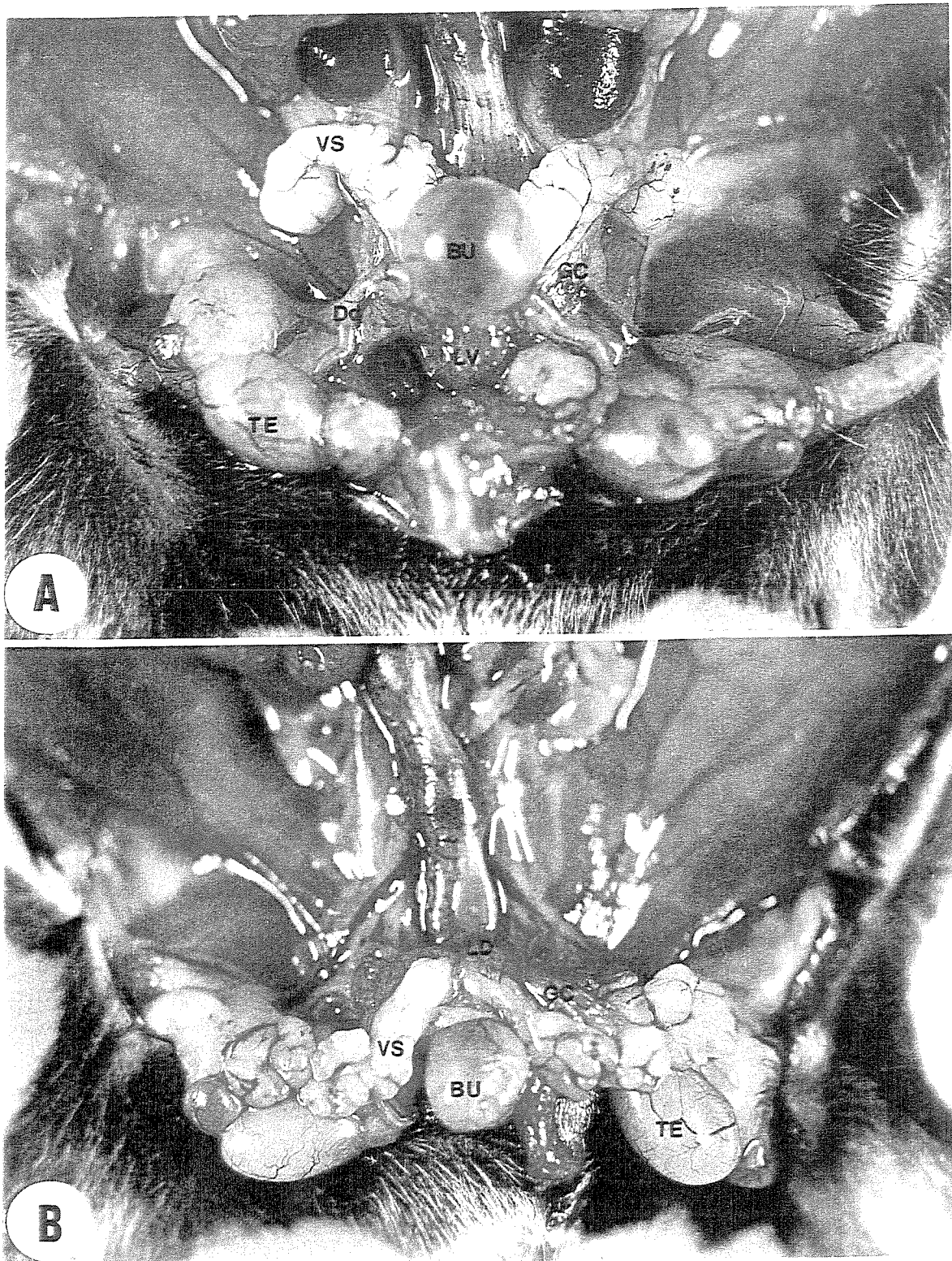


**Figura 2** Exposição do complexo urogenital *in situ* após a abertura do região abdômino-pélvica do camundongo controle (X 5).

**A-** Vista ventral do complexo urogenital observam-se: bexiga urinária (**BU**), vesícula seminal (**VS**), testículos (**TE**), ducto deferente (**Dd**), lobo ventral da próstata (**LV**) e glândula de coagulação (**GC**)

**B-** Vista dorsal do complexo urogenital observam-se: lobo dorsal da próstata (**LD**), glândula de coagulação (**GC**), bexiga urinária (**BU**), testículos (**TE**) e vesícula seminal (**VS**).

Figura - 2

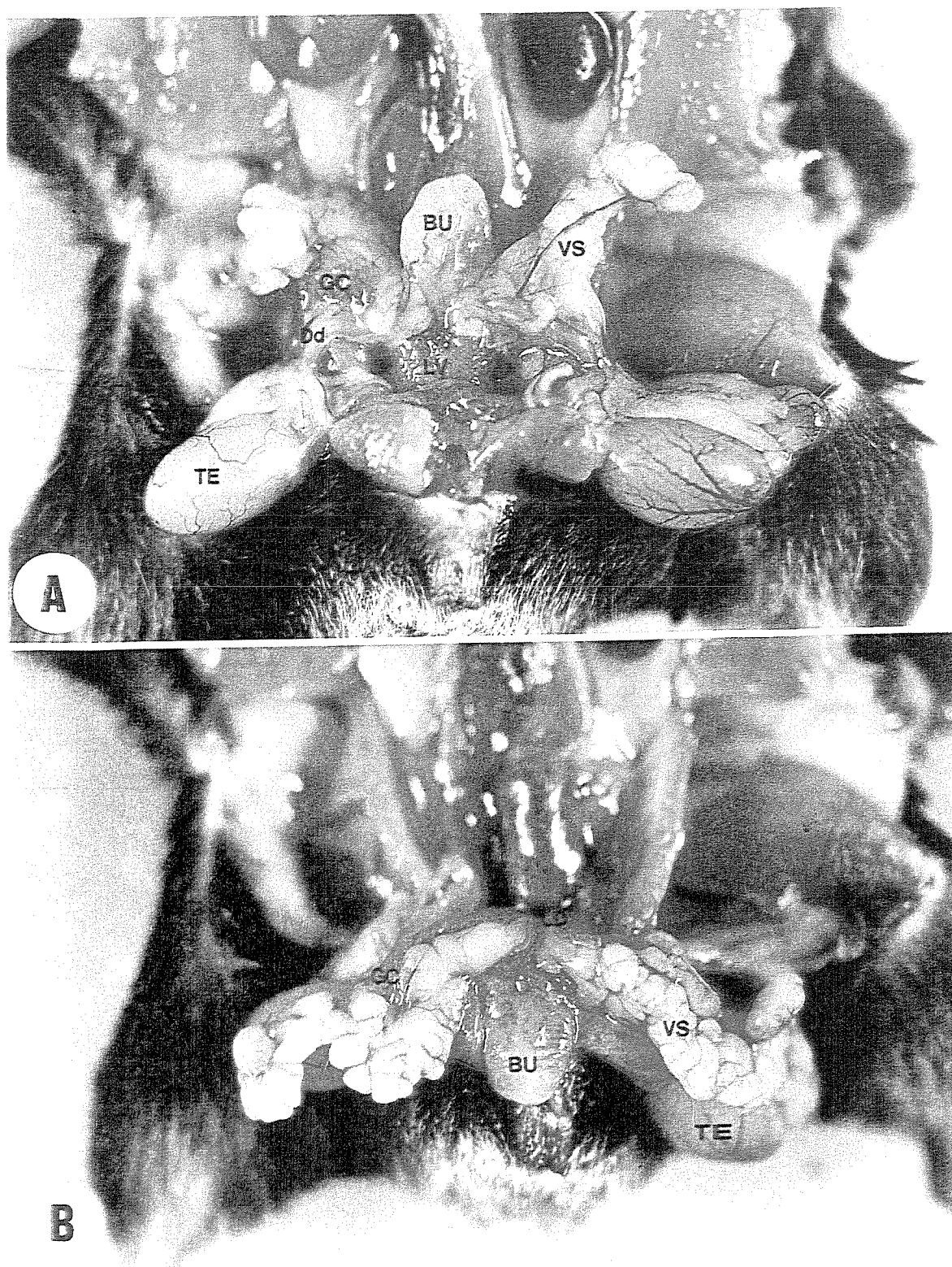


**Figura 3** Exposição do complexo urogenital *in situ* após a abertura do região abdômino-pélvica do camundongo diabético por aloxana (X 5).

**A-** Vista ventral do complexo urogenital observam-se: bexiga urinária (**BU**), vesícula seminal (**VS**), testículos (**TE**), ducto deferente (**Dd**), lobo ventral da próstata (**LV**)

**B-** Vista dorsal do complexo urogenital observam-se: lobo dorsal da próstata (**LD**), glândula de coagulação (**GC**), bexiga urinária (**BU**), testículos (**TE**) e vesícula seminal (**VS**).

Figura - 3

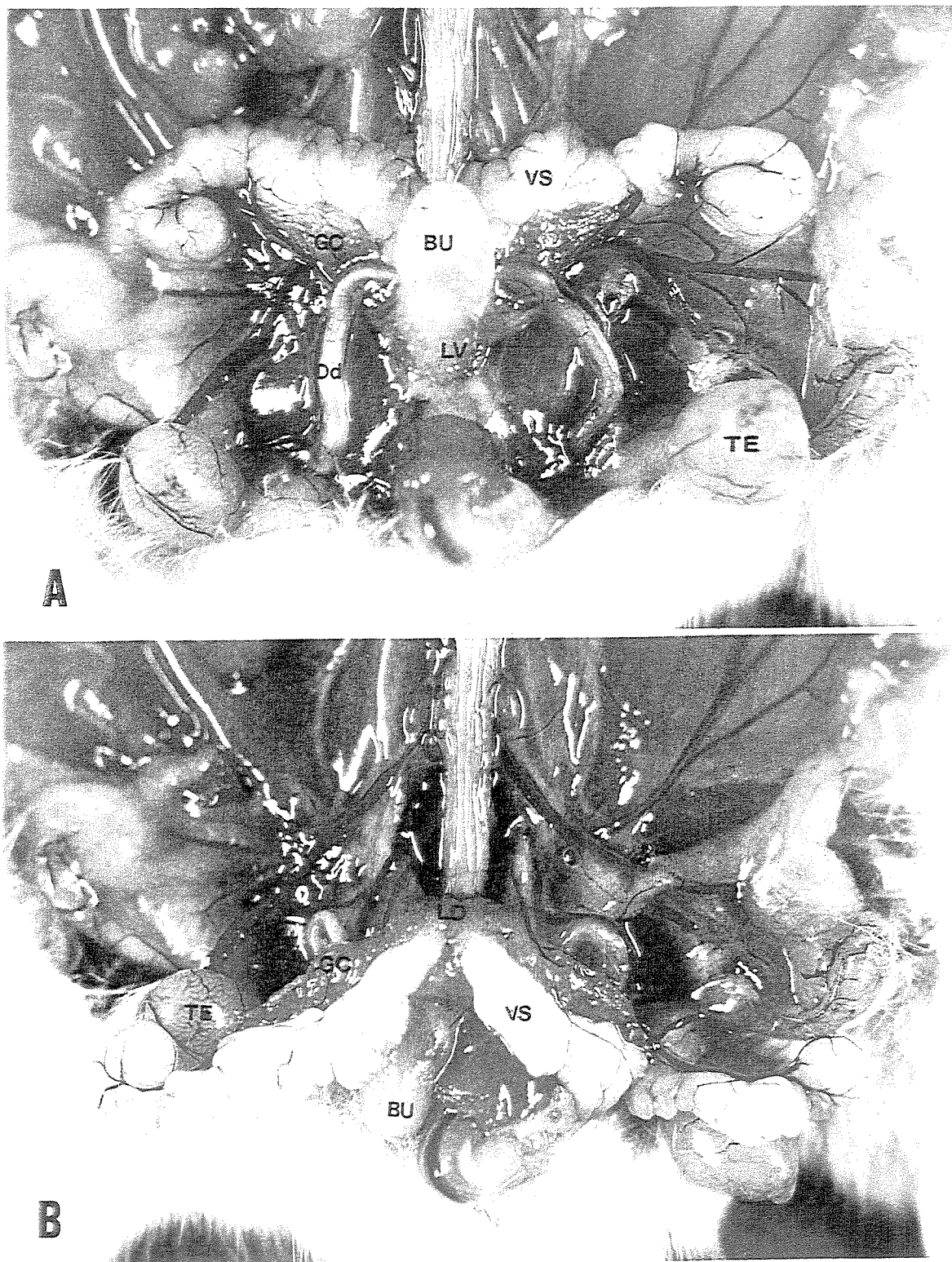


**Figura 4** Exposição do complexo urogenital *in situ* após a abertura do região abdômino-pélvica do camundongo diabético espontâneo (NOD) (X 5).

**A-** Vista ventral do complexo urogenital observam-se: bexiga urinária (**BU**), vesícula seminal (**VS**), testículos (**TE**), ducto deferente (**Dd**), lobo ventral da próstata (**LV**) e glândula de coagulação (**GC**).

**B-** Vista dorsal do complexo urogenital observam-se: lobo dorsal da próstata (**LD**), glândula de coagulação (**GC**), bexiga urinária (**BU**), testículos (**TE**) e vesícula seminal (**VS**).

Figura - 4



### **IV.3 – MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

### **IV.3.1 – PRÓSTATA DORSAL**

### **IV.3 - MICROSCOPIA**

#### **IV.3.1 – Próstata Dorsal**

##### **IV.3.1.1– Grupo Controle**

##### **Microscopia de Luz**

O estroma é constituído por tecido conjuntivo, músculo liso, vasos sangüíneos, nervos e diferentes tipos celulares (Figura 5 A). Os ácinos (alvéolos) apresentam mucosa pregueada e epitélio secretor simples com células colunares repousando sobre nítida membrana basal (figura 5 B). O volume celular médio é de 453,42  $\mu\text{m}^3$ . O citoplasma apresenta volume médio de 371,89  $\mu\text{m}^3$  (Tabela 4). Os núcleos têm formato elíptico, localizam-se no centro da célula e apresentam nucléolos evidentes (figura 5 B). O volume nuclear médio é de 81,53  $\mu\text{m}^3$  (Tabela 4). A relação entre o volume nuclear e o volume citoplasmático é de 17,98% e 82,02% respectivamente. No lúmen glandular desse lobo a secreção apresenta-se com aspecto homogêneo (figura 5 A, 5 B).

##### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

O epitélio secretor é simples com células predominantemente colunares que repousam sobre nítida lâmina basal (figura-7 A). No estroma é possível observar fibras colágenas, músculo liso e terminações nervosas (figura 7 B). No citoplasma basal, as cisternas do retículo endoplasmático granular apresentam-se dilatadas contendo material homogêneo com baixa eletrondensidade (figura 7 B). A região supranuclear destaca-se pela concentração das cisternas do Golgi que se dispõe de forma circular envolvendo pequenas vesículas de secreção com diferentes estágios de maturação (figura 7 C). No ápice celular, observa-se

vacúolos com secreção de aspecto floculento e eletrondensidade variada. Complexo juncional é evidente na região apical da membrana intercelular (figura 7 D). Vacúolos digestivos com diferentes eletrondensidades encontram-se distribuídos por todo o citoplasma e ocupam volume relativo de 1,7% e densidade de área de  $0,05\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (gráfico 1) justaluminal estão presentes microvilos pouco desenvolvidos e no lúmen encontra-se secreção com aspecto semelhante ao conteúdo dos vacúolos secretores (figura 7 D). As mitocôndrias têm forma alongada com nítidas cristas e estão distribuídas uniformemente por todo citoplasma (figura 7 C). O núcleo é esférico de localização central com membrana apresentando discretas reentrâncias. A cromatina condensa-se na região periférica e notam-se nucléolos evidentes (figura 7 A).

#### **IV.3.1.2 – Grupo Diabético por Aloxana**

##### **Microscopia de luz**

Nesse grupo experimental observa-se espessamento do estroma. Os ácinos glandulares apresentam-se pouco pregueados quando comparados aos animais do grupo controle (figura 6 A). O epitélio secretor encontra-se atrofiado com células colunares baixas e volume celular médio de  $234,98\mu\text{m}^3$ . A atrofia celular caracteriza-se por acentuada redução do citoplasma com volume citoplasmático médio de  $168,26\mu\text{m}^3$  (Tabela 4). Diferente do grupo controle, o núcleo demonstra forma aproximadamente esférica e mantém localização central na célula sendo possível a observação de um a dois pequenos nucléolos (figura 6 B). O volume nuclear médio é de  $66,72\mu\text{m}^3$  (Tabela 4). O volume citoplasmático é significativamente menor quando comparado ao volume do grupo controle. A fração celular relativa ocupada pelo núcleo é em média 28,39% em relação ao citoplasma que é de 71,61%. No lúmen glandular nota-se secreção com aspecto heterogêneo figuras (6A e 6B).

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Ultra-estruturalmente, destacam-se as seguintes alterações: atrofia do epitélio secretor, espaçamento intercelular e espessamento do estroma que embora aumentado mantêm os mesmos elementos. No citoplasma basal, o retículo endoplasmático granular apresenta-se de forma circular e com acentuada involução das suas cisternas. Vacúolos digestivos com intensa eletrondensidade são encontrados na região central da conformação circular do REG (figura 8 A). Na região supranuclear, notam-se vacúolos digestivos com materiais celulares de diferentes eletrondensidades caracterizando proeminente vacuolização (figura 8 C, 8 D), ocupando volume relativo médio de 3,5% e densidade de área  $0,2\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (gráfico 1). Além disso, é possível notar aparente dilatação das cisternas do Golgi (figura 8 A). Os vacúolos secretores apresentam secreção com diferentes eletrondensidades (figura 8 D). Na região justa-luminal são observadas rupturas de microvilos (figura 8 C, 8 D). As mitocôndrias têm forma alongada e distribuem-se uniformemente por todo citoplasma (figura 8 D). A cromatina encontra-se condensada principalmente na periferia do núcleo e ao redor do nucléolo. O envelope nuclear apresenta-se intacto, porém se notam acentuadas reentrâncias quando comparado ao grupo controle (figura 8 A).

#### **IV.3.1.3 – Grupo Diabético Espontâneo (NOD)**

##### **Microscopia de luz**

As alterações observadas nesse grupo assemelham-se às descritas no grupo anterior (figura 6 C). Todavia, essas mudanças encontram-se mais acentuadas nos animais desse grupo. O estroma apresenta-se amplamente

espessado e os ácinos glandulares pouco pregueados. O epitélio secretor apresenta-se nitidamente atrofiado, ou seja, de células colunares no grupo controle para células tendendo a cúbicas no presente grupo (figura 6 D). O volume celular médio é de  $167,61 \mu\text{m}^3$ . A atrofia celular caracteriza-se por acentuada redução do citoplasma com o volume citoplasmático médio de  $115,69 \mu\text{m}^3$  (Tabela 4). O núcleo tem forma esférica e está localizado no centro da célula com um ou dois nucléolos (figura 6 D). O volume nuclear médio é de  $51,92 \mu\text{m}^3$  (Tabela 4). A fração celular ocupada pelo núcleo é de 30,9% e 69,1% a do citoplasma. No lúmen glandular encontra-se secreção com aspecto heterogêneo semelhante ao grupo diabético por aloxana.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

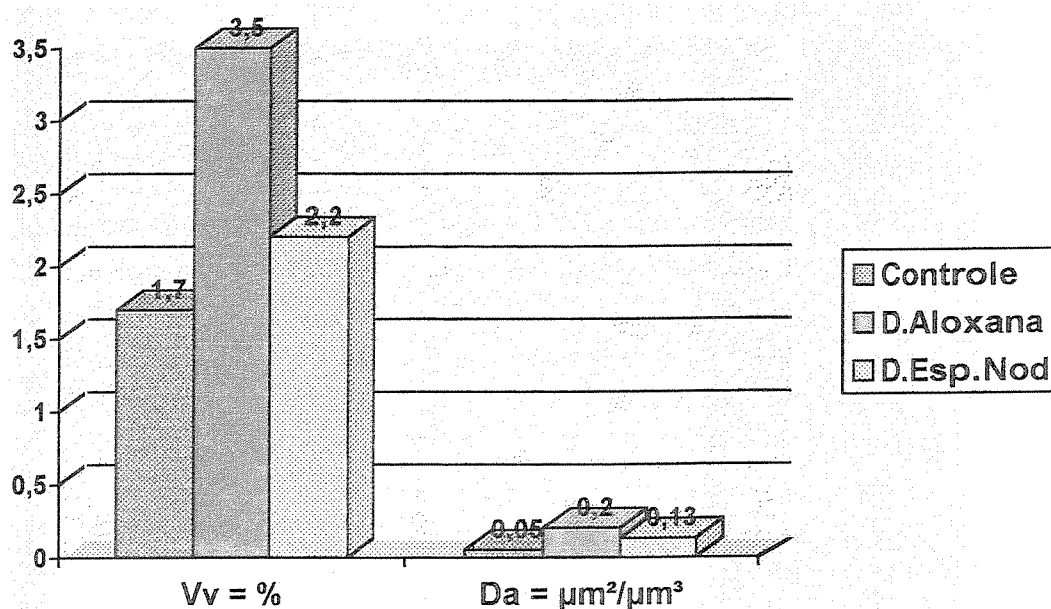
Nesse grupo experimental encontram-se tanto a atrofia celular como o espessamento acentuado do estroma quando relacionado ao grupo anterior bem como o controle. O retículo endoplasmático granular apresenta cisternas com evidente redução. O complexo de Golgi demonstra dilatação de suas cisternas. Vacúolos digestivos contendo materiais com diferentes eletrondensidades são caracterizados na região supranuclear e apical. Esses ocupam volume médio de 2,2% e tem densidade de área  $0,13 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (gráfico 1) Os vacúolos secretores apresentam secreção com eletrondensidades variadas. Na região justa-luminal nota-se ruptura de microvilos e secreção de aspecto flocular com diferentes eletrondensidades. As mitocôndrias têm forma alongada distribuindo-se uniformemente por todo o citoplasma. O núcleo tem formato esférico com acentuada reentrância de seu envelope e cromatina condensando-se, especialmente, na periferia (figura 9 A).

Tabela 4- Média e desvio padrão do volume nuclear, forma do núcleo e volume citoplasmático da próstata dorsal dos animais dos grupos controle, diabético por aloxana e diabético espontâneo (NOD).

| Variável  | Grupos         |                |                | Resultado do teste |
|-----------|----------------|----------------|----------------|--------------------|
|           | Controle       | D.Aloxana      | D. Nod         |                    |
| V. Núcleo | 81,53±12,25 a  | 66,72±13,73 a  | 51,92±18,13 a  | 4,50 (P>0,05)      |
| F. Núcleo | 1,50±0,10 b    | 1,08±0,03 a    | 1,04±0,01 a    | 8,17 (P<0,05)      |
| V. Citol. | 371,89±65,57 b | 168,26±24,73 a | 115,69±47,87 a | 8,00 (P<0,05)      |

• “a” e “b”= comparação média entre os grupos experimentais.

Gráfico 1- Volume relativo (Vv) e da densidade de área (Da) dos vacúolos digestivos das células epiteliais da próstata dorsal dos animais dos grupos controle, diabético por aloxana (D.Aloxana) e diabético espontâneo Nod (D.Esp.Nod).



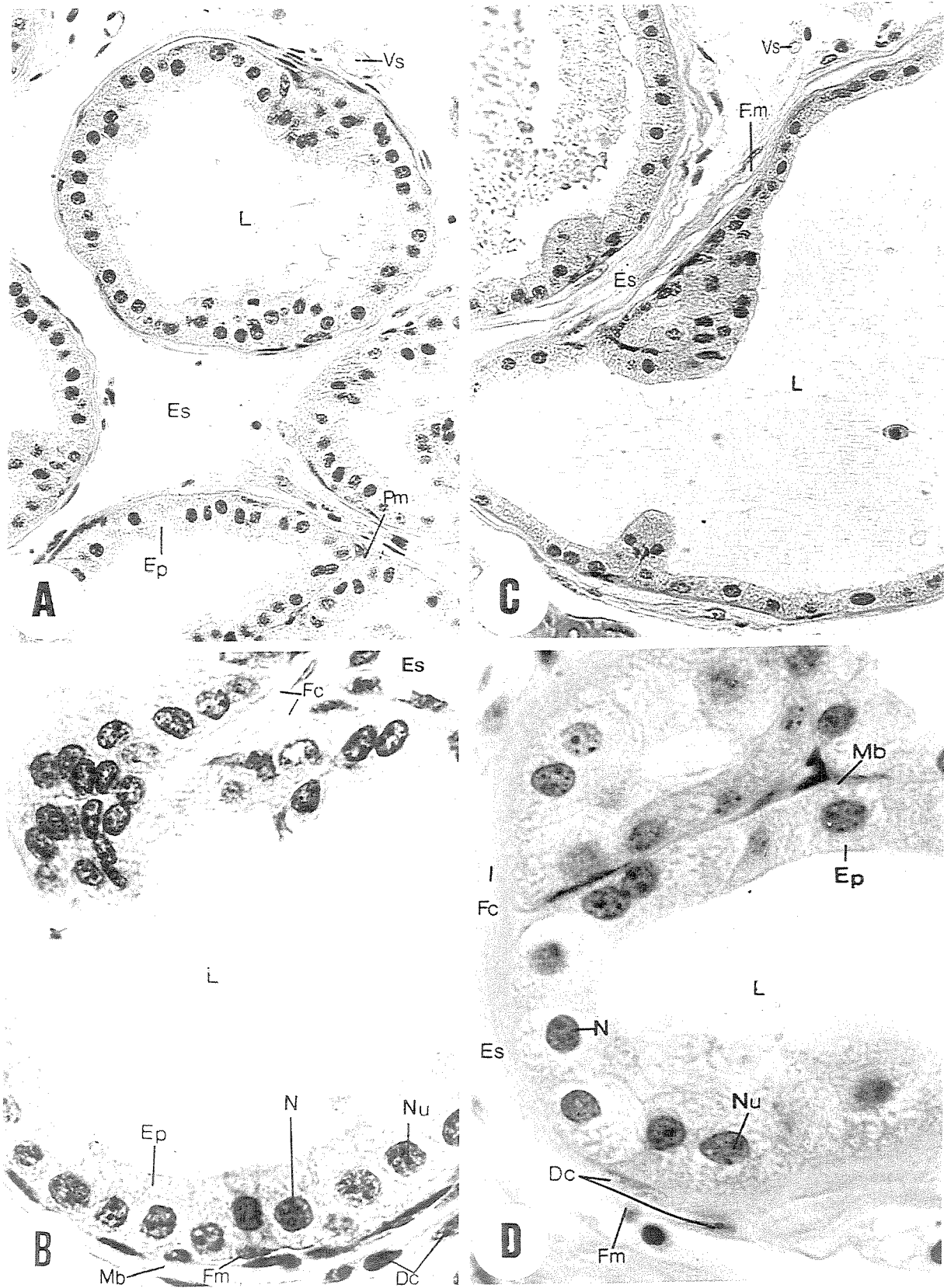
**Figura 5** Fotomicrografias do epitélio secretor da próstata dorsal de animais controles. **A-** Observa-se mucosa regularmente pregueada. Estroma (**Es**) distribuído em torno dos ácinos contendo fibras colágenas (**Fc**), fibras musculares (**Fm**), vasos sangüíneos (**Vs**) e vários núcleos de diferentes tipos celulares (**seta**). Lúmen do ácino (**L**). X450 Tricrômico de Masson. **B-** Nota-se epitélio simples (**Ep**) com células colunares repousando sobre nítida membrana basal (**Mb**), eventuais células basais inferiormente às epiteliais (**Cb**). Núcleo (**N**) localizado na região central da célula com evidente nucléolo (**Nu**). Lúmen do ácino com secreção homogênea (**L**). X1253 Tricrômico de Masson.

Figura - 5



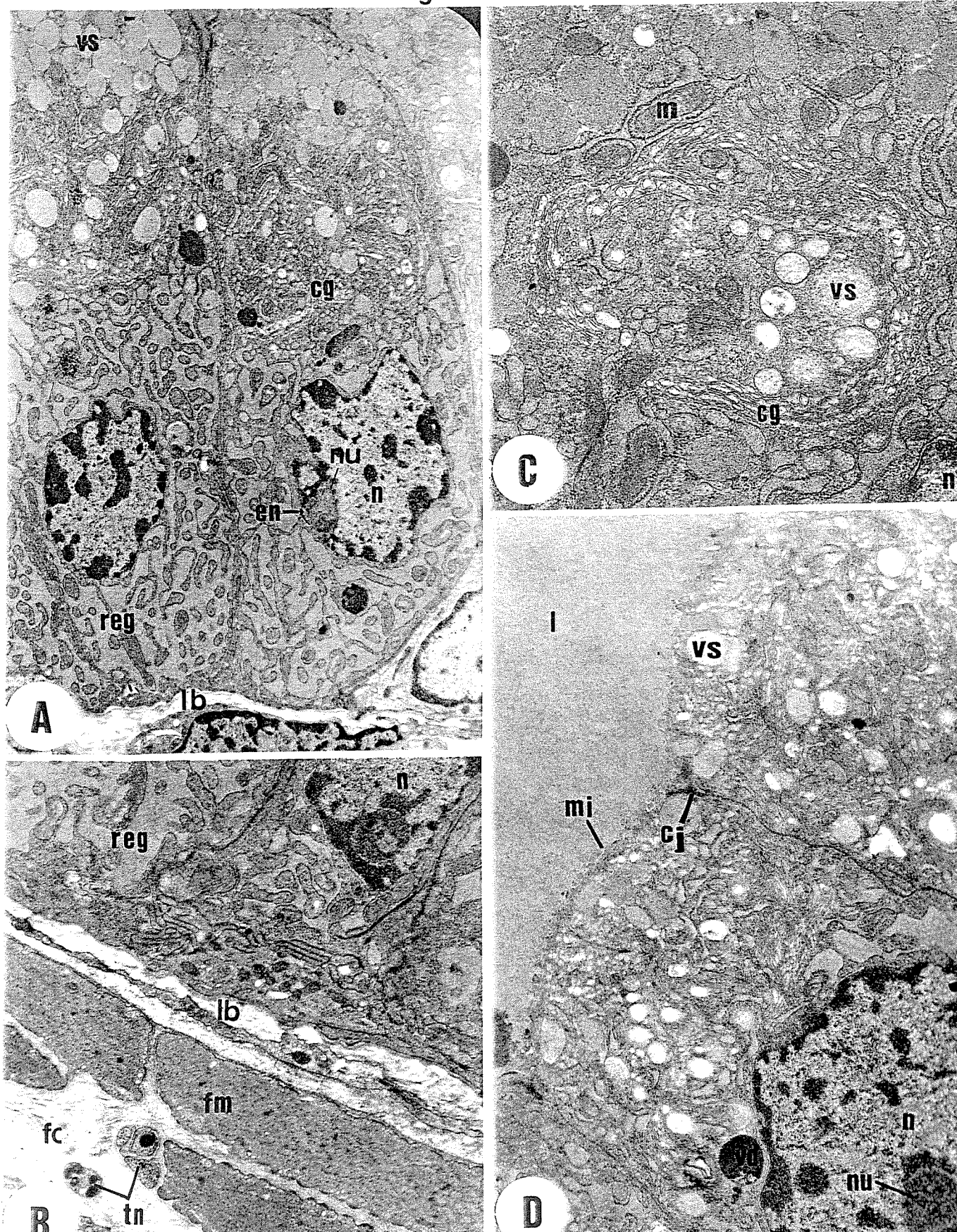
**Figura 6** Fotomicrografias do epitélio secretor da próstata dorsal de animais diabéticos por aloxana e Nod. **A-** (Aloxana) Nota-se aparente diminuição no pregueamento da mucosa glandular. Estroma (**Es**) espessado e afastamento entre os ácinos. Epitélio secretor (**Ep**). Vasos sangüíneos (**Vs**). Lúmen do ácino (**L**). X450 Tricrômico de Masson. **B-** (Aloxana) Observa-se estroma (**Es**) com diferentes tipos celulares na região justa-basal (**Dc**). Nítida membrana basal (**Mb**), fibras musculares (**Fm**) e colágenas (**Fc**). Atrofia do epitélio secretor (**Ep**). Núcleo (**N**) ocupando grande parte do citoplasma celular com nucléolo (**Nu**) pouco evidente. Lúmen contendo secreção de aspecto homogêneo com eventuais grumos (**L**). X1253 Tricrômico de Masson. **C-** (Nod) Nota-se aparente diminuição do pregueamento da mucosa glandular. Estroma (**Es**) espessado. Lúmen do ácino (**L**). X450 Tricrômico de Masson. **D-** (N) Observa-se estroma (**Es**) com diferentes tipos celulares na região justa-basal (**Dc**). Membrana basal (**Mb**), fibras musculares (**Fm**) e colágenas (**Fc**). Acentuada atrofia do epitélio secretor (**Ep**). Núcleo (**N**) ocupando grande parte do citoplasma celular e nucléolo (**Nu**) pouco evidente. Lúmen contendo secreção heterogênea com aspecto floculento (**L**). X1253 Tricrômico de Masson.

Figura - 6



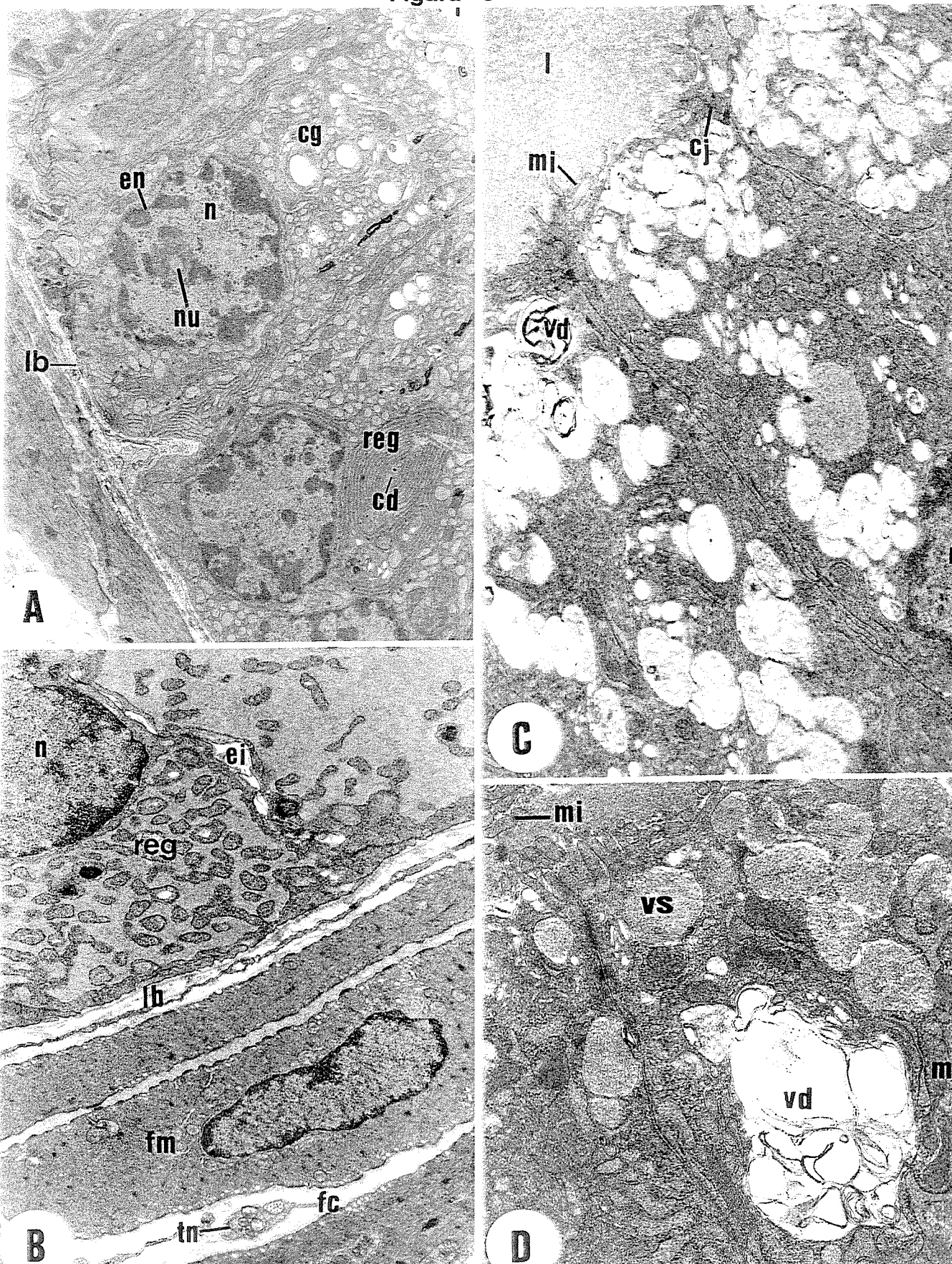
**Figura 7** Eletromicrografias das células epiteliais da próstata dorsal de camundongos controles. **A** – Vista panorâmica. Observa-se epitélio simples com células colunares repousando sobre nítida lâmina basal (**lb**), cisternas do retículo endoplasmático granular (**reg**) dilatadas na região basal, núcleo (**n**) localizado no centro da célula apresentando distinto nucléolo (**nu**) e cromatina condensando-se na periferia. Envelope nuclear (**en**) intacto com poucas invaginações. Cisternas do Golgi (**cg**) proeminentes, vacúolos contendo secreção (**vs**) com aspecto floculento. X7200. **B** – Região basal. Nota-se estroma apresentando fibras musculares (**fm**), fibras colágenas (**fc**) e terminações nervosas (**tn**). Lâmina basal (**lb**), dilatação das cisternas do retículo endoplasmático granular (**reg**). X12000. **C** – Detalhe da região supranuclear. Verificam-se cisternas do Golgi (**cg**) achatadas e paralelas, vacúolos contendo secreção com aspecto flocular (**vs**), mitocôndrias (**m**). X18000. **D** – Região apical. Notam-se vacúolos digestivos (**vd**), complexo juncional (**cj**), vacúolos contendo secreção (**vs**) microvilos (**mi**) e lúmen (**L**). X12000.

Figura - 7



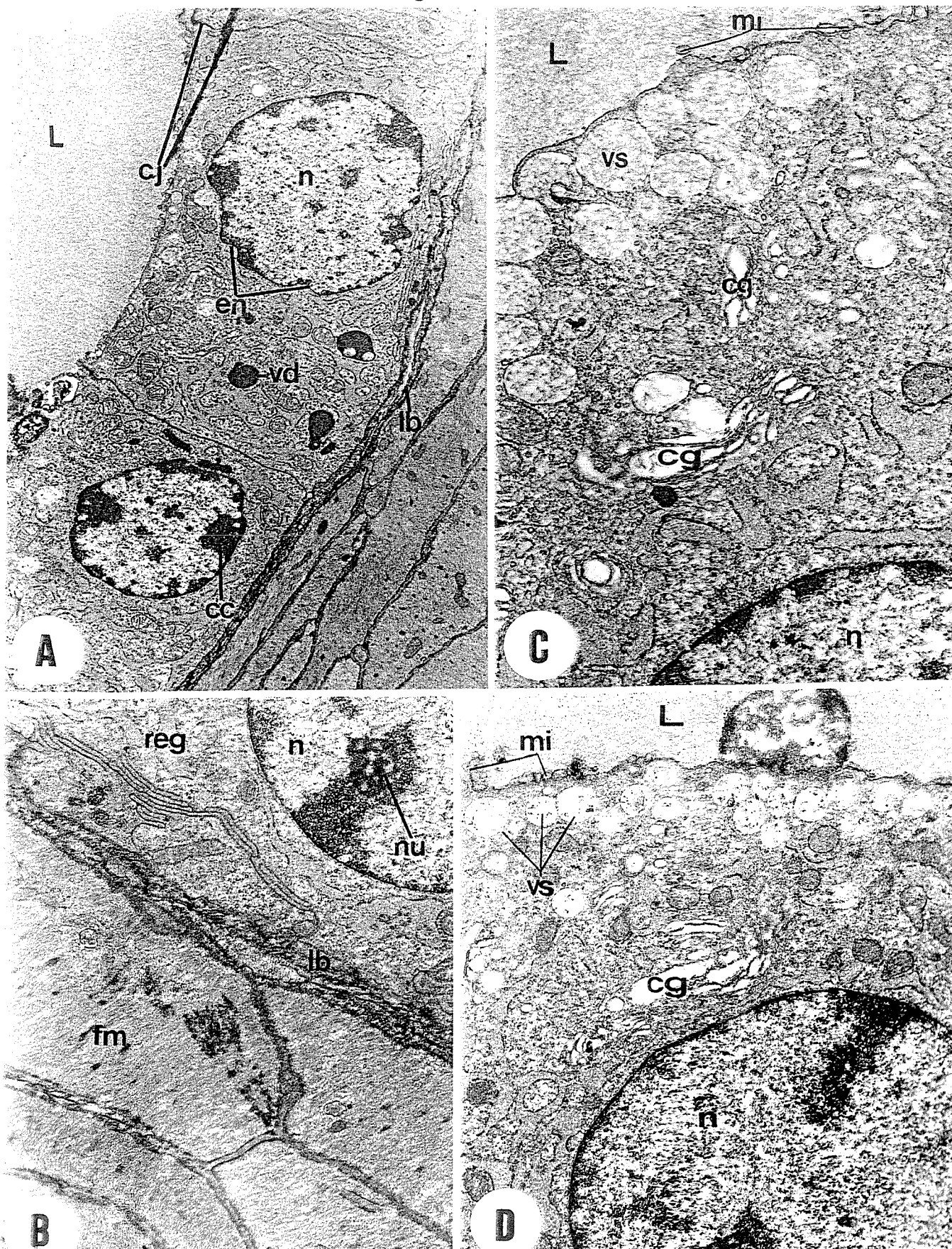
**Figura 8** Eletromicrografias das células epiteliais da próstata dorsal de camundongos diabéticos induzidos pela aloxana. **A** – Nota-se evidente atrofia das células do epitélio secretor, lâmina basal (**lb**) pregueada, conformação circular e paralela do retículo endoplasmático granular (**reg**), vacúolos digestivos com alta eletrondensidade no centro da conformação circular (**cd**), núcleo (**n**) com cromatina condensando-se na periferia bem como formando grumos entorno do nucléolo (**nu**), envelope nuclear (**en**) intacto apresentando reentrâncias e cisternas do Golgi (**cg**) amplamente dilatadas. Lúmen (**L**). X7200. **B** – Região basal. Observa-se estroma composto por fibras musculares lisas (**fm**), fibras colágenas (**fc**) e terminações nervosas (**tn**). Lâmina basal (**lb**), diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular (**reg**), espaçamento intercelular (**ei**) e lúmen (**L**). X12000. **C** – Região apical. Evidenciam-se proeminentes vacúolos vazios caracterizando vacuolização do citoplasma e vacúolos digestivos (**vd**) contendo material com diferentes eletrondensidades. Complexo juncional (**cj**) e microvilos (**mi**). X12000. **D** – Detalhe da região supranuclear. Nota-se grandes vacúolos digestivos (**vd**) com restos celulares, rupturas de cristas mitocondriais e de microvilos (**mi**). X18000.

Figura - 8



**Figura 9** Eletromicrografias das células epiteliais da próstata dorsal de camundongos diabéticos espontâneos NOD. **A** – observa-se atrofia das células do epitélio secretor, lâmina basal (**lb**), vacúolos digestivos com alta eletrondensidade (**vd**), complexo juncional (**cj**), núcleo (**n**) com cromatina condensando-se em forma de grumos na periferia (**cc**), envelope nuclear (**en**) intacto apresentando reentrâncias. Lúmen (**L**). X7200. **B** – Região basal nota-se estroma com volumosas fibras musculares lisas (**fm**), lâmina basal (**lb**), diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular (**reg**). Núcleo (**n**) e nucléolo (**nu**). X12000. **C** – Detalhe da região supranuclear. Nota-se vacúolos contendo pouca secreção de aspecto floculento (**vs**), dilatação das cisternas do Golgi (**cg**) e ruptura de microvilos (**mi**). Lúmen (**L**). X18000. **D** – Região apical evidenciam-se vacúolos (**vs**) contendo reduzida quantidade de material com aspecto floculento e diferentes eletrondensidades, proeminente dilatação das cisternas do Golgi (**cg**), eventuais microvilos (**mi**). Núcleo (**n**), Lúmen (**L**). X12000.

Figura - 9



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

#### **IV.3.2 – GLÂNDULA DE COAGULAÇÃO**

### **IV.3.2 – Glândula de Coagulação**

#### **IV.3.2.1 – Grupo Controle**

##### **Microscopia de Luz**

A glândula de coagulação é formada por ácinos apresentando mucosa extremamente pregueada (figura 10 A). O estroma é constituído por tecido conjuntivo, músculo liso, vasos sangüíneo, além de vários diferentes tipos celulares. O epitélio secretor é simples com células colunares altas ( figura 10 B). O volume celular médio é  $479,63 \mu\text{m}^3$ . Na região perinuclear, observa-se zonas citoplasmáticas claras, sendo provavelmente correspondentes às cisternas do Golgi e do retículo endoplasmático granular sendo essa última dilatada. O volume citoplasmático médio é de  $405,34 \mu\text{m}^3$  (Tabela 5). O núcleo está localizado no centro da célula tem formato elíptico e apresenta visível nucléolo (figura 10 B). O volume médio é de  $74,29 \mu\text{m}^3$  (Tabela 5). A fração celular ocupada pelo núcleo foi em média 15,48% e do citoplasma 84,52.

##### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Ultra-estruturalmente, o epitélio secretor dessa glândula é formado por células colunares altas repousando sobre nítida lamina basal. Eventuais células basais entremeiam as células epiteliais (figura 12 A). O estroma circunda os ácinos sendo possível evidenciar fibras colágenas, músculo liso e vasos sangüíneos. O citoplasma caracteriza-se por ampla dilatação das cisternas do retículo endoplasmático granular concentradas na região basal e perinuclear do citoplasma, contendo material de aspecto flocular com baixa eletrondensidade. As cisternas do Golgi são paralelas e achatadas dispendo-se circularmente acima do núcleo (figura 12 A). Na região apical, nota-se vacúolos secretores contendo

material de baixa eletrondensidade. Ocasionais vacúolos digestivos são visualizados no citoplasma e têm volume relativo de 1,3% e densidade de área  $0,02\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (gráfico 2). Na região justa-luminal notam-se eventuais e esparsos microvilos, complexos juncionais e secreção de aspecto flocular com eletrondensidade homogênea. As mitocôndrias apresentam nítidas cristas e distribuem-se por todo citoplasma. O núcleo apresenta localização central da célula, tem formato elíptico com o envelope nuclear regular (figura 12 A). A cromatina condensa-se na periferia e entorno do nucléolo (figura 12 A).

#### **IV.3.2.2 – Grupo Diabético por Aloxana**

##### **Microscopia de luz**

O estroma encontra-se espessado com aparente aumento das fibras colágenas, dos diferentes tipos celulares e de células musculares lisas (figuras 11 A e 11 B). A mucosa glandular apresenta-se discretamente pregueada quando comparada aos animais controles (figura 11 A). O epitélio secretor é formado por células atrofiadas com o volume médio de  $129,95\mu\text{m}^3$ . O citoplasma está extremamente reduzido (figura 11 B). O volume médio do citoplasma é de  $85,50\mu\text{m}^3$  (Tabela 5). Diferentes dos animais do grupo controle, o núcleo celular aparece com formato tendendo a esférico, mantém localização central sendo possível observar um ou dois pequenos nucléolos. O volume nuclear médio é de  $44,45\mu\text{m}^3$  (Tabela 5). O volume citoplasmático foi, estatisticamente, menor quando comparado aos animais do grupo anterior. Contudo, o volume nuclear foi similar ao grupo controle (Tabela 5). A fração celular relativa ocupada pelo núcleo foi em média 34,20% em relação ao citoplasma que foi de 65,80%.

**Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Dentre as alterações em microscopia eletrônica de transmissão destacam-se: a atrofia do epitélio secretor e o espessamento do estroma. No citoplasma basal, as cisternas do retículo endoplasmático granular apresentam-se diminuídas (figura 13 B). Na região supranuclear, notam-se vacúolos com material secretor. Vacúolos digestivos contendo material com diferentes eletrondensidades são evidentes, especialmente, na região supra-nuclear e apical (figura 13 A) e têm volume relativo médio de 3,3% e densidade de área  $0,15\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (gráfico 2). O Golgi apresenta dilatação de suas cisternas (figura 13 F). Mitocôndrias são evidentes com rupturas de suas cristas por todo citoplasma (figura 13 F). Rupturas de microvilos são vistos na região justa-luminal (figura 13 F). O núcleo apresenta cromatina condensada tanto na periferia como formando grumos por todo o nucleoplasma e ao redor dos nucléolos (figura 13 A, 13 F). O envelope nuclear apresenta-se intacto e com acentuadas reentrâncias quando comparado aos animais do grupo controle (figura 13 A).

**IV.3.2.3 – Grupo Diabético Espontâneo (NOD)****Microscopia de luz**

As alterações observadas nesse grupo são semelhantes aquelas descritas no grupo diabético por aloxana. Porém, notam-se que as alterações morfológicas são aumentadas nesses animais em relação aos animais do grupo diabético por aloxana (figuras 11 C, 11 D). Dentre as alterações destacam-se: acentuado espessamento do estroma com aparente desorganização das fibras colágenas e musculares lisas. Mucosa glandular pouco pregueada, epitélio secretor drasticamente atrofiado (figuras 11 C, 11 D). O volume celular médio é de  $124,71\mu\text{m}^3$ . O volume citoplasmático médio é  $82,11\mu\text{m}^3$  (Tabela 5). O núcleo celular tem

forma tendendo a esférico, localizado centralmente na célula, com um ou dois nucléolos evidentes. O volume nuclear médio é de  $42,60 \mu\text{m}^3$  (Tabela 5). Todavia, quando comparados aos animais do grupo diabético pela aloxana não caracterizou-se decréscimo, estatisticamente, significativo. A fração celular ocupada pelo núcleo é de 37,36% para 62,64% de citoplasma.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

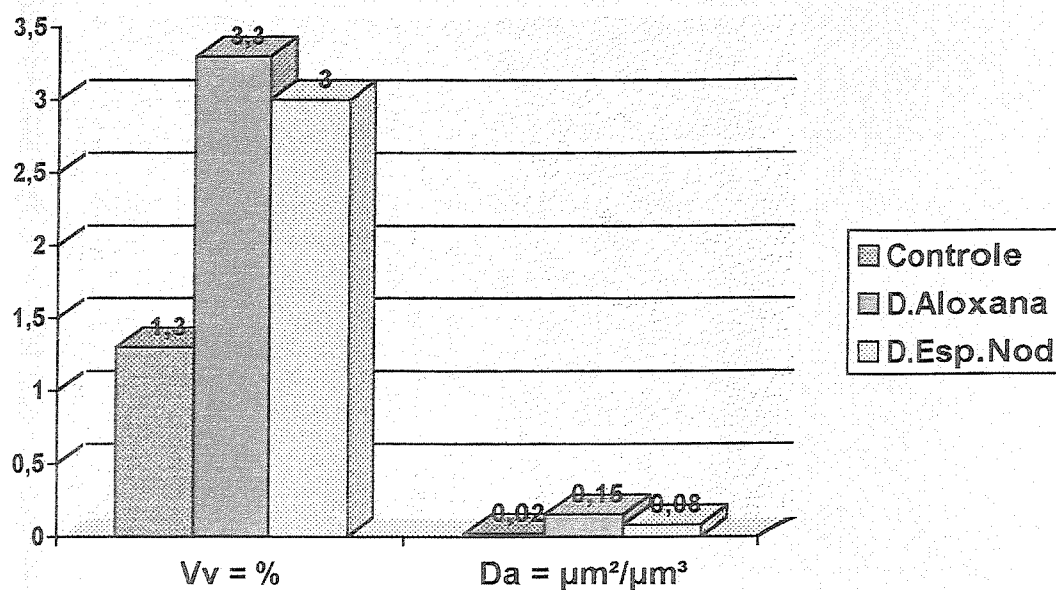
Nesse grupo experimental as alterações são semelhantes as descritas no grupo anterior. Contudo, observa-se acentuada atrofia celular e intenso espessamento do estroma. O retículo endoplasmático granular apresenta as cisternas diminuídas localizadas especialmente na região basal e perinuclear das células. As cisternas do complexo de Golgi encontram-se dilatadas e localizadas supranuclearmente. Eventuais vacúolos secretores são observados na região apical. Vacúolos digestivos com diferentes eletrondensidades são evidentes na região supra-nuclear e apical com volume relativo médio de 3,0% e densidade de área de  $0,08 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (gráfico 2). Na região justa-luminal, nota-se ruptura de microvilos e grandes grumos de secreção de aspecto flocular e eletrondensidades variadas. Mitocôndrias com rupturas de suas cristas são observadas no citoplasma. O núcleo tem forma aproximadamente esférica com acentuadas reentrâncias de seu envelope. A cromatina condensando-se na periferia bem como, formando grumos por todo o nucleoplasma e ao redor dos nucléolos, similar aos animais do grupo diabético por aloxana e diferentes dos animais do grupo controle (figura 14 A).

Tabela 5- Média e desvio padrão do volume nuclear, forma do núcleo e volume citoplasmático da glândula de coagulação dos animais dos grupos controle, diabético por aloxana e diabético espontâneo (NOD)

| Variável  | Grupo           |               |               | Resultado do teste |
|-----------|-----------------|---------------|---------------|--------------------|
|           | Controle        | D.Aloxana     | D. Nod        |                    |
| V. Núcleo | 74,29±17,88a    | 44,45±13,42 a | 42,60±16,44 a | 4,96 (P>0,05)      |
| F. Núcleo | 1,72±0,07 b     | 1,05±0,02 a   | 1,03±0,01 a   | 8,02 (P<0,05)      |
| V. Citol. | 405,34±163,189b | 85,50±30,93 a | 82,11±24,73 a | 7,54 (P<0,05)      |

“a” e “b”= comparação média entre os grupos experimentais

Gráfico 2- Volume relativo (Vv) e da densidade de área (Da) dos vacúolos digestivos das células epiteliais da glândula de coagulação dos animais dos grupos controle, diabético por aloxana (D.Aloxana) e diabético espontâneo Nod (D.Esp.Nod).



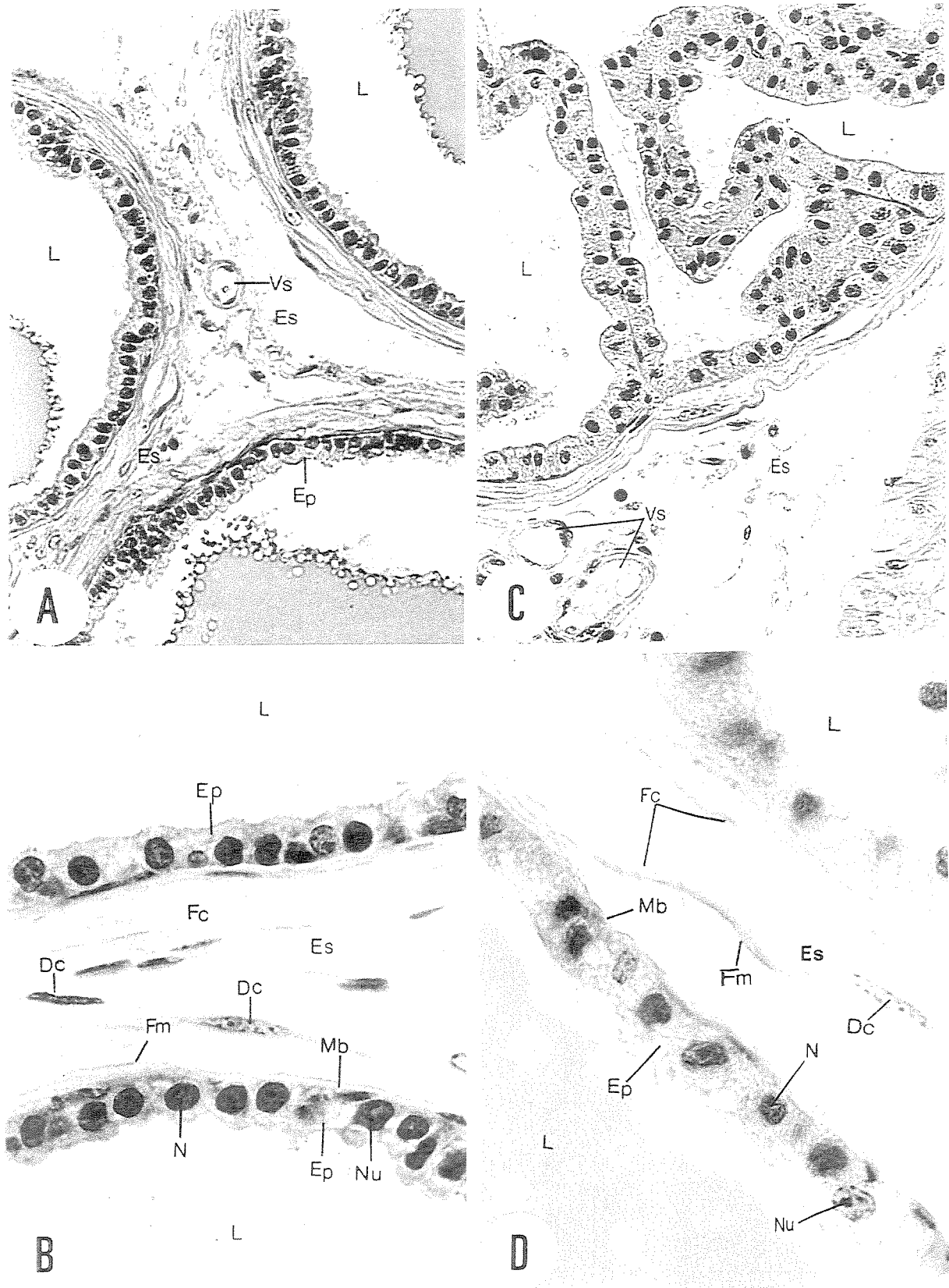
**Figura 10** Fotomicrografias do epitélio secretor da glândula de coagulação de animais controles. **A-** Observa-se mucosa glandular extensamente pregueada. Estroma (**Es**) distribuído em torno dos ácinos contendo fibras colágenas (**Fc**), musculares (**Fm**), vasos sangüíneos (**Vs**) e vários núcleos de diferentes tipos celulares (**seta**). Lúmen do ácino (**L**). X450 Tricrômico de Masson. **B-** Nota-se epitélio simples formado por células colunares altas repousando sobre nítida membrana basal (**Mb**) com eventuais células basais (**seta**), inferiormente às células epiteliais. Fibras musculares (**Fm**) e colágenas (**Fc**). Núcleo (**N**) localizado na região central da célula com evidente nucléolo (**Nu**). Lúmen contendo material secretor de aspecto homogêneo (**L**). X1253 Tricrômico de Masson.

Figura - 10



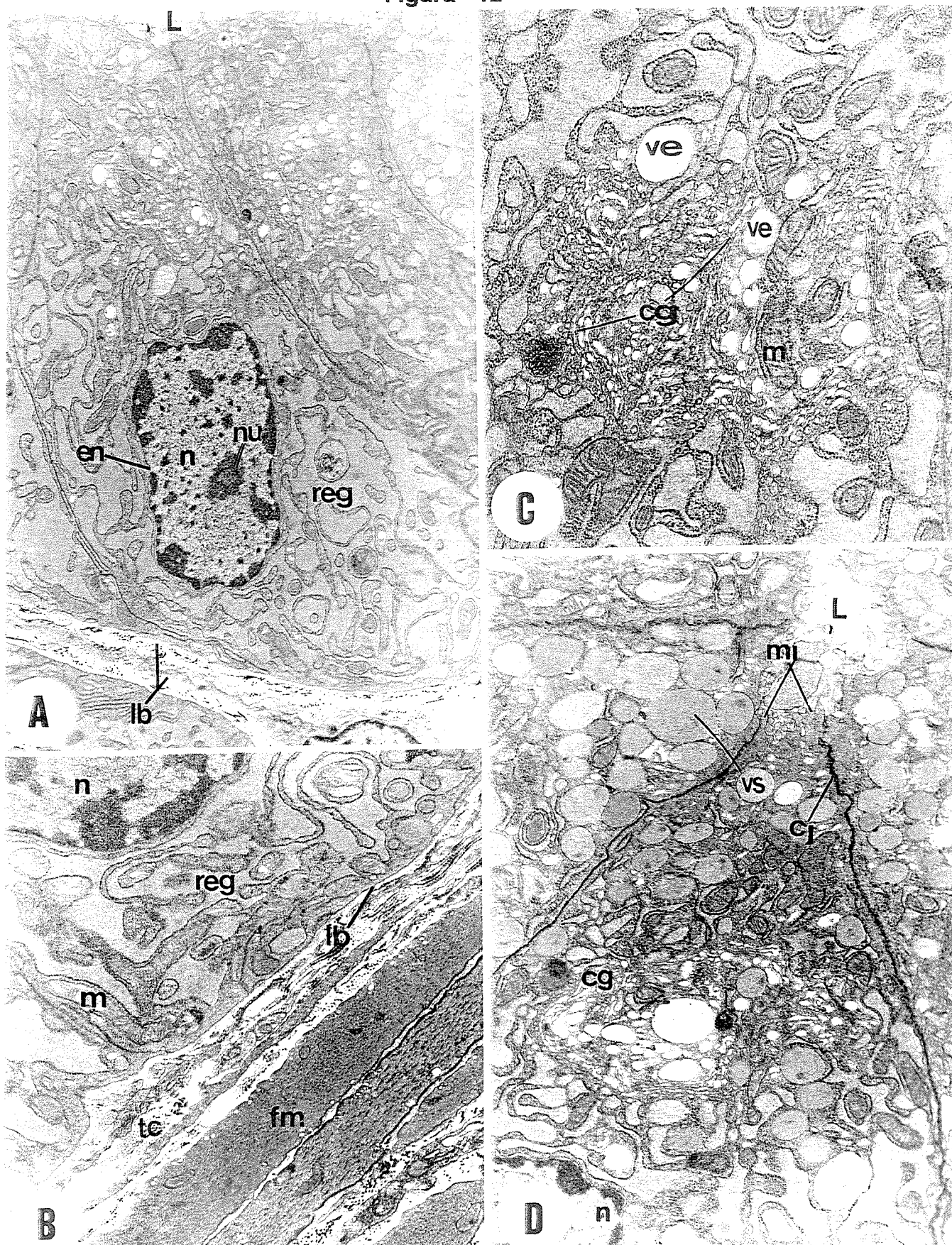
**Figura 11** Fotomicrografias do epitélio secretor da glândula de coagulação de animais diabéticos por aloxana e Nod. **A-** (Aloxana) Nota-se mucosa glandular pouco pregueada. Estroma (**Es**) espessado. Vasos sangüíneos (**Vs**). Lúmen dos ácinos (**L**). X450 Tricrômico de Masson. **B-** (Aloxana) Observa-se estroma com diferentes tipos celulares na região (**Dc**). Nítida membrana basal (**Mb**), fibras musculares (**Fm**) e colágenas (**Fc**). Atrofia do epitélio secretor (**Ep**). Núcleo (**N**) ocupando grande parte do citoplasma celular com nucléolo (**Nu**) pouco evidente. Lúmen contendo secreção de aspecto homogêneo com eventuais grumos (**L**). X1253 Tricrômico de Masson. **C-** (Nod) Nota-se mucosa glandular pouco pregueada em relação ao controle. Estroma (**Es**) espessado. Vasos sangüíneos (**Vs**). Lúmen dos ácinos (**L**). X450 Tricrômico de Masson. **D-** (Nod) observa-se estroma (**Es**) com diferentes tipos celulares (**Dc**). Afrouxamento das fibras musculares (**Fm**) e colágenas (**Fc**). Membrana basal (**Mb**). Acentuada atrofia do epitélio secretor (**Ep**). Núcleo (**N**) ocupando grande parte do citoplasma celular e nucléolo (**Nu**) pouco evidente. Lúmen contendo secreção heterogênea com aspecto floculento (**L**). X1253 tricrômico de Masson.

Figura - 11



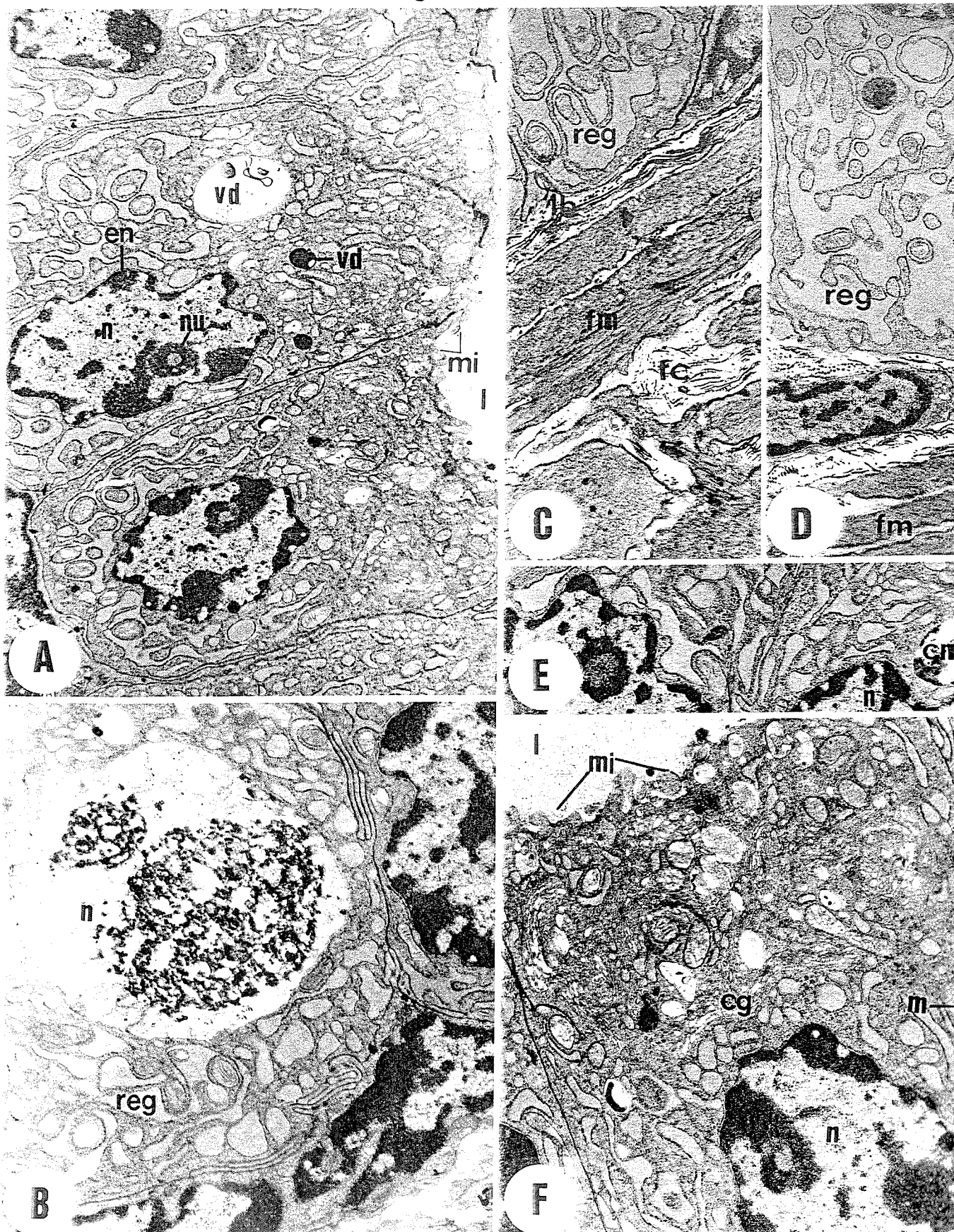
**Figura 12** Eletromicrografias das células epiteliais da glândula de coagulação de camundongos controles. **A** – Vista panorâmica observa-se célula colunar alta repousando em nítida lâmina basal (**lb**), cisternas do retículo endoplasmático granular (**reg**) amplamente dilatadas, núcleo (**n**) elíptico localizado no centro da célula, envelope nuclear (**en**) apresentando discretas reentrâncias e nucléolo evidente (**nu**). X7200. **B** – Região basal evidencia-se estroma composto de fibras musculares lisas (**fm**) e tecido conjuntivo (**tc**), lâmina basal (**lb**), cisterna do retículo endoplasmático granular (**reg**) amplamente dilatadas, mitocôndrias alongadas com nítidas cristas (**m**) e núcleo (**n**). X12000. **C** – Detalhe da região supranuclear nota-se cisternas do Golgi (**cg**) paralelas e achatadas envolvendo vesículas de secreção com diferentes estágios de maturação (**ve**), mitocôndrias (**m**) com nítidas cristas. X18000. **D** – Região supranuclear observa-se vacúolos contendo secreção (**vs**) de aspecto floculento e eletrondensidade variada, cisternas de Golgi (**cg**), complexo juncional (**cj**), microvilos esparsos (**mi**) e núcleo (**n**). X7200.

Figura - 12



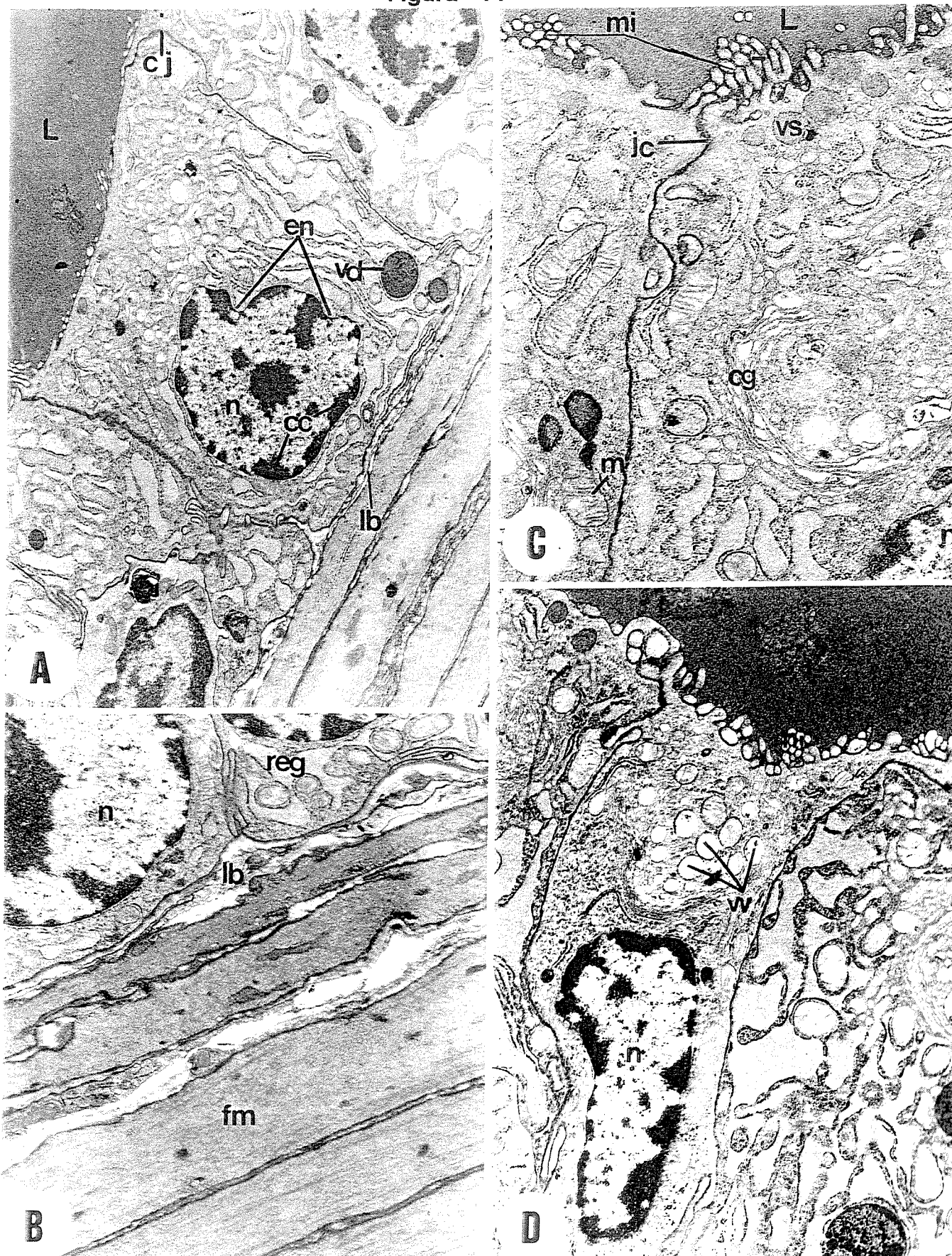
**Figura 13** Eletromicrografias das células epiteliais da glândula de coagulação de camundongos diabéticos induzidos pela aloxana. **A** – Vista panorâmica. Nota-se, células epiteliais atrofiadas, núcleo (**n**) com cromatina condensando-se na periferia bem como ao redor do nucléolo (**nu**), envelope nuclear (**en**) intacto com acentuada reentrância, ruptura de microvilos (**mi**). Lúmen (**L**). X7200. **B** – Detalhe evidenciando diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular (**reg**) e núcleo (**n**) com a cromatina condensada. X12000. **C, D** – Região basal. Observa-se espessamento do estroma, fibras musculares lisas (**fm**), fibras colágenas (**fc**) e lâmina basal (**lb**) e retículo endoplasmático granular (**reg**). X12000. **E** – Detalhe de um vacúolo multivesicular (**cm**). X12000. **F** – Região apical. Evidencia-se complexo de Golgi (**cg**) dilatado, rupturas das cristas mitocondriais (**m**) e microvilos (**mi**). Lúmen (**L**). X12000.

Figura - 13



**Figura 14** Eletromicrografias das células epiteliais da glândula de coagulação de camundongos diabéticos espontâneos NOD. **A** – Vista geral. Nota-se atrofia das células do epitélio secretor, lâmina basal (**lb**), vacúolos digestivos com alta eletrondensidade (**vd**), complexo juncional (**cj**), núcleo (**n**) com cromatina condensando-se em forma de grumos na periferia (**cc**), envelope nuclear (**en**) intacto apresentando reentrâncias. Lúmen (**L**). X7200. **B** - Região basal nota-se estroma com volumosas fibras musculares lisas (**fm**), lâmina basal (**lb**), diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular (**reg**). X12000. **C** - Detalhe da região supranuclear nota-se vacúolos contendo pouca secreção de aspecto floculento (**vs**), dilatação das cisternas do Golgi (**cg**), ruptura de microvilos (**mi**) e de cristas mitocondriais (**m**) e junções comunicantes (**jc**). Lúmen (**L**). X18000. **D** – Região apical evidenciam-se proeminentes vacúolos vazios (**vv**), vacúolos com alta eletrondensidade, ruptura de microvilos (**mi**), núcleo (**n**) e lúmen (**L**). X12000.

Figura - 14



## **V – DISCUSSÃO**

## V – DISCUSSÃO

O diabetes mellitus provoca desordens metabólicas nos diferentes sistemas orgânicos o que tem sido motivo de estudos na tentativa de elucidar a etiologia dessas alterações. A indução do diabetes experimentalmente, em roedores, é amplamente utilizado nesses estudos. A depleção androgênica verificada em animais diabéticos é uma das alterações demonstradas, levando a complicações no aparelho reprodutor masculino. A deficiência androgênica foi descrita por vários autores, os quais atribuíram a diminuição da testosterona ocorrida tanto em homens como em ratos diabéticos, a um possível *feedback* negativo no neuro-eixo ocasionando subsequente perda da capacidade de síntese androgênica dos testículos (Hunt & Baley, 1961; Oksanen, 1975; Daubresse, et al. 1978). A testosterona é o principal andrógeno mantenedor da função e da morfologia das glândulas sexuais acessórias. Entretanto, são conhecidos outros hormônios que também agem tanto direta como indiretamente nessas glândulas como, o estradiol, o luteinizante e o do crescimento. (Smith, et al., 1985; Costello & Franklin, 1994; Eric, 1999).

A insulina, embora não seja um hormônio de ação direta, é conhecido que sua interação à testosterona, seja de fundamental importância para o desenvolvimento e manutenção morfofisiológica das glândulas sexuais acessórias (Seethalakshmi et al., 1987). É conhecido, que o diabetes induz alterações morfológicas no aparelho reprodutor masculino, semelhantes aos observados em animais castrados (Cagnon, et al. 2000). As glândulas sexuais acessórias são amplamente estudadas nas diferentes espécies, devido sua relação com a diminuição dos níveis androgênicos (andropausa) os quais, estão diretamente relacionados com o surgimento certas patologias. A privação androgênica experimentalmente devido a orquidectomia, hipofisectomia, administração de hormônios antagonistas como os estrógenos ou antiandrógenos altera a morfologia tanto do epitélio secretor como do estroma das glândulas sexuais acessórias. Além disso, acelera o desencadeamento de morte celular programada,

alteram a capacidade de proliferação e secreção, síntese de DNA, conteúdo e complexidade de RNA e diminuição na quantidade de receptores androgênicos (Aumüller, 1977; Kiess & Gallaher, 1998; Kubo et al., 1998). Dessa forma, a presente discussão fará referências paralelas a roedores castrados e diabéticos comparando as mudanças morfológicas da próstata dorsal e glândula de coagulação.

No presente trabalho foram observados elevados níveis de proteína e glicose na urina, tanto dos animais diabéticos induzidos pela aloxana como nos animais espontaneamente diabéticos (Nod), quando comparados aos animais do grupo controle. Hunt & Baley (1961) já haviam demonstrado aumento dos níveis de glicose na urina de ratos diabéticos experimentalmente, pela aloxana, após uma semana da injeção da droga. Posteriormente, Ader et. al. (1998) observaram a destruição das células beta do pâncreas e acentuado grau de intolerância à glicose em cães tratados com aloxana. Também, Makino, et al. (1980) obtiveram uma nova linhagem de animais os quais se caracterizaram diabéticos não obesos (Nod), após terem cruzado por seis gerações camundongos com altos níveis de glicose na urina. Assim sendo, os presentes resultados foram compatíveis aos encontrados na literatura, caracterizando o estado diabético dos animais experimentais, confirmando o modelo estudado.

Para os pesos corpóreos finais médios dos animais diabéticos por aloxana observou-se acentuada diminuição quando comparados aos controles, sendo esta relação estatisticamente significativa. Tal resultado, também foi demonstrado tanto em homens considerados clinicamente diabéticos como em animais diabéticos experimentalmente (Daubresse, et. Al., 1978, Makino, et. al., 1980, Seltalakishimi, et. al., 1987). Isto posto, sugerimos que o diabetes prejudica o metabolismo global dos animais levando-os à perda de peso.

Macroscopicamente, a glândula de coagulação dos animais Nod destacou-se pelo grande volume apresentado na concavidade da vesícula seminal. Essas alterações puderam ser comprovadas estatisticamente através dos pesos frescos das referidas glândulas, sendo esses aumentos significativos quando comparados

aos observados nos grupos, controle e diabético por aloxana. Apesar da glândula de coagulação, dos animais diabéticos por aloxana, não apresentar acentuado aumento do volume, como nos animais Nod, numericamente o peso dessa também foi maior em relação aos animais controles. Na literatura, não foram encontrados estudos sobre os pesos das diferentes glândulas sexuais acessórias, em camundongos Nod. Entretanto, alguns autores observaram redução geral dos pesos das glândulas sexuais acessórias de ratos diabéticos por estreptozotocina, inferindo que cada glândula pertencente ao complexo perdera peso (Paz, et al., 1978; Jackson & Hutson 1984). O presente estudo é contrário aos descritos por esses autores. Assim sendo, sugerimos que o peso aumentado da glândula de coagulação, dos animais diabéticos, foi resultado do aumento dos elementos que constituem a matriz estromal, demonstradas em níveis microscópicos no presente estudo.

Em microscopia de luz, tanto a próstata dorsal como a glândula de coagulação dos animais controles apresentaram características morfológicas semelhantes aos descritos por Jesik, et. al.,(1981). Ambas as glândulas nos animais diabéticos apresentaram aparente aumento do tecido estromal, diminuição do lúmen, afastamento entre os ácinos e diminuição do pregueamento da mucosa. Cagnon, et. al.,(2000) notaram tanto o aumento do tecido estromal como a diminuição do pregueamento da mucosa na próstata ventral de camundongos diabéticos pela estreptozotocina. Entretanto, as alterações referentes à diminuição do lúmen e afastamento entre os ácinos em animais diabéticos não foram encontrados relatos. Por outro lado, Cavazos (1975) estudando ratos castrados, observou diminuição do lúmen e afastamento entre os ácinos das glândulas acessórias, atribuindo tais características à ausência de testosterona. Carvalho & Line (1996) notaram aumento dos elementos estromais (músculo liso, fibras colágenas e elásticas) após a castração de ratos e inferiram que essas alterações são mecanismos para manter a integridade do epitélio secretor. Dessa forma, supomos que o aumento exacerbado do estroma tanto na próstata dorsal como na glândula de coagulação de camundongos diabéticos

podem ter ocorrido na tentativa de dar suporte, impedindo a desestruturação do epitélio glandular. Acreditamos também, que o afastamento entre os ácinos foi resultado direto tanto do aumento dos elementos estromais como da diminuição do diâmetro dos ácinos.

Os epitélios secretores das referidas glândulas dos animais diabéticos apresentaram-se atrofiados quando comparados aos animais do grupo controle. A atrofia epitelial foi demonstrada através do decréscimo celular o que pode ser atribuído, especialmente, à diminuição do volume citoplasmático. Alterações semelhantes foram descritas por Hunt & Baley (1961) e Daubresse (1975) que notaram as atrofias dos epitélios secretores das glândulas sexuais acessórias em ratos diabéticos. Além disso, tanto Crowe, et, al. (1987) como Cagnon, et, al. (2000), em estudos com ratos e camundongos diabéticos por estreptozotocina, observaram atrofias dos epitélios secretores da próstata ventral caracterizada pela diminuição das alturas celulares. Através da análise morfométrica, confirmamos que as células epiteliais sofreram reduções significativas de volumes, os quais se expressaram principalmente pelas atrofias citoplasmáticas. Assim sendo, concluímos que o diabetes influenciou negativamente a estrutura tanto da próstata dorsal como da glândula de coagulação.

Os núcleos das células epiteliais de ambas as glândulas dos animais diabéticos tiveram o volume nuclear numericamente menor quando comparados aos animais do grupo controle. Estatisticamente, não se evidenciou diferença significativa. Contudo, a forma esférica dos núcleos apresentada nos animais diabéticos foi estatisticamente diferente quando comparada aos dos controles, os quais apresentavam forma elíptica. Na literatura não foram encontrados estudos em animais diabéticos com relação ao comportamento do volume nuclear. Dessa forma, concluímos que apesar do volume nuclear das células epiteliais dos animais dos grupos diabéticos não serem estaticamente diferentes dos animais controles, houve tendência desses à diminuição volumétrica.

Ultra-estruturalmente, a próstata dorsal dos animais controles foi semelhante às descritas por Aumüller & Adler, 1979 e a glândula de coagulação às

de Cavazos, 1975; Samuel & Flickinger, 1987. Dentre as alterações ultra-estruturais dessas glândulas, tanto nos animais diabéticos por aloxana como nos Nod, destacaram-se o espessamento do estroma, a desorganização das organelas envolvidas no processo secretor e acentuadas reentrâncias do envelope nuclear.

A próstata dorsal dos animais diabéticos apresentou espessamento dos elementos que constituem a matriz extracelular quando comparados aos animais do grupo controle, sendo essas alterações, destacadas nos animais espontaneamente diabéticos (Nod). Na literatura não foram encontrados relatos a respeito do comportamento da matriz extracelular da próstata dorsal de animais diabéticos. Segundo Cagnon, et al. (2000) a próstata ventral de camundongos diabéticos, experimentalmente por estreptozotocina, demonstrou hipertrofia dos elementos estromais. Contudo, os autores não especificaram quais dos elementos apresentaram-se alterados. Por outro lado, verificou-se que tal alteração ocorreu nas diferentes glândulas sexuais acessórias de roedores submetidos à castração (Dahl & Kjaermin, 1973; Aumüller & Seitz, 1979). Carvalho & Line (1996); Carvalho, et. al. (1997) observaram aumento de fibras elásticas e colágenas do tipo IV na matriz extracelular da próstata ventral de ratos castrados. Sabe-se que a interação do epitélio glandular com a matriz extracelular é de fundamental importância para os diversos estágios da morfogênese, da diferenciação celular e da função geral do epitélio secretor da próstata (Hall, 1978; Hay, 1891; Hay, 1983; Trelstad, 1987; Lin & Bissel, 1993). Embora, o atual estudo não tenha priorizado as mudanças da matriz extra-celular, acreditamos na hipertrofia das células musculares. Sugerimos que tal alteração seja parcialmente responsável pela manutenção estrutural e funcional da glândula prostática.

As principais modificações caracterizadas, nas células epiteliais da próstata dorsal dos animais diabéticos, foram à diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular, a dilatação das cisternas do Golgi e a vacuolização do citoplasma nas regiões supranuclear e apical, sendo essa última, confirmada pelo volume relativo e densidade de área. Cagnon, et. al. (2000) observaram tais alterações na próstata ventral de camundongos diabéticos pela estreptozotocina.

Também, Aumüller & Adler (1979) verificaram em ratos castrados, que as células epiteliais da próstata dorsal apresentaram acentuada diminuição do retículo endoplasmático granular. Segundo Aumüller, et al. (1981) a castração induz à degradação das membranas biológicas das células das glândulas acessórias, caracterizando-se pela diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular, dilatação das cisternas do Golgi e acúmulo de vacúolos vazios, demonstrando falhas no mecanismo secretor das células. Assim, inferimos que o diabetes influenciou negativamente as organelas envolvidas no processo secretor levando-as, além da desestruturação das biomenbranas à deficiência na produção, empacotamento e transporte do material produzido por essa glândula sexual acessória.

Quanto aos núcleos das células dessa glândula nos animais diabéticos o envelope nuclear apresentou-se intacto, porém, com acentuadas reentrâncias e cromatina condensada na periferia. Tais características foram observadas no lobo ventral de camundongos diabéticos pela estreptozotocina (Cagnon, et.al.,2000). Kubo, et al. (1998), em experimentos com ratos castrados, identificaram núcleos com condensação periférica da cromatina atribuindo tais características aos diferentes estágios de núcleos das células epiteliais da próstata ventral em processo de “morte celular programada” (Apoptose). Comparando tais observações com às do presente estudo, verificamos similaridade da alteração comportamental dos núcleos da próstata dorsal desses animais. Assim, ficou caracterizado que o diabetes interferiu no ciclo celular normal, provavelmente acelerando o processo de morte celular programada.

As alterações ultra-estruturais da glândula de coagulação dos animais diabéticos foram semelhantes às descrições morfológicas da próstata dorsal. Dentre as alterações destacaram-se, a diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular, dilatação das cisternas do Golgi e aumento de vacúolos digestivos na região apical e supranuclear, confirmados pelos volumes relativos e densidade de área. A literatura não relata tais alterações na glândula de coagulação de animais diabéticos. Por outro lado, Cavazos (1975) observou em

ratos e camundongos submetidos à castração, a desorganização e diminuição das cisternas do retículo endoplasmático granular nas células epiteliais da glândula de coagulação. Assim sendo, concluímos que o diabetes influenciou negativamente o sistema de biomembranas das diferentes organelas envolvidas no processo secretor, prejudicando o funcionamento glandular.

No presente trabalho não fizemos a dosagem de andrógenos no soro sangüíneo. É conhecido a partir da literatura, que o diabetes causa redução dos hormônios gonadotróficos, com redução subsequente da secreção do hormônio testicular. Também, Dubresse, et. al. (1978) verificaram em homens diabéticos baixos níveis de testosterona e dos hormônios gonadotróficos atribuindo esses à alteração do eixo hipotálamo-hipófise-gônadal (Hunt & Baley, 1961). Diferentes autores verificaram que os usos simultâneos de insulina e testosterona são fundamentais para a manutenção morfológica e funcional da próstata (Lostroh, 1971; Sufrin e Scott, 1972; Santti & Johanson 1973). Tissel & Angervall (1977); Jackson & Hutson (1984) demonstraram recuperação das características morfo-funcionais das glândulas sexuais acessórias, sendo essa marcadamente dependente da quantidade de insulina disponível no soro sangüíneo. Esses autores afirmaram que as alterações das glândulas sexuais acessórias nos animais diabéticos não ocorrem simplesmente em função da diminuição dos níveis de testosterona, inferindo que a ausência de insulina deva alterar o mecanismo bioquímico celular prejudicando a ação normal do andrógeno. Dessa forma, inferimos que a similaridade das alterações verificadas ocorrem principalmente, pelo funcionamento deficiente do eixo hipotálamo-hipófise-gônadal.

Após a análise qualitativa e quantitativa das células epiteliais, das glândulas estudadas, demonstramos que essas alterações nos animais diabéticos Nod foram exacerbadas quando comparadas aos animais diabéticos induzidos quimicamente por aloxana. Baseado na intensificação das alterações morfológicas dos animais Nod, inferimos que a aloxana é realmente uma droga eficaz na indução do diabetes e, provavelmente, não afeta diretamente as células das glândulas sexuais acessórias. Portanto, as alterações descritas foram

provenientes do estado diabético. Apesar das diferenças, as glândulas sexuais acessórias sofreram influências nocivas tanto na estrutura como na ultra-estrutura frente ao diabetes. Presumimos que a semelhança das alterações verificadas, deveram-se à homogeneidade da dependência adrogênica das glândulas sexuais acessórias (Dahl, et, al.1973). Além disso, é conhecido que a próstata dorsal e a glândula de coagulação têm em comum além das características morfológicas, as funcionais, como a produção da transglutaminase, proteínas dorsais I e II (Aumüller & Seitz, 1990, Steinhoff, et al.,1994). Após a correlação da literatura ao presente resultado, concluímos que o diabetes experimental levou a importantes mudanças na estrutura e ultra-estrutura das células epiteliais secretoras da próstata dorsal e da glândula de coagulação de camundongos. Podendo assim, contribuir para o decréscimo da fertilidade.

## **VI - CONCLUSÕES**

## VI - CONCLUSÕES

1. Os níveis de proteína e glicose na urina dos animais diabéticos foram elevados em relação aos controles, evidenciando-se o estado diabético dos camundongos.
2. Os animais diabéticos induzidos por aloxana tiveram peso corpóreo menor quando comparados com os animais do grupo controle.
3. A glândula de coagulação dos animais diabéticos apresentaram hipertrofia macroscópica bem como peso fresco maior quando comparados aos animais do grupo controle.
4. As células do epitélio secretor tanto da próstata dorsal como da glândula de coagulação dos camundongos diabéticos sofreram atrofia a qual foi atribuída principalmente ao decréscimo do volume citoplasmático.
5. Os núcleos das células epiteliais da próstata dorsal e da glândula de coagulação dos animais diabéticos (aloxana e Nod) tiveram volume menor quando comparados aos animais do grupo controle.
6. Os núcleos das células epiteliais dos animais diabéticos (aloxana e Nod) acompanharam a atrofia citoplasmática apresentando-se com formato esférico quando comparados aos núcleos dos animais controles que demonstraram forma elíptica.

7. O diabetes alterou ultra-estruturalmente as organelas celulares envolvidas no processo secretor tanto da próstata dorsal como da glândula de coagulação dos animais diabéticos (aloxana e Nod).
8. Apesar dos efeitos deletérios do diabetes sobre o epitélio secretor de ambas glândulas observou-se continuidade do processo secretor.

## **VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, M, RICHEY, J.M, BERGMAN, R.N. Evidence for direct action of aloxana to induce insulin resistance at the cellular level. *Diabetologia, California*, v.41,p1327-1336.1998.
- ANDERSON, L.C., SULEIMAN, A.H.,GARRETT, J.R. Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland. *Microscopy Research and Technique*, England, v.27,p.61-70.1994.
- ANDERSSON, H., TISSEL, L-E. Morphology of rat prostatic lobes and seminal vesicles after long-term estrogen treatment. *Acta path.microbiol.immunol.scand.sect. v.90(A)*,p.441-448. 1982.
- ARDUÍNO, J. Diabetes Mellitus. Cap I. *Diabetes Mellitus*, 1962.
- AUMÜLLER,G, ADER,G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat.*Cell Tissue Res.*v.198,p.145-158.1979.
- AUMÜLLER G., GIERS K., GIERS U. VÖLK A. and SEITZ J. p-Chlorophenylaniline-induced proliferation of the seminal vesicle epithelium. *Cell Tissue Res.*, **219**, 159-172, 1981.
- AUMÜLLER,G, SEITZ, J. Protein secretion and secretory process in male accessory sex gland. *Int. Rev. of cytology*. Germany,v.121,p.127-231. 1990.
- AUMÜLLER,G.,VESPER,M.,SEITZ.,KEMME,M.,SCHEIT,K.H.. Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. *Cell Tissue Res.* v.252(2),p.377-84. May 1988
- AVEDANO, G.F, AGARWAL, R.K, BASHEY, R.I, LYONS, M.M, SONI, B.J, JIOTHIRMAYI, G.N, REGAN, T.J. Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. *Diabetes, Alexandria*, v.48:(7),p.1443-1447.1999.
- BRADSHAW, B.S., WOLFF, H.G. Coagulation proteins in the seminal vesicles and coagulating gland of the mouse. *Biol. Reprod.*, v.16,p.9-36.1977.
- BRANDES, D., PORTELA, A. The fine structure of the epithelial cell of the mouse prostate. *J. Biophysic and Biochemical Cyto Atlanta*,v.7,n.3,p.511-518.1959.

- BRANDES D. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *Int. Rev. Cytol.* v.20,p.207-276. 1966
- BYRNE, M.M., STRINS, J., O'MEARA, N.M., & POLONSKY, K.S. "Insulin secretion in humans: Physiologic regulation and alteration in disease states. Chapter 1. *Diabetes Mellitus*. p.3-11. 1996.
- CAGNON, V.H.A, CAMARGO, A.M., ROSA, R.M., FABIANI, C.R, PADOVANI, C.R. & MARTINEZ, F.E. Ultrastructure study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57bl/6j). *Tissue and Cell*. V.32(4),p.275-283.2000.
- CARVALHO, H.F. & LINE, R.S.P. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following. *Cell. Biology international*. Brasil, v.20, n.12, p.809-819. 1996.
- CARVALHO, H.F., TABOGA, R.S. & VILAMAIOR, L.S. Collagen type IV is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic estroma. *Tissue & Cell*. V.29, p.163-170. 1997.
- CAVAZOS, F. Fine structure and functional correlates of male accessory Sex gland of rodentes. *American Physiological Society* Washington, Boston, v.5:(7), p.353-380. 1975.
- COSTELLO, L.C., FRANKLING, R.B. Effect of prolactin on the prostate. *Prostate*. v.24, p.162-166. 1994.
- CREUTZFELDT, W., et al, *The Genetics of the Diabetics Mellitus*. New York Springer Verlag, 1976.
- CROWE, R., MILNER, P., LINCOLIN, J., BURNSTOCK, G. Histochemical and biochemical investigation of adrenergic, cholinergic and peptidergic innervation of the rat ventral prostate 8 weeks after streptozotocin-induced diabetes. *J. Auton. Nerv. Syst.*, v.20, p.103. 1987.
- CUKIERKI, M.A., SINA, J.L., PRALAHADA, J., WISE, L.D., ANTONELLO, J.M., McDONALD, J.S., ROBERTSON, R.T. Decreased fertility in male rats administered the 5 $\alpha$  reductase inhibitor finasteride is due to deficits in copulatory plug formation. *Reproductive Toxicology*, v.5, p.353-362. 1991.
- DAHL, E., KJAERHEIM A. and TVETER K. J. The ultrastructure of the accessory sex organs of the male rat, I Normal structure. *Z. Zellforsch.* 37, 345-359. 1973.

- DAUBRESSE, J.C., MEUNIER, J., WILMOTTE, A.S., LUYCKX, A.S. & LEFEBVRE, P.J. Pituitary-testicular axis in diabetic men with and without impotence sexual. *Diabete & Metabolisme*, Belgique, v.4, p.233-237. 1978.
- ELLEMBERG & RIFKIN, 1962. Appud CARSON, K.A. *Cytochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in the hereditary mouse model for diabetes mellitus*. A dissertation submitted to the faculty of the University of North Carolina at Chapel Hill. Doctor of Philosophy. Chapel Hill, N.C. USA. 1979.
- FRENKEL, G.P., HOMONNAL, Z.P., DRASNIN, N., SOFER, A., KAPLAN, R. & KRAICER, P.F. Fertility of the streptozotocin-diabetic male rat. *Andrologia*, Israel, v.10, n.2, p.127-136. 1977.
- FUSHINI, H. The effect of parabiosis on serum and Kidney glicosidase activities in spontaneously diabetic mice. *Diabetologia*, v.19, p.50-53. 1980.
- GOMORI, G., GOLDNER, M.G. Production of diabetes mellitus in rats with aloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Chicago, v.54, p.287-290. 1943.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ª ed. Philadelphia. p.892-894, cap.78, 1996.
- HÄRKÖNEN, P.L., VÄÄNÄNEN, H.K. Androgen regulation of carbonic anhydrase II, a major soluble protein in rat lateral prostate tissue. *Biol. Reprod.* v38, p.377-384. 1988.
- HAWKINS, E.W., GEUZE, J.J. Demonstration and partial characterization of cytosol receptors for testosterone. *Biochemistry*, v.14, p.3094-3101. 1975.
- HERBERG, L., COLEMAN, D. Laboratory Animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism*, v.26, p.59-99. 1977.
- HITOSHI, K., SUSUMU, M. The murine autoimmune diabetes model: Nod and related strains. *Advances in Immunology*, Japan, v.51, p.285-322. 1990.
- HO, S.M., Prostatic androgen receptor and plasma testosterone level in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biological, Great Britain*, v.38, n.1, p.67-72, mar, 1990.

- HUGGINS, C.B., JOHNSON, A.A. Chemical observations on fluids of the seminal tract. *The American Journal of Physiology*, Chicago, v.103,n.3,p.574-581,nov.1932.
- HUNT, E.L., BAILEY, D.W., The effects of alloxan diabetes on the reproductive system of young male rats. *Acta Endocrinologica*, Georgia, v.38,p.432-440,may.1961
- JACKSON, F.L., HUTSON, J.C. Altered responses to androgens in diabetic male rats. *Diabetes*, v.33,p.819.1984.
- JESIK, C.J., et al. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *The Prostate*, Chicago, v.3,p.81- 97,1982.
- KURKIEWICZ A, LANGELOH A, GUEDES A.D. Time-response curves for barium and noradrenaline in vas deferens of castrated rat. *Eur J Pharmacol*, v.15;45(2),p.145-151, Sep,1977.
- KARNOVSKY, J.M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopic. *J. Cell. Biology*, v.27,p.137A-138A,1965.
- KOVAKS, J, ZILAHY, M, BANYASZ, T, GOMBA, S. Evaluation of apoptosis and cell proliferation in experimentally induced renal cysts. *Urological Research*, New York, v.26;(6),p.411-416,dec 1998.
- LEE, Y.J, PARK, Y.M, CHOI, E.M. Oxidative DNA in rats with diabetes induced by alloxan and streptozotocin. *Journal of Biochemistry and Molecular*
- LOSTROH, A.J. Effects of testosterone and insulin in vitro on maintenance and repair of the secretory epithelium of the mouse prostate. *Endocrinology*, v.88,p.500-503. 1971.
- MAKINO, S., et al. Breeding of a non obese diabetic strain of mice. *Exp. Anim.*, v.29,p.1-13.1980.
- MARKUS, R.P., GONÇALO, M.C., LAPA, A.J. Castration atrophy and pharmacological reactivity of the rat coagulating glands. *Brazilian J Med Biol Res*, v.14,p.181-185.1981.
- MARTINS, T.H., VALLE, J.R. Contractilité et pharmacologie comparée *in vitro* des canaux déferents de *Macacus rhesus* normaux, castrés au injectés d'hormones sexuelles. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales* (Paris), v.129,p.1122-1125.1938.

- MARTINS, T.H., VALLE, J.R. Endocrine control of the motility of the male accessory genital organs. *Endocrinology*, v.25, p.80-90, 1939.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE,; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE ; CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA ; *GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA*. Cap. 5.5.1998.
- NARBAITZ, R. Embryology, anatomy and histology of the male sex accessory glands. In: Brandes, D. *Male sex accessory organs*. New York: Academic Press, p.3-15, 1974.
- NATTRAS, M., HALLE, P.F. Clinical Endocrinology and Diabetes. in: *Diabetes Mellitus* New York: Churchill Livingstone, p.p.155-182, 1988.
- NOTIDES, A.C., WILLIAMS-ASHMAN, H.G. The basic protein responsible for the clotting of guinea pig semen. *Proc. Natl. Acad. Sci. Us*, v.58, p.1991-95, 1967.
- OKSANEN, A. Testicular lesion of streptozotocin diabetic rats. *Hormony Res.*, Finland, v.6, p.138 -144, 1975.
- ORIE, N.N., ANYAEGBU, N.O. Nifedipine effectively lowers salt-induced high blood pressure in diabetic rats. *General Pharmacology*, Oxford, v.32:(4), p.471-474, apr 1999.
- PALOMAR-MORALES, M, BAIZA, L.A, VERDIN-TERAN, L, ROMAN-RAMOS, R, ALTAMIRANO-LOZANO, M, MENDEZ, J.T. Fetal development in alloxan-treated rats. *Reproductive Toxicology*, Mexico, v.12:(6), p.659-665, dec 1998.
- PAZ, G., HOMMONAI, Z.T., HARELL, A., KRAICER, P.F. Improvement in the fertility of streptozotocin-diabetic male rats following treatment with insulin and human chorionic gonadotropin. *Israel J Med Sci*, v.14, p.1073, 1978.
- PEREZ, R.M, PEREZ, C, PEREZ, S, ZAVALA, M.A. Effect of triterpenoids of *Bouvardia terniflora* on blood sugar levels of normal and alloxan diabetic mice. *Phytomedicine*, Mexico, v.5:(6), p.475-478, dec 1998.
- PICARELLI Z.P & VALLE J.R. Hormonal regulation of rat seminal vesicle sensitivity to adrenaline, noradrenaline, acetylcholine and acetyl-beta-methylcholine. *Br J Pharmacol*, v.35(3), p.468-75, Mar, 1969.
- PRICE, D. Comparative aspects of the development and structure in the prostate. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v.12, p.1-27, 1963.

- PRINS, G.S. Differential regulation of androgen receptors in the separate rat prostate lobes: androgen independent expression in the lobe lateral. *J. Steroid. Biochem.* v.33,3, p.319-326. 1989.
- RAVIKUMAR, P, ANURADHA, C.V. Effects of fenugreek seeds on blood lipid peroxidation and antioxidants in diabetic rats. *Phytotherapy Reserch*, India, v.13:(3), p.197-201, may 1999.
- REITER, E., HENNUY, B., BRUYNINX, M., CORNET, A., KLUG, M., McNAMARA, M., CL OSSET, J., HENNEN, G. Effects of pituitary hormones on the prostate. *The Prostate*. v.38, p.159-165. 1999.
- RENNIE, P.S., BOUFFARD, R., BRUCHOVSKY, N., CHENG, H. Increased activity of plasminogen activators during involution of the rat ventral prostate. *Biochem J*, v.221,1, p.171-178. 1984.
- ROBBINS, S.L Doenças Sistêmicas. In: Diabetes Mellitus. *Patologia Estrutural e Funcional*. Canadá: W.B. Saunders Company, p.p.238-250, 1989.
- SAMUEL, L.H., FLICKINGER, C.J. Intracellular pathway and kinetics of proteins secretion in the coagulating gland of the mouse. *Biology of Reproduction*, Virginia, v.34, p107-117. 1986.
- SANTTI, R.S. and JOHANSON, R. Some Biochemical effects of insulin and steroid hormones on the rat prostate in organ culture. *Experimental Cell Reserch*, Finland, v.77, p.111-120, mar. 1973.
- SAPRYKINA, E.V, KOSLOV, Y.A, SOSNINA, N.V, NOVITSKY, V.V. The study of phospholipidin liver of mice with alloxan diabetes. *Voprosy meditsinskoi khimii*, Moskow, v.44:(4), p376-379, aug 1998.
- SHAIN S.A, BOESEL R.W, AXELROD L.R. Aging in the rat prostate. Reduction in detectable ventral prostate androgen receptor content. *Arch Biochem Biophys*, v.167(1), p.247-63, Mar, 1975
- SEETHALAKSHMI, L, MENON, M & DIAMOND, D. The effects of streptozotocin induced diabetes on the neuro endocrine male reproductive tract axis of the adult rat. *J. Urology*, v.138, p.190. 1987
- SETCHELL, B.P., BROOKS, P.E. Anatomy, Vasculature, Inervation and fluids of the male reproductive tract. In Knobil, E., Neill, J., *The phisiology of reproduction*. New York raven Press, p.753-836, 1988.

- SLÖSTRAND, N.O., SWEDIN, G. Influence of age, growth, castration and testosterone treatment on the noradrenaline levels of the ductus deferens and the auxiliary male reproductive glands of the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.98, p.323-338.1976.
- SMITH, C., ASSIMOS, D., LEE, C., GRAYHACK, J.T. Metabolic action of prolactin in regressing prostate: independent of androgen action. *Prostate*. v.6, p.49-59.1985.
- STEFAN, S.F. Definition and Classification of Diabetes Including Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Diabetes Mellitus*, A fundamental and clinical text. Cap27, p.251-29.1996.
- STEINHOFF, M., EICHELER, W., HOLTERHUS, P.M., RAUSCH, U., SEITZ, J., AUMÜLLER, G. Hormonally induced changes in apocrine secretion of transglutaminase in the rat dorsal prostate and coagulating gland. *European J of Cell Biology*, v.65, p.49-59.1994.
- SUFRIN, G. and SCOTT, W.W. Effect of drug-induced diabetes on response accessory sex organs of castrate rats to testosterone propionate. *Urologic Sugery*. v.23, p.534-535.1972.
- TISSEL, L.E., The growth of the ventral prostate, the dorso-lateral prostate, the coagulating glands and seminal vesicles in castrated and adrenalectomized rats inject with estradiol. *Acta Endocrinol.*, v.68, p.485-501, 1971.
- VICENTINI, C.A., ORSI, A.M., SCHWALD, W., MELLO DIAS, S., MELO, V.R. de Contribuição ao estudo morfológico das glândulas anexas do trato reprodutor masculino em cobaia (*Cavia porcellus*, L). Estruturas das glândulas coaguladoras de sêmen e bulbouretrais. *Ver.Ciênc.Biomed.*, v.5, p.33-39. 1984.
- WAKADE, A.R., GARCIA, A.G., KIPERKAR, S.W. Effect of castration on the smooth muscle cells of the internal sex organs of the rat: Influence of the smooth muscle on the sympathetic neurons innervating the vas deferens, seminal vesicle and coagulating glands. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.193, p.424-434.1975.
- WONG, Y.C. Fine structural and functional study of the prostatic complex of the guinea pig. *Acta Anatomica*, Hong Kong, v.109, p.289-312, jul.1980.
- WILSON E.M, VISKOCHIL D.H, BARTLETT R.J, LEA O.A, NOYES C.M, PETRUSZ P, STAFFORD D.W, FRENCH F.S. Model systems for studies on

androgen-dependent gene expression in the rat prostate. *Prog Clin Biol Res*, v.75(A), p.351-380, 1981.

YIUDIRIM, S, AYAN, S, SARIOGLU, Y, GULTEKIN, Y, BUTUNER, C. The effects of long-term oral administration of L-arginine on the erectile response of rabbits with alloxan-induced diabetes. *BJU International*, Oxford, v.83:(6), p.679-675, apr 1999.