

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ELAINE MANOELA PORTO AMORIM

**“RELAÇÃO ENTRE O DIABETE MATERNO E O
DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA
PROLE MASCULINA DE RATOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Elaine Manoela Porto Amorim

e aprovada pela Comissão Julgadora.
Wilma De Grava Kempinas

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Co-Orientadora: Profa.Dra. Débora Cristina Damasceno

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Am68r	<p>Amorim, Elaine Manoela Porto Relação entre o diabete materno e o desenvolvimento sexual da prole masculina de ratos / Elaine Manoela Porto Amorim. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadores: Wilma de Grava Kempinas, Débora Cristina Damasceno. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Rato. 2. Diabetes na gravidez. 3. Desenvolvimento sexual. 4. Reprodução. I. Kempinas, Wilma de Grava. II. Damasceno, Débora Cristina. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Relationship between the maternal diabetes and the sexual development of the male rat offspring.

Palavras-chave em inglês: Rats; Diabetes in pregnancy; Sexual development; Reproduction.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Wilma de Grava Kempinas, Sebastião Roberto Taboga, Gustavo Tadeu Volpato.

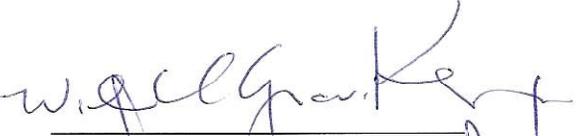
Data da defesa: 15/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

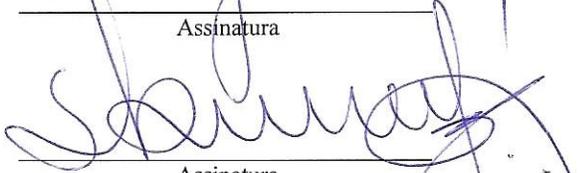
Campinas, 15 de fevereiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

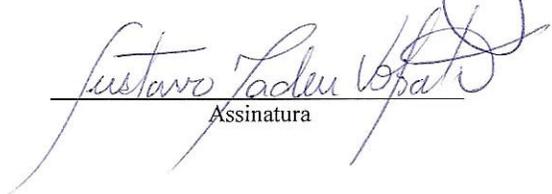
Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga


Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino

Assinatura

Profa. Dra. Maria Dalva Cesário

Assinatura

Tantas vezes pensamos ter chegado,

Tantas vezes é preciso ir além.

(Fernando Pessoa).

Dedico este trabalho...

A minha linda filhinha Bianca, que veio ao mundo na etapa final de realização deste trabalho... Com certeza ela é a minha maior vitória nesta vida e é por ela que lutarei todos os meus dias... Só eu sei o que eu senti quando seus olhinhos olharam os meus pela primeira vez...

*“Eu tenho tanto pra lhe falar
Mas com palavras não sei dizer
Como é grande o meu amor por VOCÊ!”*

Agradecimientos

À Deus, pela vida...

“A ti, ó Deus, glorificamos, a ti, damos louvor, pois o teu nome está perto, as tuas maravilhas o declaram” (Salmo 75).

Aos meus pais, Márcio e Albani, por sempre estarem ao meu lado, apoiando e incentivando, comemorando comigo cada conquista.

“Vocês um dia sonharam comigo... e me amaram antes que eu existisse. Vocês se alegraram com minha chegada ao mundo como alguém que recebe um lindo presente, e renunciaram muitas vezes aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Muito obrigada por vocês existirem. Amo vocês!”.

Ao meu marido João Paulo pelo companheirismo e amizade.

“Amo-te afim, de um calmo amor prestante, E te amo além, presente na saudade. Amo-te, enfim, com grande liberdade dentro da eternidade e a cada instante.”

(Vinícius de Moraes)

À Professora Dra. Wilma De Grava Kempinas pela orientação, dedicação e ensinamentos durante esses seis anos de convivência. Durante este tempo em que trabalhamos juntas ela foi muito além de seu papel de orientadora, tendo sido uma grande amiga e conselheira.... A concretização desse trabalho deve-se ao seu empenho, e sem dúvida nenhuma, por ter acreditado e investido em mim. O trabalho termina, mas a amizade e admiração são eternas...

Aos meus irmãos, Márcio e Mariana, meus cúmplices e os melhores “tios” do mundo!

À minha avó Laura e aos meus padrinhos, Júlio e Tina, por sempre estarem ao meu lado comemorando comigo cada vitória.

À Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno pela ajuda e ensinamentos.

À Sra. Líliam Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela imensa ajuda e amizade. Sem a sua dedicação, paciência e atenção o trabalho seria mais difícil..

À Sra. Luciana Cristina Montes, secretárias do Depto.de Morfologia/IBB-UNESP (Botucatu), pela amizade e serviços prestados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução e do Desenvolvimento: Glaura, Taiane, Raquel, Gustavo, Ana Paula, Carla, Juliana, Marina, Fabíola, Davi pelos momentos de alegria e descontração... em especial a minha amiga Arielle que sempre esteve ao meu lado....

Aos meus grandes amigos e companheiros: Juliana (Herva), Cris, Laura (Melão), Elaine (Matus), Daniel (Jeca), Pituta, Guiné, Gaspar, Figo, Zeila, Zirigui, Frangote e Encruzilhada (as melhores vizinhas do mundo). A vida em Botucatu teria sido muito chata se vocês não existissem....

À Fernanda (Maçett) e seu filhinho João Vitor, pela amizade e carinho.

Aos amigos da XXXVI turma de Botucatu que se mostraram presentes quando eu menos esperava.

Aos professores do Departamento de Morfologia da UNESP-Botucatu pelos ensinamentos.

Aos professores do curso de Biologia Celular da UNICAMP que muito contribuíram para o meu amadurecimento profissional.

Aos professores Dalva, Francisco e Camila, por terem corrigido e enriqueceram este trabalho com suas correções e sugestões.

Aos professores Sebastião R. Taboga, Gustavo Volpato, Sergio L. Felisbino e Maria Dalva Cesáreo, por terem aceitado o convite em participar da banca.

Aos professores Paulo, Alexandre e Shirlei, do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por terem participado do exame de qualificação.

Ao técnico José Eduardo pela ajuda e serviços prestados.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, em especial a D. Terezinha.

Aos animais de experimentação, meu eterno respeito e gratidão!

A FAPESP e FUNDUNESP pelo apoio financeiro.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho..muito

OBRIGADA!

Sumário

Resumo	1
Abstract	3
Introdução.....	5
Objetivo	22
Referências	22
Capítulo	30
Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao meio intra-uterino hiperglicêmico.....	31
Resumo	32
Introdução.....	33
Materiais e Métodos	34
Resultados.....	40
Discussão	43
Agradecimentos	51
Referências	51
Tabelas.....	58
Legenda da figura	63
Figura.....	65
Conclusões finais.....	72
Anexos	73
Desenho esquemático mostrando os estágios da espermiogênese do epitélio germinativo masculino e os estágios (números em algarismos romanos) da espermatogênese.....	74
Protocolo de experimentação animal	75

RESUMO

Diabetes mellitus é um grupo de desordens metabólicas de etiologia múltipla, caracterizado por defeitos na secreção e/ou ação da insulina. As causas da doença podem ser genéticas e/ou ambientais. O diabetes é uma das complicações metabólicas mais comuns durante a gestação, associado a um aumento nos riscos maternos e morbidade neonatal. Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que um meio intra-uterino anormal durante a vida fetal pode afetar o desenvolvimento, causando prejuízo do crescimento fetal, e aumentar a susceptibilidade da prole em desenvolver doenças crônicas na vida adulta. A hipótese da “programação fetal” sugere que as adaptações que ocorrem durante o desenvolvimento do embrião, em resposta a um meio adverso, provocam alterações permanentes na estrutura e fisiologia do organismo. Já foi demonstrado que o diabetes materno e a hiperglicemia induzida experimentalmente causam anormalidades no crescimento fetal, o que está associado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 na vida adulta. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar as conseqüências do meio intra-uterino anormal, decorrente do diabetes materno, no desenvolvimento e função reprodutiva na pré-puberdade, puberdade e maturidade sexual da prole masculina de ratas em que o diabetes foi induzido experimentalmente antes do acasalamento. Foram utilizadas 74 ratas *Wistar* com 90 dias de idade, divididas em dois grupos experimentais: grupo diabético (n=59), que recebeu, via intravenosa, 40 mg/kg de estreptozotocina, e grupo controle (n=17), que recebeu tampão citrato (0,1M; pH 6,5) nas mesmas condições experimentais. Só foram incluídas no estudo as ratas que apresentaram valores de glicemia iguais ou superiores a 200mg/dl sete dias após a indução (n=55). Todas as fêmeas foram mortas após o desmame dos filhotes. A

prole masculina foi avaliada quanto a parâmetros espermáticos e hormonais nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. O resultado da prenhez foi prejudicado nas ratas do grupo diabético. Independente do grupo experimental, não foram observadas malformações externas nos recém-nascidos viáveis. O peso corporal e os níveis plasmáticos de glicose, avaliados no terceiro dia pós-natal, foram menores na prole masculina de ratas diabéticas, comparado a prole controle. Na prole de ratas diabéticas, foi observado atraso no tempo (dias) da descida testicular e separação prepucial. Em todas as idades analisadas não houve diferenças estatísticas nos níveis de testosterona, glicemia, histologia dos testículos e epidídimo e grau de maturação do epitélio germinativo. Nos ratos adultos também não foram observadas alterações na morfologia espermática, número de células de Sertoli e dinâmica do processo espermatogênico. Por outro lado, o peso de órgãos reprodutivos, assim como as reservas espermáticas e tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo, nos animais pré-púberes e adultos, foram alterados de maneira andrógeno-independente. O conjunto dos resultados obtidos mostraram que o meio intrauterino hiperglicêmico, causado pelo diabetes materno, prejudicou o desenvolvimento fetal, e provocou alterações nas funções metabólicas e reprodutivas da prole masculina ao longo do desenvolvimento sexual.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders of multiple etiology, characterized by defects in the secretion and/or action of insulin. The causes of the disease can be genetic and/or environmental. Diabetes is one of the most common metabolic complications during pregnancy and is associated with an increased risk of maternal and neonatal morbidities. Epidemiological and experimental studies have demonstrated that an abnormal intrauterine environment during fetal life can affect the development, causing impairment of fetal growth and increasing the susceptibility of the offspring to developing chronic diseases in adulthood. The hypothesis of “fetal programming” suggests that the adaptations that occur during embryonic development in response to an adverse medium provoke permanent alterations in the structure and physiology of the organism. It was already demonstrated that maternal diabetes and experimentally induced hyperglycemia cause abnormalities in fetal growth, which is associated with the development of cardiovascular diseases and type 2 diabetes in adulthood. In this context, the objective of present study was to investigate the consequences of the abnormal intrauterine environment, resulting from maternal diabetes, in the development and reproductive function, at pre-puberty, puberty and during sexual maturity, in the male offspring of rats in which diabetes was experimentally induced before mating. Seventy-four Wistar rats 90-days old were utilized, divided into two experimental groups: diabetic group (n=59) that received intravenously streptozotocin 40mg/kg body weight and control group (n=17) that received intravenously citrate buffer (0.1M; pH 6.5) in the same experimental conditions. Seven days after the induction the glycemia was measured and only rats presenting concentrations of 200 mg/dl or higher were considered severely diabetic and included in the

study (n=55). All the females were killed after offspring weaning. The male offspring were evaluated in different phases of sexual maturation for sperm parameters and hormonal levels. The gestational outcome was impaired in the rats of the diabetic group. Independently of the experimental group, there were no external malformations in the viable newborns. Body weight and plasma glucose levels, evaluated on the third postnatal day, were lower in the male offspring of diabetic dams, compared to control. The times (days) of testicular descent and preputial separation were significantly delayed in the pups of diabetic dams. In all the ages evaluated there were no significant statistical differences in testosterone levels, glycemia, histology of the testis and epididymis and maturation degree of the germinal epithelium. Moreover, in adult rats no alterations were observed in sperm morphology, number of Sertoli cells and dynamics of the spermatogenic process. On the other hand, the weights of reproductive organs, as well as sperm reserves and sperm transit time in the epididymis were impaired in the prepubertal and adult rats, in an androgen-independent manner. Taken together, the findings obtained showed that the hyperglycemic intrauterine environment, caused by maternal diabetes, impaired fetal development, and provoked alterations in the metabolic and reproductive functions of the male offspring throughout sexual development.

INTRODUÇÃO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O pâncreas é uma glândula mista, exercendo tanto função endócrina quanto exócrina. A parte exócrina apresenta-se como uma glândula acinosa composta que, além de íons e água, secreta enzimas digestivas. As ilhotas pancreáticas constituem a parte endócrina do pâncreas, representando cerca de 1,5% do seu volume total, apresentando-se sob a forma de aglomerados arredondados de células, imersos no tecido pancreático exócrino. O número de ilhotas no pâncreas humano é variável, oscilando ao redor de 1.000.000 (Junqueira, 1999). As ilhotas pancreáticas são constituídas por quatro tipos principais de células: beta (β ou B), alfa (α ou A), delta (δ ou D) e PP (polipeptídeo pancreático). As células PP (1-2% do total), se distribuem tanto na ilhota quanto no pâncreas exócrino, estimula a secreção gástrica das enzimas intestinais e inibem a motilidade do intestino. As células δ secretam somatostatina e constituem de 5 a 10 % da população celular. As células α (20% do total) secretam glucagon e, as células β , que representam aproximadamente 70% da população celular das ilhotas, e se caracterizam pela presença de grânulos citoplasmáticos de depósito e liberação de insulina (Guyton and Hall, 1997).

A insulina é uma proteína pequena, formada por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas, designadas A, com 21 aminoácidos e B, com 30 aminoácidos, ligadas por duas pontes de dissulfeto. A molécula de insulina também contém uma ligação dissulfeto intramolecular entre resíduos de aminoácidos da cadeia A. A insulina humana tem peso molecular de 5.808 dáltons (Champe, 2006).

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células β das ilhotas pancreáticas. Sua biossíntese envolve dois precursores inativos, a pré-pró-insulina e a pró-insulina, que após clivagens sequenciais formam o hormônio ativo. No aparelho de Golgi, a pró-insulina é quebrada em duas unidades, originando a insulina e o peptídeo C que é essencial para a organização correta da molécula de insulina. Além disso, devido à sua meia-vida mais longa no plasma, o peptídeo C é um bom indicador da produção e secreção de insulina no diabetes tipo 1. A insulina está presente em grânulos no citosol que, após estímulo apropriado, são liberados por exocitose. A insulina é degradada pela enzima

insulinase, presente no fígado e, em menor quantidade, nos rins. Possui uma meia-vida plasmática de aproximadamente seis minutos. Essa curta duração de ação permite alterações rápidas nos níveis circulantes desse hormônio (Champe, 2006).

A glicose é o estímulo mais importante para a secreção de insulina (Baynes and Dominiczak, 2000). A principal função da insulina é transportar a glicose através da membrana celular. Com isso, ocorre um aumento da intensidade do metabolismo da glicose pelas células e um aumento do armazenamento do glicogênio, tanto no fígado como nas células musculares. A insulina exerce sua ação sobre receptores específicos de membrana. O número de receptores de insulina na superfície celular altera-se dependendo das condições metabólicas. Além disso, eles possuem uma alta taxa de renovação (Lehninger, 1989).

A insulina desencadeia um notável conjunto de respostas biológicas, sendo o principal hormônio responsável pelo controle da captação, da utilização e do armazenamento dos nutrientes celulares. As ações anabólicas da insulina incluem estímulo da utilização e armazenamento intracelulares de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, enquanto inibem processos catabólicos, como a degradação de glicogênio, lipídios e proteínas (Carvalho et al., 2002).

O termo Diabetes mellitus aplica-se a um grupo de distúrbios metabólicos, que se caracterizam bioquimicamente pela hiperglicemia crônica, decorrente de defeito na secreção e/ou ação da insulina. A deficiência na ação da insulina, base comum do diabetes, causa anormalidades características no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos (ADA, 2005).

A etiologia da doença é multifatorial, sendo influenciada por fatores genéticos e/ou ambientais. Clinicamente, o diabetes se caracteriza pelo desenvolvimento, em longo prazo, de complicações microvasculares (microangiopatia diabética), retinopatia, nefropatia, neuropatia. Estas complicações constituem as principais causas de morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos (Kuzuya et al., 2002).

Dependendo da severidade da anormalidade metabólica, o diabetes pode ser assintomático ou pode estar associado a sintomas clássicos tais como polidipsia (aumento da ingestão de líquidos; sede), poliúria (aumento da frequência urinária), polifagia (aumento da ingestão de alimentos), baixo ganho de peso corporal. Nos casos mais graves,

cetoacidose ou o estado hiperglicêmico-hiperosmolar ocorre, podendo levar a distúrbios de consciência, coma e morte (Kuzuya et al., 2002).

A classificação etiológica da patofisiologia do diabetes inclui: tipo 1, caracterizado por lesões destrutivas das células β devido a mecanismo autoimune ou de origem desconhecida; tipo 2, caracterizado por uma combinação de diminuição na secreção de insulina e resistência à insulina; diabetes devido a mutações específicas de genes, o que leva o indivíduo a uma susceptibilidade genética a desenvolver a doença; diabetes associado a outras doenças ou condições patológicas e o diabetes gestacional, que ocorre devido ao aparecimento de intolerância à glicose durante a gestação (ADA, 2005).

O diabetes afeta 9,7% da população mundial (ADA, 2005) e, só no Brasil, cerca de 5 milhões de pessoas. De cada 100 pessoas pelo menos 6 ou 7 têm a doença. No Brasil, estima-se que 7,6% da população seja diabética, sendo que quase a metade não o sabe. Das pessoas próximas aos 65 anos, 17% são diabéticas e essa percentagem se eleva a 26% naquelas em torno de 85 anos, constituindo-se um dos grandes desafios de saúde pública nos países em pleno desenvolvimento sócio-econômico (Vieira, 2006).

O Diabetes mellitus e as complicações decorrentes da doença, tornaram-se um dos mais importantes problemas de saúde pública dos tempos atuais (Kuzuya et al., 2002; Jain et al., 2006), alcançando expressiva significação como causa de doença e morte, quaisquer que sejam os países ou raças considerados.

DIABETE E PREENHEZ

O diabetes reveste-se de grande importância por ser intercorrência comum na gravidez e por apresentar riscos maternos potencialmente letais, como cetoacidose diabética, risco aumentado de infecções, piora das complicações diabéticas previamente existentes e um maior risco de eclâmpsia, além de causar alterações no fluxo uterino-placentário (Eriksson and Jansson, 1984) e nas trocas materno-fetais (Gewolb et al., 1983; Eriksson and Jansson, 1984; Gewolb et al., 1986; Calderon et al., 1992, 1999), acarretando em conseqüências desfavoráveis para o conceito, tais como elevada incidência de morte fetal, distúrbios metabólicos, parto prematuro, malformações congênitas (ADA, 2005).

A inter-relação entre diabetes materno e malformações fetais tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. A etiologia é multifatorial e ainda pouco esclarecida (Reece et al.,

1996, 1998). A incidência de malformações congênitas em filhos de mulheres diabéticas é de 2 a 3 vezes maior, quando comparado com a população normoglicêmica (Reece and Homko, 2000). Uma das principais causas para este aumento nas razões de malformações é o pobre controle metabólico materno durante a gestação (Suhonen et al., 2000). Apesar das melhorias na conduta e cuidados com as gestantes diabéticas, as anomalias congênitas permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre as crianças nascidas de mães diabéticas (Reece et al., 1998), representando cerca de 33-66% das causas de mortes perinatal.

Diversos estudos, *in vivo* e *in vitro*, têm demonstrado que a hiperglicemia produz efeitos teratogênicos (Horton and Sadler, 1983; Al Ghafli et al., 2004). O período crítico de exposição à hiperglicemia é durante a organogênese, sendo considerado período crítico os dias 9,5 a 11,5 dias de gestação do rato e os dias 8 a 9,6 de gestação em camundongos (Freinkel, 1988). Este período de organogênese de aproximadamente dois dias em roedores é comparável a um período de 6 semanas da gestação em humanos, o que equivale da 2^a à 8^a semana de gestação (Reece et al., 1998; Zhao and Reece, 2005).

A teratogenicidade do diabetes tem sido investigada em diversos estudos experimentais (Eriksson et al., 2003; Al Ghafli et al., 2004; Savion et al., 2004; Gareskog et al., 2006). Em humanos, defeitos do tubo neural, incluindo anencefalia, exencefalia, microencefalia e espinha bífida são as principais anormalidades estruturais encontradas em filhos de mães diabéticas. Malformação do sistema nervoso também é frequente em animais experimentais (Kalter, 1996; Savion et al., 2004), sendo uma das anormalidades estruturais mais comuns associada a embriopatia diabética (defeitos ao nascimento e abortos espontâneos).

Sun et al. (2005), analisando embriões de ratas diabéticas nos 9,5 e 11,5 dias gestacionais, demonstraram que em filhotes de ratas diabéticas a apoptose (morte celular programada) no cérebro primitivo está aumentada e inicia-se precocemente nas fases iniciais da organogênese do tecido ocasionando em malformações do sistema nervoso. O processo de apoptose é comum durante o desenvolvimento de vários órgãos e tecidos dos mamíferos, ocorrendo precocemente no embrião pós-implantação, em regiões específicas, principalmente áreas cardiogênicas e cérebro primitivo. Nos embriões de ratas diabéticas o processo de apoptose estaria anormalmente aumentado nas células neuroepiteliais do sistema nervoso primitivo, acarretando malformações e morte fetal. Apoptose aumentada

nos embriões pré-implantação, de ratas diabéticas, também tem sido associada ao fracasso gestacional.

Reece et al.(1998) demonstraram que as malformações em animais experimentais estão relacionadas com a intensidade da hiperglicemia: 20% das razões de malformações foram observadas quando os níveis de glicemia foram aproximadamente duas vezes (300mg/dl) maiores do que os valores considerados normais (150mg/dl); 50 % para níveis de glicemia de 600mg/dl e 100% para valores de glicemia 6 vezes maiores do que nos controle (950mg/dl).

A embriopatia diabética, resulta de um meio intra-uterino metabolicamente anormal (Buchanan and Kitzmiller, 1994), embora os mecanismos precisos ainda não estejam bem esclarecidos.

Trabalhos na literatura têm demonstrado que ocorre um aumento na produção de radicais livres em resposta ao distúrbio metabólico decorrente do diabete, sugerindo que o estresse oxidativo exerça forte influência nas complicações reprodutivas materna e patogênese da embriopatia diabética (Eriksson and Borg, 1991; Damasceno et al., 2002).

É conhecido que a hiperglicemia causa dano tecidual, porém o mecanismo fisiopatológico pelo qual isto ocorre não está totalmente definido. Existem evidências sobre a relação entre o excesso de espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio (ERMO), caracterizando estresse oxidativo e as complicações diabéticas (Krinsky, 1992; Grace, 1994; Damasceno et al., 2002). O estresse oxidativo está presente no diabete devido à alta produção de ERMO ou à deficiência do sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático (Griesmacher et al., 1995; Damasceno et al., 2002; Peuchant et al., 2004).

A glicose por si só é capaz de gerar ERMO em células β -pancreáticas. Esse fato é essencial para a hipótese de que o estresse oxidativo induzido pela glicose em altas concentrações é um mecanismo de toxicidade (Tanaka et al., 1999).

Diversos autores têm demonstrado que a suplementação de ratas diabéticas, durante a prenhez, com antioxidantes, tais como vitamina C, vitamina E, ácido fólico, diminuem a incidência de malformações fetais e reabsorções embrionárias, evidenciando a função normal dos antioxidantes no processo de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento embrionário (Al Ghaflí et al., 2004; Wentzel and Eriksson, 2005).

O crescimento e o desenvolvimento fetal é determinado primariamente tanto pelo padrão genético do feto, quanto pela sua capacidade em produzir seus próprios fatores de

crescimento, os quais influenciarão o crescimento e a diferenciação (Van Assche et al., 2001). Entretanto, a regulação gênica do crescimento fetal é influenciada por diferentes fatores externos, os quais podem exercer efeitos inibitórios ou estimulatórios. Além disso, como o embrião dos mamíferos cresce e se desenvolve dentro do útero materno, o crescimento fetal é dependente do *status* nutricional materno e da capacidade da placenta em transferir adequadamente os nutrientes da mãe para o feto (Holemans et al., 2003). Assim, mecanismos homeostáticos se estabelecem no sistema mãe-placenta-feto, de maneira a garantir um equilíbrio na interação entre os diferentes fatores que regulam e influenciam o crescimento, o desenvolvimento e suprimento nutricional, para um desenvolvimento saudável do feto. Distúrbios nestes mecanismos decorrentes do desenvolvimento de um ambiente intra-uterino anormal durante a gestação, estão associados com o aparecimento de anormalidades no crescimento fetal (Holemans et al., 2003).

De acordo com o grau de hiperglicemia, o diabetes materno pode ser dividido em dois grupos: diabetes moderado e diabetes grave. Em animais experimentais, o quadro clínico típico do diabetes moderado (glicemia materna entre 120-200 mg/dL), está caracterizado por um aumento na glicemia materna e no transporte de glicose e outros nutrientes através da placenta, da mãe para o feto, resultando principalmente em macrosomia (caracterizada por um alargamento da circunferência torácica e abdominal em relação a circunferência da cabeça) (Van Assche et al., 2001). Entretanto, a hiperglicemia crônica no meio intra-uterino decorrente do diabetes grave, caracterizado no modelo experimental em estudo pela glicemia superior a 200mg/dL, está associado à complicações maternas tais como vasculopatias e reduzida função renal (Van Assche et al., 2001), deficiência no transporte de nutrientes para a unidade fetoplacentária e prejuízo do fluxo sanguíneo útero placentário (Holemans et al., 2003), ocasionando retardo de crescimento intra-uterino do feto, caracterizado pelo baixo peso ao nascimento quando comparado a prole de mães normoglicêmicas (Van Assche et al., 2001; Holemans et al., 2003).

O retardo de crescimento observado ao nascimento e período perinatal pode ser resultado da malnutrição intra-uterina ou durante o período de lactação. Holemans et al. (1999), observou em estudos experimentais com ratos que, a prole de ratas diabéticas, quando amamentadas por uma rata normoglicêmica (cross-fostering), apresentou uma curva de crescimento semelhante à da prole do grupo controle. Ao contrário, quando a prole de

ratas normoglicêmicas, foi amamentada por ratas diabéticas, houve uma tendência a diminuição do peso corporal no período perinatal e vida adulta, comparado à prole controle, por um mecanismo de “imprinting” durante o período de lactação, sugerindo que o este período perinatal exerce uma importante influência no ganho de peso corporal da prole ao longo da vida. Estes mesmos achados não se confirmaram em modelos de restrição calórica no qual o período da prenhez é muito mais importante do que a lactação para se determinar o ganho de peso corporal.

Nos roedores, assim como em humanos, a glicose é o principal substrato energético para o desenvolvimento fetal, sendo completamente deliberada da circulação materna. O principal hormônio para o crescimento fetal é a insulina produzida e secretada pelas ilhotas de Langerhans fetais. Ao fim da gestação, o feto já é capaz de regular autonomamente sua própria homeostasia da glicose (Aerts and Van Assche, 2003). Assim, a insulina fetal exerce duas principais funções: estimula o crescimento fetal e faz o controle da glicemia.

O diabete materno durante a prenhez, induz a alterações e adaptações na atividade do pâncreas fetal, em resposta ao aumento do suprimento de glicose da mãe para o feto (Holemans et al., 2005). A hiperglicemia crônica no meio intra-uterino em ratas prenhes induz a hiperglicemia e hipoinsulinemia na prole logo ao nascimento, além de retardo no crescimento intra-uterino (Van Assche et al., 2001). O peso do pâncreas fetal está diminuído embora a porcentagem de tecido endócrino estar aumentada (Aerst and Van Assche, 1977).

A maneira como a hiperglicemia materna causa distúrbios no desenvolvimento e função da prole ainda permanece por ser elucidada.

MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERGLICEMIA

O estudo detalhado da interação dos inúmeros fatores envolvidos na síndrome diabética é muito complicado quando investigado na espécie humana. Desta forma, modelos experimentais foram desenvolvidos com a expectativa de que estudos em animais diabéticos levem ao entendimento mais completo de sua etiologia, patogenicidade e tratamento, visando melhor aplicação clínica (Calderon, 1988).

No século XIX, Brockman, em seus estudos com peixes, e Langerhans, em seus estudos em humanos, descreveram e caracterizaram as ilhotas pancreáticas. Dois cientistas alemães, von Mering e Minkowski, observaram em 1889 que cães pancreatomizados desenvolviam um quadro clínico semelhante ao diabetes humano. Após esta descoberta, muitos experimentos em coelhos e cachorros se seguiram, embora a história tenha dado destaque especial a Marjorie, um dos cachorros utilizados por Banting e Best em seus experimentos (Rees and Alcolado., 2005). A descoberta da insulina ocorreu em 1921 quando Banting e Best preparam um extrato purificado das ilhotas e injetaram no cão diabético, verificando redução dos níveis de glicose no sangue e na urina do animal. Marjorie é provavelmente um dos mais famosos animais na história da experimentação animal.

Modelos animais têm sido extensivamente utilizados em pesquisas sobre o diabetes. Além de compreender os mecanismos da patogênese e complicações decorrentes da doença, todos os novos tratamentos para o diabetes, incluindo transplante de células das ilhotas e estratégias preventivas, são inicialmente investigados em modelos animais (Rees and Alcolado, 2004; Zhao and Reece, 2005). Um outro importante campo de pesquisa que tem se apoiado nos animais de experimentação é o estudo do diabetes na gravidez e o papel do meio intra-uterino no subsequente desenvolvimento e função da prole, decorrente da exposição a um meio intra-uterino metabólico anormal, independente da herança genética (Boloher et al., 2002).

A indução química do diabetes pode ser obtida através da administração de drogas seletivamente citotóxicas para as células β pancreáticas, tais como a estreptozotocina (STZ) e aloxana. Comparando o efeito citotóxico seletivo para as células β pancreáticas, entre estreptozotocina e aloxana, há especificidade consideravelmente maior dos efeitos da STZ sobre as células β pancreáticas. Além disso, a aloxana, em quase todas as espécies, exibe uma margem de segurança extremamente limitada entre a dose diabetogênica e as doses, geralmente, tóxicas e letais (Junod et al., 1967). A STZ será discutida a seguir. Esses modelos de danos pancreáticos são utilizados em estudos sobre as conseqüências da hiperglicemia no desenvolvimento das complicações diabéticas (Garcia-Martin et al., 1988). Quando realizados em ratas prenhes, ajudam na compreensão dos efeitos do diabetes, durante a gestação, sobre o desenvolvimento da prole (Caluwaerts et al., 2003).

A STZ é uma nitrosamina isolada do *Streptomyces achromogenes*, que possui atividade antibiótica e antineoplásica (Bólan and Bianchi, 2002). Sua estrutura molecular foi descrita por Herr et al. (1967) e é mostrada na figura 1, possuindo a seguinte fórmula molecular: $C_8H_{15}N_3O_7$.

A STZ é utilizada para se induzir o diabetes em roedores, pelo seu efeito tóxico direto sobre as células β pancreáticas (Szkudelski, 2001; Rees and Alcolado, 2005), de maneira dose-dependente (Holemans et al., 2003b). As células β são mais sensíveis a STZ do que outros tipos celulares do organismo, sendo por este motivo que a droga é utilizada para causar o diabetes em roedores. Interessante notar que, ao contrário dos roedores, as células β humana são extremamente resistentes aos efeitos diabetogênicos da STZ (Yang and Wright, 2002).

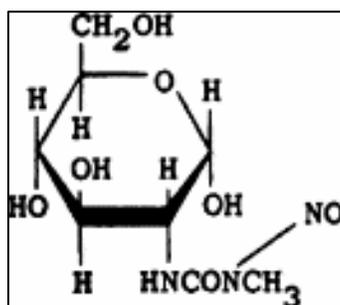


Figura 1. Estrutura molecular da estreptozotocina (STZ) determinada por Herr et al. (1967).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como a STZ causa danos nas células β pancreáticas (Szkudelski, 2001; Bólan and Bianchi, 2002). O primeiro sugere que a STZ é um forte agente alquilante, causando alquilação do DNA por $\bullet CH_3$ ou CH_3^+ (Bólan and Bianchi, 2002). O segundo sugere que a geração de espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio seriam as responsáveis pela toxicidade da STZ no efeito diabetogênico (West et al., 2000; Damasceno et al., 2002). A STZ tem uma meia-vida de aproximadamente 24 horas e, usualmente nos protocolos experimentais que utilizam ratas prenhes em seus estudos, para verificar os efeitos do diabetes sobre a prole, o acasalamento dos animais ocorre cerca de uma a duas semanas após o tratamento com a droga. Assim, um efeito direto da STZ sobre o embrião é considerado virtualmente ausente (Zhao and Reece, 2005).

López-Soldado and Herrera (2003) verificaram que diferentes doses da droga, administradas no primeiro dia da prenhez, resultam em diferentes graus da doença, caracterizando principalmente dois subgrupos: diabetes moderado (animais com níveis de glicose plasmática ao redor de 200mg/dl) e o diabetes grave (animais com níveis de glicose

plasmática ao redor de 400mg/dl), concluindo que o estado de diabetes moderado nos animais mimetiza o quadro de diabetes gestacional humano, enquanto que o diabetes grave é mais similar aos quadros clínicos do diabetes não controlado. Estes dois modelos experimentais podem ser utilizados para o estudo das condições patofisiológicas e conseqüências materno-fetal, sob diferentes condições ou estágios da doença.

DESENVOLVIMENTO SEXUAL PÓS-NATAL DO RATO MACHO

O processo de maturação sexual é um evento fisiológico complexo, coordenado por fatores genéticos e ambientais. É bem conhecida a função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, no processo de maturação sexual e função reprodutiva, no homem e em várias espécies de animais, e inúmeros são os locais neste sistema que podem sofrer interferência e modulação (Odell and Swerdloff, 1976).

A literatura carece de estudos mais detalhados sobre o início da puberdade em ratos. Nos ratos machos, ao contrário dos seres humanos, as inter-relações entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal já são funcionantes desde antes do nascimento, sendo que durante as primeiras semanas de vida pós-natal os vários processos iniciam sua sincronização. É observado em ratos machos que algumas horas depois do nascimento ocorre um pico passageiro na secreção de testosterona (Corbier et al., 1978), associado com a liberação de LH (hormônio luteinizante) e aumento temporário dos níveis de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), secretado pelo hipotálamo. Esta liberação de testosterona é importante para o processo de masculinização do hipotálamo, dando ao rato macho suas características típicas de comportamento sexual.

Nos machos, o principal hormônio envolvido no controle das funções reprodutivas é a testosterona. A dosagem da concentração plasmática de testosterona, assim como a análise de peso dos órgãos sexuais são parâmetros que permitem o estabelecimento de correlações morfofuncionais e avaliação da integridade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

Tem sido proposto que o início da puberdade no rato macho resultaria de um decréscimo na sensibilidade da unidade hipotalâmica-hipofisária ao *feedback* negativo dos esteróides. Desta forma, apesar do aumento da produção de andrógenos pelo testículo em desenvolvimento, essa diminuição de sensibilidade do eixo provocaria o aumento da

secreção de gonadotrofinas. Essa hipótese, entretanto, não explica as divergências nos padrões de secreção de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH observadas nos ratos machos em desenvolvimento. Diversas observações, incluindo a descoberta de que o padrão de liberação de LHRH (avaliado *in vitro*) se altera à medida que o animal amadurece, sugerem que a ativação da liberação de LHRH, independente do controle exercido pelo *feedback* negativo dos andrógenos, exerceria o papel primário, senão decisivo, no estabelecimento da puberdade no rato macho. Assim sendo, atualmente a hipótese melhor aceita é a de que o início da puberdade seria regido por mecanismos originados no sistema nervoso central, levando à liberação de LHRH (Ojeda and Urbanski, 1994).

Por outro lado, estudos recentes têm mostrado que o *status* nutricional do organismo é um importante fator que interfere nas funções reprodutivas e início da puberdade (Engelbregt et al., 2000; Leonhardt, et al., 2003; Zambrano et al., 2005a). A leptina, hormônio produzido pelo gene *obesity* expressado pelas células adiposas (adipócitos), está envolvida na regulação da adiposidade em mamíferos e pode atuar como um sinalizador endócrino interligando o eixo reprodutivo (hipotálamo-hipófise-gônada) com o *status* nutricional do organismo (Leonhardt, et al., 2003). A leptina estimula a secreção de LH e FSH pela hipófise nos animais jovens e adultos de maneira dose-dependente.

Alguns autores têm hipotetizado que o peso corporal exerceria um importante papel na regulação, em nível do sistema nervoso central, no controle da puberdade. A relação entre o peso corporal (quantidade de gordura) durante o desenvolvimento intra-uterino, ao nascimento e período perinatal, e início da puberdade em ratos tem sido pouco estudada (Engelbregt et al., 2000), e os reais mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados. Engelbregt et al. (2000) observaram que ratos nascidos com retardo de crescimento intra-uterino tiveram um atraso no início da puberdade e uma relação direta com o peso corporal não foi observada. O período perinatal parece ser um período crítico no processo de maturação sexual, por mecanismos ainda desconhecidos, independente do peso corporal. Engelbregt et al. (2001), utilizando o modelo de retardo de crescimento intra-uterino também relataram que o início da puberdade independe da relação entre a porcentagem de gordura corporal e concentrações de leptina plasmáticas nos animais.

Trabalhos têm demonstrado uma relação entre o retardo do crescimento intra-uterino e o desenvolvimento puberal de machos e fêmeas, indicando mudanças no início e

progressão da puberdade (Engelbregt et al., 2000; Zambrano et al., 2005a). A influência da relação do retardo do crescimento intra-uterino e os mecanismos que controlam o início da puberdade ainda não estão totalmente elucidados.

Ojeda et al. (1978) caracterizaram o desenvolvimento sexual do rato em quatro períodos: neonatal, do nascimento ao 7º dia de idade; “infantil”, do 8º dia pós-natal ao 21º; “juvenil”, que se estende até aproximadamente até o 35º dia de vida e um período “peripuberal”, 55º-60º, quando espermatozóides maduros são encontrados no ducto deferente. Nos ratos machos, os primeiros espermatozóides aparecem na luz dos túbulos seminíferos aos 45 dias de idade e o trânsito através do epidídimo e ducto deferente pode ser detectado entre 58-59 dias de idade (Marty et al., 2003). Aos 75 dias, ocorre a máxima produção de gametas pelos testículos e, aos 100 dias de idade, é observada a máxima concentração de espermatozóides armazenados na cauda epididimária. No período compreendido entre os 75 e 100 dias de idade, os animais atingem a plena maturidade sexual (Robb et al., 1978).

Zanato et al. (1994) realizaram um trabalho abrangente, fornecendo informações sobre o desenvolvimento sexual de ratos da variedade Wistar, criados em biotério brasileiro. Segundo esse trabalho, os ratos atingem a puberdade entre 40 e 50 dias de idade, quando espermátides maduras são encontradas, pela primeira vez, no epitélio germinativo. Entre 83 e 97 dias de idade, os ratos tornam-se sexualmente maduros, quando é máxima a produção espermática.

As idades em que ocorrem os processos da descida testicular e separação prepucial nos machos podem ser utilizadas como sinais físicos externos do desenvolvimento sexual inicial no rato, processos que sofrem intensa regulação androgênica, sendo eventos que precedem o aparecimento de espermatozóides móveis na cauda epididimária e o comportamento copulatório dos animais (Korenbot et al, 1977).

O processo da descida testicular é similar em várias espécies de animais. No feto do sexo masculino, o testículo é, embriologicamente, um órgão de origem intra-abdominal. Durante a gestação, os testículos encontram-se ligados ao mesonefro intra-abdominal. Durante a descida testicular o mesonefro degenera e o gubernáculo aumenta de tamanho, dilatando o canal inguinal o que possibilita a passagem dos testículos da cavidade abdominal para o a bolsa escrotal (Marty et al., 2003). Em roedores, é estabelecido que a descida testicular ocorre a partir do 15º dia de vida pós-natal. A separação prepucial tem

sido utilizada como um sinal externo do início da puberdade masculina e é observada quando o prepúcio se separa da glândula do pênis, normalmente ocorrendo ao redor do 39º dia de vida pós-natal (Korenbroet et al., 1977).

A saúde reprodutiva dos animais na vida adulta pode ser afetada por várias influências ambientais atuando em diferentes estágios do desenvolvimento, principalmente por causar interferências no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O principal grupo de hormônios reguladores desse eixo, as gonadotrofinas, exercem um papel essencial no desenvolvimento do testículo fetal, influência esta que pode ser prejudicada pelo estado de nutrição materna, obesidade, alcoolismo e fumo (Vermeulen, 1993), situações que causam desequilíbrio da homeostasia do meio intra-uterino. Esses distúrbios nas fases iniciais da vida podem ocasionar doenças e problemas de fertilidade na idade adulta.

PROGRAMAÇÃO FETAL

Durante o seu desenvolvimento, os mamíferos necessitam estabelecer um certo grau de autonomia, durante a vida fetal, antes de adquirir independência para sobreviver após o nascimento. Por isso, desenvolvem mecanismos homeostáticos necessários para garantir a sua existência.

De maneira geral, o feto possui três tipos de resposta aos estímulos ambientais adversos: pode acelerar seu processo de maturação (quando exposto a elevadas quantidades de glicocorticóides, por exemplo); conservar nutrientes (reduzindo o crescimento ou metabolismo), ou interromper o desenvolvimento (aborto espontâneo ou parto prematuro) (Gluckman and Hanson, 2004). Esta terceira opção é bem compreendida em termos evolutivos, pois uma gestação pode ocorrer novamente sob condições mais favoráveis, mas a morte da mãe resultaria em perda do genótipo. Assim, o feto não é um “parasita perfeito”, e na hierarquia, muitas circunstâncias podem favorecer a mãe (Gluckman and Hanson, 2004).

Definir o ambiente fetal é complexo. De maneira geral é definido pelo meio intra-uterino, o qual é influenciado pela saúde e ambiente materno, assim como pela função da unidade útero-placentária. Entretanto, a nutrição materna e fetal não são idênticas. A nutrição do feto não reflete simplesmente o ambiente externo, embora seja claramente influenciado pelo mesmo (Gluckman and Hanson, 2004).

Durante a vida fetal, os tecidos e órgãos do embrião passam pelo que denominamos “períodos críticos” do desenvolvimento, os quais podem ser influenciados por aspectos do meio intra-uterino dependente da nutrição e metabolismo materno (Hoet and Hanson, 1999). Estes períodos críticos geralmente coincidem com períodos de rápidas divisões celulares. A principal adaptação do feto à limitada quantidade de oxigênio e nutrientes é uma diminuição da razão de divisões celulares, especialmente nos tecidos e órgãos que estão no “período crítico” no momento destas adversidades. Esta diminuição das divisões celulares pode ser um efeito direto da disponibilidade de nutrientes ou de concentrações alteradas de fatores de crescimento e hormônios, dos quais a insulina e o hormônio do crescimento são particularmente importantes (Barker and Clark, 1997).

Esta plasticidade do desenvolvimento é importante para garantir fenótipos apropriados para diferentes condições ambientais e assim, promover a perpetuação do genótipo (Gluckman et al., 2005a,b). Entretanto, pode exercer um forte papel no desenvolvimento de doenças.

Estudos em animais têm demonstrado que disponibilidade de nutrientes e oxigênio é um aspecto importante do meio intra-uterino e freqüentemente limita o crescimento fetal, através de características que adaptam o indivíduo para o tipo de ambiente que provavelmente ele encontrará ao nascer (Gluckman et al., 2005b). Este fato reflete adaptações do feto para sustentar e garantir o seu desenvolvimento, adaptações estas que podem permanentemente programar a estrutura e função do organismo.

A organogênese pode ser afetada por uma modificação da expressão gênica durante o desenvolvimento, influenciando a função dos órgãos e sistemas do organismo e levar ao desenvolvimento de doenças futuras (Ingelfinger, 2004). Uma das mais interessantes e significativas características da programação do desenvolvimento é que as conseqüências adversas do meio intra-uterino anormal podem ser passadas transgeração da mãe (F0) para os filhos (F1) e para a segunda geração (F2) (Zambrano et al., 2005a; Zambrano et al., 2006; Fetita et al., 2006) epigeneticamente.

Teoria do fenótipo econômico

O primeiro estudo relacionando o tamanho ao nascimento e risco de desenvolver doenças na vida adulta surgiu em 1988. Posteriormente, estudos epidemiológicos confirmaram a associação entre baixo peso e tamanho ao nascimento (caracterizando restrição do crescimento intra-uterino) e desenvolvimento de doenças cardiovasculares e outras anormalidades metabólicas incluindo, hipertensão, diabetes tipo 2, dislipidemia, resistência à insulina (Barker and Clark, 1997; Nathanielsz and Thornburg, 2003). Estes estudos levaram à hipótese da “origem fetal” ou “teoria do fenótipo econômico”. Esta teoria diz que o feto responde a um meio adverso através de mudanças irreversíveis na sua trajetória de desenvolvimento e, em particular, pela redução do crescimento. O reduzido crescimento fetal capacita o feto a conservar a quantidade limitada de energia disponível para as funções cardíacas e desenvolvimento neural, órgãos vitais para a sua sobrevivência. Assim, a exposição intra-uterina a um ambiente escasso nutricionalmente altera a estrutura e fisiologia do organismo de forma a adaptá-lo a escassez de nutrientes na vida pós-natal. Estas adaptações incluem anormalidades na secreção e ação da insulina, redução vascular em diversos órgãos e redução do número de néfrons (Barker and Osmond, 2000). Na vida adulta pode levar o indivíduo a desenvolver doenças, particularmente obesidade, doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas.

A teoria do fenótipo econômico mais modernamente denominada programação fetal se resume portanto na idéia de que os eventos *in utero*, como redução do crescimento fetal, alteram permanentemente a estrutura e fisiologia do organismo da prole, aumentando assim as probabilidades com que estes indivíduos venham a desenvolver doenças não associadas a fatores genéticos e/ou estilo de vida na idade adulta (Barker and Osmond, 1986; Barker and Clark, 1997; Gluckman et al., 2005a,b). Estes dados têm sido confirmados em diversos modelos experimentais (Holemans et al., 1999; Boloker et al., 2002; Lesage et al., 2004; Zambrano et al., 2005a,b; Zambrano et al., 2006), sugerindo vantagens adaptativas na seleção Darwiniana.

O termo “vantagem adaptativa” se refere aqui a mudanças no fenótipo as quais confere melhora da saúde reprodutiva (capacidade para replicar/conservar o genótipo individual do organismo). A resposta adaptativa é iniciada por um estímulo do meio, mas a vantagem conferida ao indivíduo não é imediata. Do ponto de vista evolutivo, as

características alteradas frente às adversidades no período de gestação garantiriam vantagens ao indivíduo frente a um ambiente adverso pós-natalmente, mas seria prejudicial, ocasionando doenças, frente a um ambiente “enriquecido”, não adverso (Gluckman and Hanson, 2004b). Assim, o feto responde a um ambiente adverso reduzindo o crescimento e desenvolvendo adaptações metabólicas que são apropriadas para um meio carente, em termos nutricionais, encontrado na vida pós-natal. Uma vez que o ambiente pós-natal é favorável e adequado, as mesmas adaptações podem ser prejudiciais acarretando em doenças.

O conceito da programação tem aplicação direta para os estudos relacionados com a função reprodutiva por duas razões principais: primeiramente porque o período pós-natal é crucial para o estabelecimento das funções reprodutivas e, segundo, porque existe um longo período de latência entre a exposição *in utero* e o aparecimento de doenças reprodutivas (na maioria das espécies de vertebrados, a vida reprodutiva inicia-se em uma fase específica do desenvolvimento, após o nascimento).

A endocrinologia reprodutiva é potencialmente importante tanto para explicar os efeitos da “programação” quanto para explicar a ocorrência de doenças reprodutivas crônicas sexo-específicas na vida adulta (Davies and Norman, 2002).

Estudos experimentais têm sugerido que distúrbios durante a vida fetal podem reprogramar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e outros autores têm verificado os efeitos da programação fetal no desenvolvimento e função do eixo reprodutivo hipotálamo-hipófise-gônada (Rhind et al., 2001). Desta forma, diferentes sistemas fisiológicos podem ser afetados durante a vida fetal e desenvolvimento neonatal resultando em uma variedade de efeitos adversos na vida adulta.

De acordo com Rhind et al. (2001), a programação da capacidade reprodutiva do feto pode ser adquirida através de alterações nas glândulas hipotálamo-hipófise ou através de modificações nas gônadas. O estágio do desenvolvimento fetal no qual cada um destes órgãos é susceptível à influências nutricionais ou ambientais não é necessariamente o mesmo. Similarmente, os efeitos no adulto devido a alterações desses órgãos no feto, podem diferir de acordo com o órgão afetado e a idade do animal.

Os principais protocolos experimentais utilizados atualmente para se verificar os efeitos de distúrbios do meio intra-uterino nas funções metabólicas e reprodutivas da prole são: exposição das mães a uma dieta isocalórica com baixo conteúdo protéico (Zambrano et

al., 2005a,b); restrição de nutrientes globais (Garfano et al., 1998); restrição do fluxo sanguíneo uterino (Simmons et al., 2001); super exposição dos fetos a glicocorticóides (Nyrenda et al., 2001) e indução do diabetes maternal (Holemans et al., 2003).

Engelbregt et al. (2000) verificaram que a prole de ratos com retardo de crescimento intra-uterino, devido a ligação de artérias uterinas no 17º dia de gestação de ratas Wistar, apresentaram retardo no início da puberdade evidenciado por um atraso nos dias da separação prepucial e abertura vaginal da prole.

Bielli et al. (2002), através da manipulação de dietas com diferentes conteúdos calóricos em relação ao gasto energético, verificaram que prejuízo na nutrição fetal, devido a desnutrição materna durante a prenhez, pode reduzir o desenvolvimento e função testicular em ovelhas, devido a uma redução do número de células de Sertoli nos neonatos. Rae et al. (2002), utilizando protocolo semelhante, relataram uma redução nas razões de ovulação na progênie fêmea de ovelhas.

Em ratos, verificou-se que uma dieta com baixo conteúdo protéico durante a prenhez e lactação, prejudicou o desenvolvimento reprodutivo dos filhotes machos, evidenciado pelo aumento na distância ano-genital, atraso na descida testicular, redução no peso corporal e peso dos testículos e redução na fertilidade e número de espermatozóides nos machos aos 270 dias de idade (Zambrano et al., 2005a).

Em seres humanos, retardo do crescimento intra-uterino tem sido associado a um prejuízo das funções ovarianas (Bruin et al., 1998).

Estudos experimentais têm demonstrado que o diabetes materno afeta o desenvolvimento e metabolismo da prole (Van Assche et al., 2001; Holemans et al., 2003), com conseqüências na vida adulta. É relatado que a prole de ratas em que se induziu diabetes experimentalmente desenvolve disfunção cardiovascular (Holemans et al., 1999) e diabetes tipo 2 (Boloker et al., 2002) na vida adulta.

Nesse contexto, estudos prospectivos para investigar a associação entre o meio intra-uterino hiperglicêmico e as doenças que aparecem na vida adulta da prole são realizados em modelos animais com diabetes induzido quimicamente. Esses estudos têm importância para o meio científico, pois permitem a compreensão da influência dos fatores maternos sobre o desenvolvimento normal do embrião/feto e dos mecanismos envolvidos no surgimento de doenças não relacionadas a fatores genéticos na idade adulta (Holemans et al., 1999).

OBJETIVOS

Objetivo Geral: investigar os possíveis efeitos da hiperglicemia crônica, no meio intra-uterino, decorrente do diabetes materno, no desenvolvimento e funções reprodutivas da prole masculina na pré-puberdade, puberdade e idade adulta.

Objetivos Específicos: Avaliar as repercussões da hiperglicemia materna, decorrente do diabetes, no organismo materno durante a gestação e nas diferentes fases do desenvolvimento dos filhotes do sexo masculino através da análise dos seguintes parâmetros: nível glicêmico e peso maternos; incidência de malformações externas na prole; peso e glicemia da prole; a evolução do desenvolvimento sexual da prole masculina, avaliada na pré-puberdade, puberdade e idade adulta.

REFERÊNCIAS

- ADA., 2005. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28, 537-542.
- Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003. Intra-uterine transmission of disease. *Placenta* 24, 905-911.
- Al Ghafli, M.H.M., Padmanabhan, R., Kataya, H.H., Berg, B., 2004. Effects of α -lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. *Molecular and Cellular Biochemistry* 261, 123-135.
- Aldeen, W.G., 1979. Undernutrition of Merino sheep and its sequel 5. The influence of severe growth retardation during early post-natal life on reproduction and growth in later life. *Australian Journal of Agricultural Research* 30, 939-948.
- Barker, D.J.P., Clark, P.M., 1997. Fetal undernutrition and disease in later life. *Reviews of Reproduction* 2, 105-112.
- Barker, D.J.P., Osmond, C., 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart diseases in England and Wales. *Lancet* 1, 1077-1081.
- Barker, D.J.P., Osmond, C., 2000. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environment Health and Perspective* 108, 545-553.
- Baynes, J., Dominicczak, M.H., 2000 Homeostasia da glucose e metabolismo energético. *Bioquímica médica*. Manole, São Paulo, pp. 243-266.
- Bielli, A., Pérez, R., Pedrana, G., Milton, J.T.B., Lopez, A., Blackberry, M.A., Duncombe,

- G., Rodriguez-Martinez, H., Martin, G.B., 2002. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproductive and Fertility Development* 14, 333-337.
- Boloker, J., Gertz, S.J., Simmons, R.A., 2002. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* 51, 1499-1506.
- Bolzán, A.D., Bianchi, M.S., 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research* 512, 121.
- Bruin, J.P., Dorland, M., Bruinse, H.W., Spliet, W., Nikkels, P.G.J., Te Velde, E.R., 1998. Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. *Early Human Development* 51, 39-46.
- Buchanan, T.A., Kitzmiller, J.L., 1994. Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annual Review of Medicine* 45, 245-260.
- Calderon, I.M.P., 1988. Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabetes e gravidez, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 125p.
- Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., Brasil, M.A.M., Henry, M.A.C.A., 1992. Diabetes e gravidez experimental em ratas I. Indução do diabetes, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cirúrgica Brasileira* 7(1).
- Calderon, I.M.P., 1994. Influência do binômio diabetes e gravidez na atividade endócrina do pâncreas materno e fetal – Estudo experimental em ratas, Dissertação (Doutorado), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 175p.
- Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., Ramos, M.D., Peraçoli, J.C., 1999. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabética - relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intra-uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2, 91-98.
- Caluwaerts, S., Holemans, K., van Bree, R., Verhaeghe, J., Van Assche, A., 2003. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus? *Journal of Society for Gynecologic Investigation* 10, 216-221.
- Carvalho, J.B.C., Zecchin, H.G., Saad, M.J.A., 2002. Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo* 46, 419-425.
- Champe, P.C., 2006. Efeitos metabólicos da insulina e do glucagons. Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., *Bioquímica Ilustrada*, 3ªed. Artmed, São Paulo pp. 305-316.

- Corbier, P., Kerdelhué, B., Picon, R., Roffi, J., 1978. Changes in testicular weight and serum gonadotropin and testosterone levels before, during and after birth in perinatal rat. *Endocrinology* 103, 1985-1991.
- Damasceno, D.C., Volpato, G.T., Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., 2002. Oxidative stress and diabetes in pregnancy rats. *Animal. Reproduction Science* 72, 235-244.
- Davies, M.J., Normam, R.J., 2002. Programming and reproductive functioning. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13, 386-391.
- Engelbregt, M.J., Houdijk, M.E., Popp-Snijders, C., Delemarre-Van de Waal, H.A., 2000. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research* 48, 6:803-807.
- Engelbregt, M.J., Van Weissenbruch, M.M., Popp-Snijders, C., Lips, P., Delemarre-Van de Waal, H.A., 2001. Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats alter intrauterine growth retardation and alter early postnatal food restriction. *Pediatric Research* 50, 474-478.
- Eriksson, U.J., Borg, L.A.H., 1991. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations *in vitro*. *Diabetologia* 34, 325-331.
- Eriksson, U.J., Cedreberg, J., Wentzel, P., 2003. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers – animal and human studies. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 4, 79-93.
- Fetita, L.S., Sobngwi, E., Serradas, P., Calvo, F., Gautier, J.F., 2006. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(10), 3718-3724.
- Freinkel, N., 1988. Diabetic embryopathy and fuel-mediated organ teratogenesis: lesson from animal models. *Hormone and Metabolism Research* 20, 473-475.
- Garcia-Martin, J.J., Villanueva, G.R., Esteller, A., 1988. Diabetes-induced cholestasis in the rat: possible role of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Hepatology* 8, 332-340.
- Gareskog, M., Cedreberg, J., Eriksson, U.J., Wentzel, P., 2006. Maternal diabetes *in vivo* and high glucose concentration *in vitro* increases apoptosis in rat embryos. *Reproductive Toxicology*. (accepted)
- Garfano, A., Czernichow, P., Breant, B., 1997. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 40, 1231-1234.

- Gewolb, I.H., Barrett, C., Warshan, J.B., 1983. Placental growth and glucagen metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Pediatric Research* 17, 587-591.
- Gewolb, I.H., Meridian, W., Warshan, J.B., Enders, A.C., 1986. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes* 35, 1264-1271.
- Glukman, P.D., Hanson, M.A., 2004. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatric Research* 56, 311-317.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Pinal, C., 2005a. The developmental origins of adult disease. *Maternal and Child Nutrition* 1, 130-141.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Spencer, H. G., Batenson, P., 2005b. Enviromental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proceedings of the Royal Society B* 272, 671-677.
- Grace, P.A., 1994. Ischemia-reperfusion injury. *The British Journal of Oral Surgery* 81, 637-647.
- Griesmacher, A., et al., 1995. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine* 98(5), 469-475.
- Gunn, R.G., Doney, J.M., Russel, A.J.F., 1972. Embryo mortality in Scottish Blackface ewes as influenced by body condition at mating and by post-mating nutrition. *Australian Journal of Agricultural Research* 79, 19-25.
- Gunn, R.G., 1977. The effects of two nutritional environments from 6 weeks prepartum to 12 months of age on lifetime performance and reproductive potential of Scottish Blackface ewes in two adult environment. *Animal Production* 25, 155-164.
- Guyton, A.C., Hall, J., 1997. Insulina, glucagon e diabetes mellitus. In: *Tratado de fisiologia médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 883-894.
- Herr, R.R., Jahnke, K., Argoudelis, A.D., 1967. The structure of streptozotocin. *Journal of the American Chemical Society* 89, 18.
- Hoet, J.J., Hanson, M.A., 1999. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *Journal of Physiology* 514(3), 617-627.
- Holemans, K., Gerber, R.T., Meurrens, K., Clerck, F., Poston, L., Van Assche, F.A., 1999. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42, 81-89.

- Holemans, K., Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003a. Fetal Growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 10, 7:392-399.
- Holemans, K., Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003b. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *Journal of Physiology* 574, 11-20.
- Horton, W.E.Jr., Sadler, T.W., 1983. Effects of maternal diabetes on early embryogenesis: alterations in morphogenesis produced by the ketone body, beta-hydroxybutyrate. *Diabetes* 32, 610.
- Ingelfinger, J.R., 2004. Pathogenesis of perinatal programming. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 13, 459-464.
- Jain, SK., Mc Vie, R., Bocchini, JA., 2006. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology* 13, 163-170.
- Junod, A., Lambert, AE., Orci, L., Pictet, R., Gonet, AE., Renold, AE., 1967. Studies of diabetogenic action of streptozotocin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 126, 201-205.
- Junqueira, L.C.U., 1999. Glândulas endócrinas. In: *Histologia básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 349-350.
- Kalter, H., 1996. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. *Reproductive Toxicology* 10, 417-438.
- Korenbrod, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.I., 1977. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction* 17, 298-303.
- Krinsk, N.I., 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and medicine* 200, 248-541.
- Kuzuya, T., Nakagawa, S., Satoh, J., Kanazawa, Y., Iwamoto, Y., Kobayashi, M., Nanjo, K., Sasaki, A., Seino, Y., Ito, C., Shima, K., Nonaka, K., Kadowaki, T., Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus., 2002. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 55, 65-85.
- Lehninger, A.L., 1989. *Princípios de Bioquímica*. Sarvier, São Paulo, pp. 507-528.
- Leonhardt, M., Lesage, J., Croix, D., Dutriez-Casteloot, I., Beauvillain, J.C., Dupouy, J.P., 2003. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma

- leptin in rat pup at birth and weaning and timing of puberty. *Biology of Reproduction* 68, 390-400.
- Lesage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D., Darnaudery, M., 2004. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *Journal of Endocrinology* 181, 291-296.
- López-Soldado, I., Herrera, E., 2003. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Experimental Diabetes Research* 4(2), 107-118.
- Marty, M.S., Chapin, R.E., Parks, L.G., Thorsrud, B.A., 2003. Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 68, 125-136.
- Nathanielsz, P.W., Thornburg, K.L., 2003. Fetal programming: from gene to function systems an overview. *Journal of Physiology* 547, 3-4.
- Odell, W.D., Swerdloff, R.S., 1976. Etiologies of maturation sexual: a model system based on the sexually maturing rat. *Recent Progress in Hormone Research* 32, 245-288.
- Ojeda, S.R., Urbanski, H.F., 1994. Puberty in the rat. In: Knobil, E., Neil, J.D. *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp.363-409.
- Peuchant, E., Brun, J.L., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M.J., Daniel, J.Y., Leng, J.J., Gin, H., 2004. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clinical Biochemistry* 37(4), 293-298.
- Rae, M.T., Rhind, S.M., Kyle, C.E., Miller, D.W., Brooks, A.N., 2002. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. *Animal Reproduction* 72, 63-71.
- Reece, E.A., Homko, C.J., Wu, Y.K., 1996. Multifactorial basis of the syndrome of diabetic embryopathy. *Teratology* 54, 171-82.
- Reece, E.A., Homko, C.J., 2000. Why do diabetic women deliver malformed infants? *Clinics in Obstetrics Gynaecology* 43, 32-45.
- Reece, E.A., Homko, C.J., Wu, Y.K., Wozniter, A., 1998. The role of free radicals and membrane lipids diabetes-induced congenital malformations. *Journal of Society for Gynecologic Investigation* 5, 178-187.

- Rees, D.A., Alcolado, J.C., 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 22, 359-370.
- Rhind, S.M., Rae, M.T., Brooks, N., 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122, 205-214.
- Robb, G.W., Amman, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 103-107.
- Savion, S., Gidon-Dabush, S., Fein, A., Torchinsky, A., Toder, V., 2004. Diabetes teratogenicity is accompanied by alterations in macrophages and cell T subpopulations in the uterus and lymphoid organs. *International Immunopharmacology* 4(10-11), 1319-1327.
- Simmons, R.A., Templeton, L.J., Gertz, S.J., 2001. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in rat. *Diabetes* 50, 2279-2286.
- Suhonen, L., Hiilesmaa, V., Teramo, K., 2000. Glycemic control during early pregnancy and fetal malformations in women with type 1 diabetes melitus. *Diabetologia* 43, 79-82.
- Sun, F., Kawasaki, E., Akazawa, S., Hishikawa, Y., Sugahara, K., Kamihira, S., Koji, T., Eguchi, K., 2005. Apoptosis and its pathway in early post-implantation embryos of diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 67(2), 110-118.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50, 536-546.
- Van Assche, F.A., Holemans, K., Aerts, L., 2001. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *British Medical Bulletins* 60, 173-182.
- Vermeulen, A., 1993. Environment, human reproduction, menopause and andropause. *Environment Health Perspective* 101(2), 91-100.
- Vieira, R., 2006. Título do assunto pesquisado disponível em: <http://www.fundamentosdebioquimica.hpg.ig.com.br/Diabetes.html>, acesso em 14 abr. 2006.
- Wentzel, P., Eriksson, U.F., 2005. A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E₂ in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 73(7), 506-511.

- West, I.C., 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine: a Journal of the British Diabetic Association* 17(3), 171-180.
- Yang, H., Wright, JR., 2002. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. *Endocrinology* 143, 2491-2495.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deas, M., Martínez-Samayoa, P.M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005a. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat male reproductive development. *Journal of Physiology* 563, 275-284.
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P.M., Bautista, C.J., Deás, M., Guillén, L., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., Larrea, F., Nathanielz, P.W., 2005b. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *Journal of Physiology*, 566, 225-236.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deás, M., Martínez-Samayoa, P.M., González-Zambrano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielz, P.W., 2006. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *Journal of Physiology* 571, 221-230.
- Zanato, V.F., Martins, M.P., Anselmo-Franci, J.A., Petenusci, S.O., Lamano-Carvalho, T.L., 1994. Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25, 1273-1280.
- Zhao, Z., Reece, E.A., 2005. Experimental mechanisms of diabetic embryopathy and strategies for developing therapeutic interventions. *Journal of Society for Gynecologic Investigation* 12, 549-557.

CAPÍTULO

Este trabalho deu origem ao artigo **“Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao meio intra-uterino hiperglicêmico”** submetido ao periódico “Life Sciences”.

**Desenvolvimento reprodutivo de ratos machos expostos ao meio intra-uterino
hiperglicêmico**

Elaine Manoela Porto¹, Débora Cristina Damasceno², Juliana Elaine Perobelli³, Raquel Spadotto³, Carla Dal Bianco Fernandes¹, Gustavo Tadeu Volpato³, Wilma De Grava Kempinas³

1Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. 2Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil. 3Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP

Caixa Postal 510

18618-000, Botucatu, SP, Brasil

Tel: + 55 14 3811 6264 ramal 104; Fax: + 55 14 3811 6264 ramal 102

E-mail: kempinas@ibb.unesp.br.

RESUMO

Estudos têm demonstrado que distúrbios no meio intra-uterino, durante o desenvolvimento fetal e neonatal, pode programar a estrutura e função da prole, aumentando a suscetibilidade com que estes indivíduos venham a desenvolver doenças crônicas na vida adulta. Nosso objetivo foi investigar o quanto a hiperglicemia materna, decorrente do diabetes durante a prenhez e lactação, perturba o desenvolvimento puberal e sexual da prole masculina de ratas. A indução do diabetes nas ratas foi realizada através da administração de uma única dose, via intra-venosa, de streptozotocin (STZ; 40mg/kg) antes do acasalamento. Fêmeas Wistar foram acasaladas com machos, no período noturno, e a presença de espermatozóides em lavados vaginais foi considerado dia zero da prenhez. A prole masculina foi analisada em diferentes fases do desenvolvimento sexual. As ratas que receberam STZ apresentaram médias de glicemias ao redor de 400mg/dl. Independente do grupo experimental, não foram observadas malformações externas nos neonatos viáveis. O peso corporal e os níveis plasmáticos de glicose dos filhotes, avaliados no terceiro dia pós-natal, foram menores na prole de ratas diabéticas (G1), comparados ao controle (G2). Na prole G1 foi observado um atraso no tempo (dias) da descida testicular e separação prepucial. O peso de órgãos reprodutivos, assim como as reservas espermáticas e tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo, nos animais pré-púberes e adultos do grupo G1, foram alterados de maneira andrógeno-independente. O conjunto dos resultados obtidos mostraram que o meio intra-uterino hiperglicêmico acarretou em um atraso na instalação da puberdade e maturação sexual da prole masculina.

Palavras-chave: **diabete materna, hiperglicemia, programação fetal, desenvolvimento reprodutivo, rato macho**

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que a hiperglicemia materna tem profundos efeitos e conseqüências na prole durante o seu desenvolvimento fetal e neonatal, aumentando a suscetibilidade destes indivíduos e contribuindo para que desenvolvam doenças crônicas na vida adulta (Barker and Clark, 1997; Boloker et al., 2002; Nathanielsz and Thornburg, 2003). Em humanos, uma relação entre baixo peso ao nascimento (restrição do crescimento intra-uterino) e doenças cardíacas, hipertensão, diabetes tipo 2, resistência à insulina, obesidade, tem sido verificada, evidenciando o papel da “programação” pré-natal como determinante de doenças no adulto (Barker and Osmond, 1986; Barker and Clark, 1997). Esta associação parece ser independente do estilo de vida e fatores de risco clássicos tais como fumo, consumo de álcool, sedentarismo, classe social.

A hipótese da “programação fetal” tem sido proposta como o mecanismo que interliga baixo peso ao nascimento e desenvolvimento de doenças crônicas no adulto. Esta hipótese sugere que um meio intra-uterino anormal durante períodos críticos do desenvolvimento, incluindo a organogênese, pode alterar permanentemente a estrutura e função dos órgãos de maneira epigenética (Barker and Clark, 1997; Ingelfinger, 2004; Gluckman and Hanson, 2004; Gluckman et al., 2005a,b), comprometendo o desenvolvimento e o crescimento embriofetal, o que pode acarretar mau funcionamento dos órgãos e causar doenças na vida adulta.

Diferentes modelos experimentais têm sido utilizados para investigar os efeitos da “programação fetal” no desenvolvimento da prole: exposição das mães à dieta isocalórica com baixo conteúdo protéico (Zambrano et al., 2005a,b, 2006); restrição de nutrientes globais (Garfano et al., 1997); restrição do fluxo sanguíneo uterino (Engelbregt et al., 2000; Simmons et al., 2001); exposição dos fetos a elevados níveis de glicocorticóides (Lésage et al., 2004) e indução experimental do diabetes materno (Holemans et al., 1997, 1999). É relatado que, em humanos, assim como em animais experimentais, o diabetes grave (glicemia superior a 300 mg/dl) durante a gestação induz a restrição de crescimento intra-uterino na prole ocasionando doenças na vida adulta (Boloker et al., 2002).

O diabetes na gestação induz a anormalidades na homeostasia da glicose e secreção de insulina no feto humano, provocando anormalidades no crescimento fetal (Van Assche et al., 2001). O diabetes mal controlado durante a gravidez causa malformações congênitas e

doenças que se desenvolvem na prole pós-natalmente. Os efeitos do diabetes no desenvolvimento do feto está intimamente associado ao estágio do desenvolvimento em que o embrião ou feto é exposto à condição patológica do diabetes materno. A hiperglicemia materna é um dos principais fatores teratogênicos para o embrião, prejudicando o desenvolvimento de muitos órgãos do organismo (Sun et al., 2005). Estudos prospectivos para investigar a potencial associação entre o meio intra-uterino diabético e doenças a longo prazo na prole têm sido facilitado por modelos experimentais em animais com diabetes induzido quimicamente (Boloker et al., 2002).

A indução química do diabetes em roedores pode ser obtida através da administração de drogas seletivamente citotóxicas para as células beta (β)-pancreáticas, tais como a *streptozotocin* (Szkudelski, 2001). *Streptozotocin* é uma nitrosamina que alquila o DNA, levando à morte celular. As células β são mais sensíveis à *streptozotocin* do que outros tipos celulares, por isso a droga é utilizada para induzir o diabetes em roedores de maneira dose dependente (Caluwaerts et al., 2003; Rees and Alcolado, 2005; Zhao and Reece, 2005).

No presente estudo, nosso objetivo foi investigar o quanto a hiperglicemia materna, decorrente do diabetes durante a prenhez e lactação, perturba o desenvolvimento puberal e sexual da prole masculina de ratas em que o diabetes foi induzido quimicamente pela estreptozotocina, visando mimetizar o quadro clínico do diabetes não-controlado na gestação humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Ratos Wistar, 30 machos e 74 fêmeas com 30 dias de idade foram fornecidos pelo Centro Multi-disciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas, CEMIB - UNICAMP. Os animais foram adaptados e mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, durante todo o período experimental, onde permaneceram em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sob condições controladas de temperatura, mantida entre 22^o e 25^oC, umidade relativa próxima de 55% e fotoperíodo de 12 horas (período de luz com início às 7h a.m.), com livre acesso à água e ração. Aos 90 dias de idade, foi iniciado o

período experimental. Todos os procedimentos experimentais foram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (protocolo 05/05).

2. Seqüência experimental para a indução do diabete nas ratas

Aos 90 dias de idade, as ratas não-prenhes normoglicêmicas sorteadas para indução do diabete receberam *streptozotocin* (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA) diluída em tampão citrato (0,1 M; pH 6,5). A dose foi de 40 mg/Kg de peso corpóreo e administrada na cauda via intravenosa. As sorteadas para o grupo controle receberam pela mesma via de administração tampão citrato em volume equivalente à droga diabetogênica calculada para uma rata do mesmo peso. A seguir, as ratas foram mantidas em gaiolas individuais até a manhã do 8^o dia após a indução. A glicemia foi determinada colhendo-se uma gota de sangue por punção com agulha na parte distal da cauda da rata e depositando-a em glicofita. As glicofitas foram lidas em glicosímetro específico (*One Touch Ultra – Johnson & Johnson*[®]) para determinação glicêmica e os valores foram expressos em miligramas por decilitro (mg/dL). O limite de normalidade estabelecido foi de 120 mg/dL e glicemias superiores a este valor confirmaram hiperglicemia. O critério de inclusão estabelecido para compor os grupos com diabete grave consistiu em ratas que apresentassem valores glicêmicos superiores a 200 mg/dL (Calderon et al., 1992; Damasceno et al., 2002; Lopez-Soldado and Herrera, 2003).

3. Acasalamentos naturais e obtenção da prole

Oito dias após a indução do diabete nas ratas, foi iniciada a fase de acasalamento, durante o ciclo de escuro, com duração máxima de 15 dias, até a obtenção de, pelo menos, 8 ratas prenhes por grupo experimental. Para o acasalamento, as ratas foram acomodadas, em duplas aleatórias, em gaiolas de polietileno, com cama de maravalha na presença de um rato macho. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e lavados vaginais das fêmeas foram colhidos com a ponteira de uma pipetador automático contendo 10ml de solução fisiológica a 0,9% sendo o líquido introduzido na vagina e, em seguida, aspirado. O material contido nos 10ml de solução fisiológica foi espalhado sobre uma lâmina histológica limpa e previamente identificada com o número do animal. Os lavados vaginais

foram analisados com auxílio de microscópio óptico. Os fatores indicativos de prenhez foram presença de cabeças de espermatozóides e diagnóstico da fase estral, e este foi definido como dia gestacional zero (DG 0). As ratas foram pesadas em dias alternados do DG 0 ao DG 20 para controle do ganho de peso.

Nas manhãs dos DG 0, 7, 14 e 21 foram colhidas amostras de sangue por punção da parte distal da cauda para a determinação da glicemia materna seguindo os procedimentos utilizados durante o período diabetogênico.

A partir do DG 20, as ratas foram monitoradas quanto ao nascimento dos filhotes. Em seguida, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, procurando-se sempre manter os filhotes do sexo masculino. Ninhadas com número de filhotes inferior a oito tiveram seus filhotes remanejados para outras ninhadas do mesmo grupo experimental, de tal forma que o número de filhotes amamentados por cada rata fosse de, no mínimo, seis e, no máximo, oito. As ratas que não pariram foram mortas em média cinco dias após a data prevista para o nascimento dos filhotes. Em seguida, os úteros foram removidos para verificação de sítios de implantação, contagem de corpos lúteos e presença de reabsorções.

4. Avaliação da prole masculina após o nascimento

Os recém-nascidos foram avaliados quanto à presença de malformações externas. A ninhada foi utilizada como unidade amostral para os parâmetros avaliados até o 39º dia pós-natal (DPN 39). O desenvolvimento reprodutivo foi avaliado em diferentes idades, em grupos de 6 a 8 ratos cada, sendo um a dois por ninhada, de ratas controle e diabéticas, considerando as seguintes fases do desenvolvimento sexual: pré-puberdade (DPN 40), puberdade (DPN 60) e maturidade sexual (DPN 90).

Para evitar rejeição materna, o peso corporal e os níveis de glicemia da prole foram avaliados a partir do DPN 3 (Holemmans et al., 1999) por leitura de hemoglicofita e monitorados no 10º, 40º, 60º e 90º dias de idade.

4.1. Avaliação dos sinais físicos externos do desenvolvimento sexual masculino (início da puberdade)

Foi determinado o dia em que ocorreu a descida dos testículos a partir do DPN 15 através da palpação diária da bolsa escrotal. A separação prepucial foi investigada a partir

do DPN 33 através da retração manual do prepúcio.

4.2. Coleta dos órgãos reprodutores

Nas idades previstas para experimento [40 dias pós-natal (pré-puberdade), 60 (puberdade) e 90 dias de idade (maturidade sexual)], os animais foram anestesiados com éter etílico e mortos por decapitação, e foi realizada a coleta de sangue para posterior separação do plasma e determinação da concentração de testosterona total. O testículo e epidídimo direitos foram removidos e pesados, sendo que nos ratos com 60 e 90 dias foram congelados a -4°C e, posteriormente, processados para a contagem de células germinativas, conforme descrito a seguir. Também foram removidas e pesadas a vesícula seminal (cheia, sem a glândula coaguladora) e a próstata ventral e, em seguida, descartadas. Nas diferentes idades do desenvolvimento sexual, o testículo e epidídimo esquerdos foram removidos e imersos em mistura fixadora de Alfac (85% de álcool 80° , 10% de formol e 5% de ácido acético). Após uma pré-fixação de 4 horas, os órgãos foram removidos do fixador, recortados e retornaram ao fixador até completar 24 horas. Em seguida, a solução foi substituída por álcool 80° , onde as peças permaneceram até processamento de rotina para inclusão em Paraplast. Os tecidos foram seccionados a $5\ \mu\text{m}$ e corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação da espermatogênese e análise histopatológica.

4.3. Contagem do número de espermátides maduras nos testículos e cálculo da produção diária de espermatozóides

Os testículos, descapsulados e pesados logo após a coleta, dos ratos púberes e adultos, foram congelados até a homogeneização segundo métodos descritos por Robb et al. (1978), com as adaptações descritas a seguir. O parênquima testicular foi descongelado e homogeneizado numa mistura de NaCl (9g), Triton X-100 (0,5ml) e Thimerosal (0,1g) (SIGMA *Chemical Company*, St. Louis, Mo.), passando em seguida por um sonificador por 30 segundos. Após diluição de 10 vezes na mistura contendo Triton X-100, uma pequena amostra foi transferida para câmaras de Neubauer (4 campos por animal), procedendo-se a contagem das espermátides maduras, resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermiogênese). Para o cálculo da produção diária de espermatozóides (PDE), o número de espermatozóides por testículo foi dividido por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero.

4.4. Contagem do número e cálculo do tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo

As porções epididimárias cabeça/corpo e cauda dos ratos púberes e adultos foram separadas logo após a coleta e congeladas até a homogeneização, conforme método descrito para o testículo. Após diluição de 20 vezes, foi realizada a contagem em câmaras de Neubauer. A média aritmética dos campos contados resultou no número de espermatozóides expresso em milhões por ml, que multiplicado pelas diluições utilizadas, resultou no número de espermatozóides/órgão que, dividido pela PDE, expressou o tempo de trânsito dos espermatozóides (número de dias requeridos para que eles atravessassem as diferentes porções epididimárias).

4.5. Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia dos espermatozóides, o canal deferente esquerdo dos ratos com 90 dias de idade foi seccionado nas suas extremidades e lavado com o auxílio de uma seringa acoplada a uma agulha, contendo 1,0 ml de solução formol-salina. O lavado foi colhido num tubo *ependorf* e, logo após, esfregaços foram preparados em lâminas histológicas e deixados secar ao ar livre. Com o auxílio de um microscópio com contraste de fase, os esfregaços foram analisados (aumento final de 250 vezes) e foram contados 100 espermatozóides por animal. As anormalidades morfológicas encontradas nos espermatozóides foram classificadas em duas categorias: a) anormalidades da cabeça: sem curvatura característica, em forma de alfinete, sem curvatura e isolada; b) anormalidades da cauda: enrolada, quebrada e isolada. Além da morfologia, a presença ou ausência da gota citoplasmática nos espermatozóides também foi avaliada.

4.6. Avaliação do processo espermatogênico e análise histopatológica

Com a finalidade de avaliar a dinâmica do processo espermatogênico, foram analisadas 100 secções transversais de túbulos seminíferos por animal nas diferentes idades (40, 60 e 90 dias), utilizando-se o método de atribuição de valores, de acordo com a célula germinativa mais madura presente no epitélio tubular (Lamano-Carvalho et al.,1996). As secções foram avaliadas ao acaso e classificadas de acordo com o tipo celular mais avançado presente no epitélio: grau 1- apenas espermatócitos; grau 2- espermátides jovens

de núcleo arredondado (estágios 1 ao 8 da espermiogênese); grau 3- espermátides em fase de maturação, com núcleos ovóides ou alongados (estágios 9 ao 14 da espermiogênese); grau 4- espermátides em fase de maturação, com núcleos alongados (estágios 15 ao 18 da espermiogênese); grau 5- espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em pequena quantidade; grau 6- espermátides maduras (estágio 19 da espermiogênese) em média e máxima quantidade. Ao final, o número de túbulos classificados em cada grau de maturidade foi multiplicado pelo respectivo grau, sendo os valores resultantes somados e, posteriormente, divididos por 100, resultando no “grau médio”. Nos animais adultos (90 dias), foi feita uma avaliação mais detalhada da espermatogênese nos túbulos seminíferos, classificando-os nos estágios de I-VI, VII-VIII, IX-XIII e XIV, de acordo com o número de gerações de espermátides, presença de espermátides maduras localizadas na borda do lúmen ou espermátocito secundário (Ferreira et al., 1967).

Aos 40, 60 e 90 dias pós-natal, os testículos e epidídimo dos ratos foram examinados em microscópio de luz para análise do aspecto do epitélio, luz ductular e interstício para possível identificação de danos histopatológicos.

4.7. Número de células de Sertoli por túbulo seminífero

Para avaliar os possíveis efeitos da hiperglicemia intra-uterina sobre o processo de proliferação das células de Sertoli, foram contados os núcleos das células de Sertoli nos cortes histológicos dos testículo dos ratos aos 90 dias, em 20 túbulos seminíferos por rato no estágio VII da espermatogênese, classificados de acordo com Leblond e Clermont (1952). As avaliações foram feitas de forma “cega” (sem conhecimento do grupo ao qual cada animal pertencia). Para isto, as lâminas foram previamente codificadas (empregando-se uma tabela de aleatorização) por um indivíduo estranho à avaliação.

4.8. Determinação das concentrações plasmáticas de testosterona total

Após a decação dos ratos machos nas diferentes idades, o sangue foi coletado a partir da ruptura dos vasos cervicais em tubo heparinizado para a determinação das concentrações plasmáticas de testosterona. O plasma foi obtido através da centrifugação (2400 rpm, 20 min, 3,5°C) em aparelho refrigerado e congelado a -20°C até o momento das dosagens hormonais. As concentrações de testosterona plasmática total foram determinadas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP,

Estado de São Paulo, Brasil, pela metodologia de quimiluminescência no equipamento de automação Immulit da marca DPC.

5. Forma de análise dos resultados

Para a análise das porcentagens entre o número de fêmeas prenhes e que tiveram prenhez a termo e das porcentagens entre o número de fêmeas que tiveram prenhez a termo e que permaneceram com as ninhadas foi utilizado Teste exato de Fisher e os dados foram expressos em porcentagem. Para a comparação dos demais parâmetros avaliados entre os grupos experimentais, foram utilizados, dependendo da natureza da distribuição dos dados, os testes t de Student ou teste de Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas no programa InStat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). $p < 0,05$ foi considerado como limite de significância estatística.

RESULTADOS

Avaliação dos resultados maternos

Uma das dificuldades do presente trabalho foi conseguir fêmeas com ninhada viável e um número amostral de filhotes machos adequado para cada análise realizada. No grupo de ratas diabéticas, a porcentagem de fêmeas que tiveram prenhez a termo (45,45%) em relação ao número de fêmeas inseminadas ($n=55$) foi menor quando comparado ao grupo de ratas controle (100%; $n=17$). Apenas 7 (28%) das ratas diabéticas mantiveram suas ninhadas. Foi verificado que a hiperglicemia materna, decorrente do quadro clínico de diabetes grave, prejudicou o desenvolvimento e a sobrevivência fetal, evidenciado pelo alto índice de perdas pré e pós-implantação, observado nas ratas diabéticas, submetidas às laparotomias em média 5 dias após a data prevista para o nascimento dos filhotes (dados não mostrados).

O número médio de filhotes nas ninhadas de ratas diabéticas foi menor ($6,12 \pm 0,67$) comparado ao grupo controle ($9,17 \pm 0,52$). Foi observado um alto índice de canibalização dos filhotes e mortes neonatais no grupo de ratas diabéticas, o que não ocorreu no grupo controle. Sinais clássicos do diabetes como baixo ganho de peso corporal, hiperfagia (aumento no consumo de ração), polidipsia (aumento na ingestão de água), poliúria

(aumento da quantidade de urina), foram observados no grupo de ratas diabéticas. As médias das glicemias nas ratas do grupo diabético, avaliada nos dias DG 0, 7, 14 e 20 apresentaram-se ao redor de 400 mg/dL (diabete grave), enquanto que no grupo controle as médias das glicemias foram sempre inferiores ao limite máximo de normalidade (120mg/dl) (dados não mostrados).

Avaliação da prole masculina após o nascimento

Independentemente do grupo experimental, não foram observadas malformações congênitas nos neonatos viáveis. A média do peso corporal (g) dos filhotes, por ninhada, avaliada no 3º DPN, foi menor na prole de ratas diabéticas ($6,29 \pm 0,38$) quando comparada à prole de ratas do grupo controle ($9,08 \pm 0,43$). Três dias após o nascimento, a média das glicemias nas proles de ratas diabéticas foi estatisticamente inferior à média das glicemias nas proles do grupo controle ($p < 0,0001$). No 10º DPN, as médias das glicemias foram semelhantes entre os grupos (dados não mostrados).

A tabela 1 mostra que houve um retardo significativo tanto no tempo (dias) da descida testicular, quanto da separação prepucial dos filhotes machos das ratas diabéticas, comparados aos filhotes machos das ratas controle. O peso corporal (g), nas idades correspondentes à descida testicular e separação prepucial, foi menor na prole das ratas diabéticas comparado à prole do grupo controle.

Parâmetros reprodutivos avaliados nas diferentes fases do desenvolvimento sexual masculino

Peso corporal, glicemia, peso dos órgãos reprodutivos, parâmetros espermáticos, hormonais e histopatologia foram avaliados nas proles masculinas de ambos os grupos na pré-puberdade (40 dias de idade), puberdade (60 dias) e maturidade sexual (90 dias). O número de núcleos de células de Sertoli nos testículos dos animais adultos também foi determinado.

Na tabela 2, foi observado que o peso corporal dos ratos machos provenientes de ratas diabéticas foi menor em todas as idades analisadas, embora aos 90 dias de idade esta diferença não fosse significativa. As médias das glicemias foram semelhantes entre os grupos independentemente da idade. O peso absoluto do testículo (aos 40 e 60 dias de idade), epidídimo (aos 40, 60 e 90 dias), próstata (aos 60 e 90 dias) e da vesícula seminal

(aos 60 dias), assim como o peso relativo do epidídimo dos animais (aos 60 dias) prole de ratas diabéticas foi menor que na prole de ratas controle.

A tabela 3 ilustra o resultado da avaliação dos parâmetros espermáticos. O número de espermátides maduras nos testículos dos ratos aos 60 dias de idade, nascidos de ratas diabéticas, foi significativamente menor, assim como a produção espermática diária quando comparados aos ratos de mães controle. Estes mesmos parâmetros, analisados em termos relativos [PDE/grama (g) testículo e número de espermátides/g de testículo], foram semelhantes entre os dois grupos experimentais. Na cabeça-corpo do epidídimo dos machos nascidos de ratas diabéticas, além de apresentar o tempo (dias) de trânsito espermático acelerado, comparado aos ratos prole do grupo controle, o número de espermatozóides presentes na luz apresentou-se estatisticamente diminuído. Os parâmetros espermáticos avaliados na cauda do epidídimo foram semelhantes entre os dois grupos.

Aos 90 dias de idade, tanto a produção espermática diária, quanto o número de espermátides nos testículos, expressos em termos relativos, foram maiores nos ratos nascidos de ratas diabéticas comparados aos ratos do grupo controle. Os parâmetros espermáticos avaliados na cabeça-corpo do epidídimo não diferiram entre os dois grupos experimentais. O tempo de trânsito espermático epididimário e o número de espermatozóides na cauda do epidídimo foram estatisticamente menores nos machos nascidos de ratas diabéticas, comparado aos ratos controle (tabela 3).

A morfologia dos espermatozóides foi semelhante entre os grupos, sendo que ambos apresentaram 89% de espermatozóides normais e 84% de espermatozóides com retenção da gota citoplasmática (dado não mostrado).

A avaliação do processo espermatogênico em diferentes momentos do desenvolvimento reprodutivo não indicou diferenças significativas quanto ao grau médio de maturação das células germinativas do epitélio dos túbulos seminíferos, conforme apresentado na tabela 4. Da mesma forma, a avaliação do processo espermatogênico mostrou que a exposição do macho a um meio hiperglicêmico in utero e na lactação não provocou alterações na dinâmica do processo na idade adulta (tabela 5). O número médio de células de Sertoli nos ratos machos aos 90 dias de idade por túbulo seminífero no estágio VII da espermatogênese foi semelhante nos dois grupos experimentais (tabela 5).

A análise histopatológica do testículo e epidídimo, observada sob microscopia de luz, também não revelou alterações significativas entre os grupos que pudessem ser atribuídas à

hiperglicemia materna durante a prenhez e lactação (figuras 1 a 6).

A determinação das concentrações plasmáticas de testosterona total no plasma dos filhotes pré-púberes (40 dias de idade), púberes (60 dias) e na idade adulta não mostrou diferença estatística significativa quando comparada ao grupo controle (figura 7).

DISCUSSÃO

Em adição a estudos prévios relatados na literatura, que focaram os efeitos da programação fetal sobre o sistema cardiovascular e o desenvolvimento de anormalidades metabólicas na prole na vida adulta, este trabalho verificou os efeitos tardios hiperglicemia materna sobre as funções reprodutivas masculinas ao longo do seu desenvolvimento. Foi demonstrado que a exposição de ratos ao diabetes materno durante o período fetal e perinatal teve consequências na prole, que só se manifestaram na vida adulta.

Neste estudo, uma única dose de *streptozotocin* (40 mg/kg), administrada antes do acasalamento (período pré-prenhez), foi suficiente para induzir o estado de diabetes grave, com níveis glicêmicos ao redor de 400 mg/dL nas ratas, mimetizando o quadro clínico do diabetes tipo 1 não-controlado em humanos (López-Soldado and Herrera, 2003). Os sinais clássicos da patofisiologia do *Diabetes mellitus* tais como hiperglicemia, polifagia, polidipsia e poliúria observado nas ratas oito dias após a indução do diabetes com a *streptozotocin*, assim como o menor ganho de peso de corporal durante a prenhez, confirmam dados da literatura e corroboram com outros trabalhos em roedores (Padmanabhan and Al-Zuhair, 1988; Damasceno et al., 2002; Al Ghafli et al., 2004).

As ratas diabéticas tiveram prejuízo na prenhez, evidenciado pelo baixo número de fêmeas prenhes a termo, quando comparado às ratas normoglicêmicas do grupo controle, e reduzido número médio de filhotes. Após a morte e análise do útero das ratas diabéticas que não pariram normalmente, foi observada a presença de diversos sítios de reabsorção, indicando que a hiperglicemia crônica no meio intra-uterino, decorrente do diabetes materno, prejudicou o desenvolvimento e sobrevivência do conceito. Al Ghafli et al. (2004) também relataram um aumento no número de reabsorções (mortes embrionárias) e morte fetal na prole de ratas em que o diabetes foi induzido quimicamente.

A teratogenicidade do diabetes tem sido investigada em diversos estudos experimentais (Eriksson et al., 2003; Al Ghafli et al., 2004; Savion et al., 2004). Os efeitos deletérios da hiperglicemia materna sobre a gestação, decorrente do diabetes, tanto em humanos como em animais, incluem abortos espontâneos e aumento da incidência de

malformações congênitas, principalmente defeitos no tubo neural (Kalter, 1996, 2003; Savion et al., 2004; Sun et al., 2005). No presente estudo, após nascimentos naturais, não foi observada a presença de malformações congênitas na prole viável das ratas diabéticas, que vieram a termo. Entretanto, não se pode ignorar o alto índice de canibalização da prole e da incidência de reabsorções, indicativos da existência de problemas embrionários e fetais.

A embriopatia diabética (defeitos ao nascimento e abortos espontâneos) resulta de um ambiente intra-uterino metabolicamente anormal (Buchanan and Kitzmiller, 1994), embora os mecanismos patofisiológicos precisos ainda não estejam bem esclarecidos. Trabalhos na literatura têm demonstrado que ocorre um aumento na produção de espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio (ERMO) em resposta ao distúrbio metabólico decorrente do diabetes, sugerindo que o estresse oxidativo exerce forte influência nas complicações reprodutivas maternas e patogênese da embriopatia diabética (Eriksson and Borg, 1991; West, 2000; Damasceno et al., 2002). A glicose, por si só, é capaz de gerar ERMO em células β -pancreáticas. Esse fato é essencial para a hipótese de que o estresse oxidativo induzido por altas concentrações de glicose é um mecanismo de toxicidade.

Diversos autores têm demonstrado que a suplementação com antioxidantes, tais como vitamina C, vitamina E e ácido fólico, durante a prenhez de ratas diabéticas, diminui a incidência de malformações fetais e reabsorções embrionárias, evidenciando a função normal dos antioxidantes no processo de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento embrionário (Al Ghafli et al., 2004; Wentzel and Eriksson, 2005, 2006)

A glicemia e o peso corporal das proles masculinas das ratas dos dois grupos experimentais não foram avaliados imediatamente após o nascimento para se evitar o risco de rejeição materna dos filhotes (Holemans et al., 1999). A média da glicemia da prole masculina nascida de ratas diabéticas, avaliada no terceiro dia pós-natal, foi inferior à do grupo controle. Ao 10º DPN e em nas demais idades analisadas (40, 60 e 90 dias), a média da glicemia da prole masculina foi semelhante às outras ninhadas. A queda glicêmica observado no 3º DPN pode ter ocorrido devido à resposta exacerbada das células β -pancreáticas destes filhotes em função do estímulo hiperglicêmico excessivo recebido no meio intra-uterino. Interessante notar que em alguns modelos de diabetes na prenhez, indicam que a prole que se desenvolve em um meio intra-uterino hiperglicêmico tem aumentadas as chances de desenvolver diabetes tipo 2 na vida adulta (Boloker et al., 2002),

devido a um prejuízo, a longo prazo, na secreção e ação da insulina no organismo.

No terceiro dia pós-natal a média do peso corporal das ninhadas masculinas das ratas diabéticas apresentou-se reduzida, quando comparado à média do peso corporal das ninhadas do grupo controle, evidenciando restrição de crescimento intra-uterino devido ao prejuízo no desenvolvimento fetal decorrente do meio intra-uterino hiperglicêmico. No entanto, aos 90 dias de idade, embora o peso fosse reduzido, não houve diferença estatística significativa. A hiperglicemia crônica (glicemia > 400mg/dl) no meio intra-uterino de ratas está associada à complicações maternas, tais como vasculopatias e reduzida função renal (Van Assche et al., 2001), deficiência no transporte de nutrientes para a unidade fetoplacentária e prejuízo do fluxo sanguíneo útero-placentário, causando restrição de crescimento intra-uterino do feto (Holemans et al., 2003a,b),

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre o baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Hoet and Hanson, 1999; Soto and Mericq, 2005; Srinivasan et al., 2006). Entretanto, poucos estudos têm documentado a influência da programação fetal nas funções reprodutivas e gonadal masculinas (Main et al., 2006). Prejuízo do crescimento durante a vida fetal está associado a um aumento no risco de desordens reprodutivas tais como câncer ovariano (Barker et al., 1995), menopausa prematura, câncer testicular, criptorquidismo, diminuição da qualidade espermática. Em humanos, é observado que a restrição de crescimento intra-uterino prejudica o desenvolvimento folicular, caracterizado por uma perda prematura de folículos ovarianos, sugerindo que garotas que nascem com baixo peso ao nascimento poderão ter problemas de fertilidade na vida adulta (Bruin et al., 1998). Estes estudos demonstram que fatores ambientais, os quais influenciam a trajetória do crescimento pré-natal e fisiologia de muitos órgãos do organismo, podem programar mudanças persistentes no eixo reprodutivo fetal e, em parte, explicar problemas de fertilidade na vida adulta. A programação do eixo endócrino também ocorre durante fases críticas do desenvolvimento fetal e pode ser afetado pelo retardo de crescimento intra-uterino (Hökken-Koèlega, 2002; Van Weissenbruch et al., 2005), levando a mudanças no início e progressão da puberdade.

Neste estudo, as idades da descida testicular e separação prepucial, sinais físicos externos que sofrem uma intensa regulação androgênica, foram utilizados como diagnóstico do desenvolvimento sexual inicial no rato. Em roedores, é estabelecido que a descida testicular ocorre a partir do 15º dia de vida pós-natal. A separação prepucial, observada

quando o prepúcio se separa da glândula do pênis, normalmente ocorre ao redor do 39º dia de vida pós-natal (Korenbrodt et al., 1977). As idades da descida testicular e da separação prepucial, foram aumentadas na prole masculina das ratas diabéticas, sugerindo que as complicações reprodutivas decorrentes do diabetes grave nas ratas, além de prejudicar o crescimento e o desenvolvimento normal da prole masculina, levou a um retardo no desenvolvimento sexual inicial desses animais. Embora as reduções das concentrações plasmáticas de testosterona não fossem significativas nas proles de ratas diabéticas em todas as etapas do desenvolvimento sexual analisadas, estas taxas aparecem menores aos 40 e 60 dias de idade dos animais. Quanto à média do peso corporal da prole masculina no período de descida testicular e de separação prepucial, houve diminuição nos filhos de ratas diabéticas. Engelbregt et al. (2000) também relataram um retardo no início da puberdade na prole masculina e feminina de ratas com restrição de crescimento, mas não foi observada uma relação direta com o peso corporal. A relação entre o peso corporal (quantidade de gordura) durante o desenvolvimento intra-uterino, no nascimento e no período perinatal e o início da puberdade em ratos tem sido pouco estudada e os reais mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados (Engelbregt et al., 2000, 2001).

Os pesos absolutos do testículo (aos 40 e 60 dias), epidídimo (40, 60 e 90 dias), próstata (60 e 90 dias) e da vesícula seminal (aos 60 dias) foram menores nos ratos nascidos de ratas diabéticas. Este fato, pelo menos em parte, pode ser explicado devido ao baixo peso corporal apresentado por aqueles animais, uma vez que estes mesmos parâmetros, quando analisados em termos relativos não diferiram entre os grupos, exceto o peso relativo do epidídimo que continuou diminuído aos 60 dias de idade.

A morfologia dos testículos e epidídimos dos ratos aos 40, 60 e 90 dias também não foi alterada, assim, o meio intra-uterino hiperglicêmico e, desta forma, a restrição do crescimento intra-uterino embriofetal, não comprometeram a organização estrutural da gônada masculina dos filhos de ratas diabéticas ao longo do desenvolvimento. Interessante notar que nos animais de ambos os grupos experimentais foi verificado a presença de restos citoplasmáticos e material em degeneração na luz da cauda do epidídimo aos 40 dias de idade. Durante o desenvolvimento dos testículos ocorrem muitos eventos de divisões celulares e um mínimo grau de apoptose é um processo normal da espermatogênese (Uzumku et al., 2004).

O número de espermátides maduras presentes nos testículos, assim como o total de

espermatozóides produzidos diariamente (PDE), são importantes indicativos do potencial de fertilidade masculina. Ashby et al. (2003) realizaram uma revisão dos valores da PDE e concluíram que a expressão deste valor em termos relativos representa a eficiência do processo, sendo um parâmetro importante para ser avaliado nos estudos reprodutivos.

Na puberdade (60 dias de idade), a análise dos parâmetros espermáticos mostrou que o número de espermátides maduras nos testículos dos ratos, prole de ratas diabéticas, foi significativamente menor, assim como a PDE, embora a eficiência do processo (PDE/gtestículo), e o número de espermátides/g testículo, tenham sido semelhantes ao grupo controle. Embora nos ratos machos nascidos de ratas diabéticas os parâmetros espermáticos na cauda epididimária não tenham sido alterados, comparados ao grupo controle, houve diminuição do número de espermatozóides na cabeça-corpo do epidídimo, provavelmente devido ao aceleração do tempo de trânsito espermático. Essa diminuição do número de espermatozóides desse segmento pode estar relacionada ao baixo peso do órgão, mesmo quando expresso em termos relativos, observado nesses animais. Na idade adulta (90 dias), embora tanto a produção espermática diária, quanto o número de espermátides por testículo, expressos em termos relativos, tenham sido maiores nos ratos nascidos de mães diabéticas, as reservas espermáticas epididimárias na cauda estiveram diminuídas e o tempo de trânsito espermático acelerado.

O tempo de trânsito espermático (número em dias, que os espermatozóides levam para atravessar as diferentes porções epididimárias), é um processo que sofre regulação androgênica. Varia nas diferentes espécies de mamíferos (Amann et al., 1976) e é extremamente importante para garantir a eficiência e integridade dos processos de maturação dos espermatozóides. O tempo de trânsito espermático (o número, em dias, que os espermatozóides levam para atravessar as diferentes porções epididimárias), processo que sofre regulação androgênica, variando nas diferentes espécies de mamíferos (Amann et al., 1976), e é extremamente importante para garantir a eficiência e integridade dos processos de maturação dos espermatozóides. A rápida passagem dos espermatozóides pelo epidídimo promove mínima exposição dos espermatozóides ao microambiente epididimário normalmente associado aos processos de maturação pós-testiculares (Bedford, 1966, 1967). A aceleração do trânsito espermático epididimário pode, portanto, prejudicar a maturação normal do espermatozóide e a sua capacidade de fertilização. Uma vez que as concentrações plasmáticas de testosterona não diferiram entre as proles masculinas de ratas

controle e diabéticas, a alteração do tempo e trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo parece ter sido independente da ação do andrógeno.

A morfologia espermática é parâmetro importante para a avaliação da fertilidade masculina (Plassmann and Urwyler, 2001). Especificamente, a frequência de anormalidades na cabeça dos espermatozóides está inversamente correlacionada com sua capacidade fertilizante (Bostofte et al., 1990; Hall et al., 1995; Lim et al., 1998; Donnelly et al., 1998), assim como caudas enroladas e quebradas podem prejudicar a motilidade espermática, afetando a fertilidade masculina. A morfologia dos espermatozóides colhidos da cauda epididimária proximal de ratos machos adultos nascidos de ratas diabéticas não se alterou significativamente, comparados aos ratos nascidos de ratas controle. Da mesma forma, a maioria dos espermatozóides analisados sob o microscópio de luz, com contraste de fase, apresentaram a gota citoplasmática no terço médio inferior da cauda, independentemente do grupo experimental. A gota citoplasmática é componente normal dos espermatozóides dos mamíferos, localizada próxima à região da cabeça dos espermatozóides imaturos e distalmente à peça intermediária na região da cauda dos espermatozóides maduros (Cooper et al., 2004). O movimento da gota ao longo do espermatozóide, durante a sua migração através do ducto epididimário, é característico do processo de maturação do espermatozóide, permanecendo em muitos espermatozóides estocados na cauda epididimária dos mamíferos (Cooper and Yeung, 2003). Os mecanismos precisos que controlam a migração da gota ao longo do flagelo do espermatozóide durante o trânsito pelo epidídimo não são completamente compreendidos.

Quanto ao grau médio de maturidade das células germinativas no epitélio dos túbulos seminíferos dos machos nas diferentes idades analisadas, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Avaliando a dinâmica do ciclo espermatogênico nos animais adultos (90 dias de idade) também não foi verificada nenhuma alteração que possa ser atribuída à exposição ao meio intra-uterino hiperglicêmico da prole durante a prenhez.

Nosso estudo mostrou que o número de células de Sertoli nos testículos dos ratos machos aos 90 dias de idade, nascidos de diabéticas, não foi alterado. As células de Sertoli exercem um papel central na determinação do sexo masculino somático e no desenvolvimento e função dos testículos, suprem as células germinativas com nutrientes e fatores de crescimento. Está bem estabelecido que o número de células de Sertoli está relacionado com o tamanho testicular e com a produção espermática (Walker and Cheng,

2005; Petersen and Soder, 2006).

As conseqüências tardias na reprodução e fertilidade de machos têm sido investigada em roedores e ovelhas (Engelbregt et al., 2000; Rae et al., 2000; Rhind et al, 2001; Zambrano et al. 2005a,b), utilizando diferentes protocolos experimentais. Entretanto, modelos de diabete materno e as conseqüências tardias na reprodução da prole masculina são escassos.

Leonhardt et al. (2003) estudando os efeitos da restrição de nutrientes nas últimas semanas de gestação e lactação sobre as funções reprodutivas de ratos na idade adulta, relataram uma diminuição do peso testicular, caracterizado pela diminuição da área de secção e diâmetro intratubular dos túbulos seminíferos, redução dos níveis plasmáticos do hormônio folículo estimulante e de leptina na idade do desmame, além de uma diminuição da massa adiposa. Neste trabalho, o início da puberdade foi prejudicado porque a prole sofreu restrição de nutrientes durante a lactação e/ou gestação.

Bielli et al. (2002), através da manipulação de dietas com diferentes conteúdos calóricos em relação ao gasto energético, verificaram que prejuízo na nutrição fetal devido à desnutrição materna durante a prenhez, pode reduzir o desenvolvimento e função testicular em ovelhas devido a uma redução do número de células de Sertoli nos neonatos.

Zambrano et al. (2005a), em estudos experimentais com ratos, mostraram que a restrição calórica durante a gestação e/ou lactação, embora não tenha alterado o tempo de descida testicular e separação prepucial, aumentou a distância ano-genital (marcador do desenvolvimento sexual) dos animais machos, prejudicou o crescimento testicular associada a uma ligeira tendência à diminuição de testosterona observada no 21º dia de vida e diminuiu o número de espermatozóides na cauda epididimária. Estes animais foram avaliados até a idade de 270 dias pós-natal para serem verificados os efeitos a longo prazo na fertilidade. Os animais que sofreram restrição de nutrientes durante a lactação, mas não na gestação, além da redução das reservas espermáticas epididimárias, mostraram uma redução da fertilidade a partir dos 70 dias de idade.

No presente estudo, é difícil determinar o quanto as alterações encontradas no sistema reprodutivo e nos parâmetros espermáticos dos ratos machos podem ser diretamente resultantes do meio intra-uterino hiperglicêmico, decorrente do diabete materno, ou um efeito indireto do prejuízo nas trocas materno-fetais, que acarreta deficiência de nutrientes e retardo de crescimento intra-uterino da prole, uma vez que ambos os fatores estão

relacionados.

Nossos resultados demonstraram que a hiperglicemia crônica durante gestação e a lactação além de retardar o início da puberdade nos animais afetou as funções reprodutivas da prole na vida adulta, de maneira andrógeno-independente, reforçando a hipótese de que distúrbios no meio intra-uterino podem permanentemente programar a estrutura e função do organismo. Neste contexto, futuros trabalhos para verificar os mecanismos pelos quais o diabetes materno afeta parâmetros reprodutivos na prole poderão ser aplicados na saúde humana, visando um melhor cuidado pré e perinatal, garantindo uma melhor qualidade de vida. Tendo em vista que o diabetes aumenta em proporções epidêmicas no mundo todo, sendo um importante problema de saúde pública da atualidade. Desta forma, a utilização de modelos animais com diabetes materno (grave ou gestacional), induzido experimentalmente, pode ajudar na elucidação dos mecanismos pelos quais a doença programa o organismo fetal a desenvolver doenças crônicas e problemas reprodutivos na vida adulta.

AGRADECIMENTOS. Este trabalho teve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - No. Processo 04/12948-0) e da Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP - No. Processo 01089/05).

REFERÊNCIAS

- Al Ghafli, M.H.M., Padmanabhan, R., Kataya, H.H., Berg, B., 2004. Effects of α -lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. *Molecular and Cellular Biochemistry* 261, 123-135.
- Amann, R.P., Johnson, L., Thompson, D.L., Pickett, B.W., 1976. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoa reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biology of Reproduction* 15, 586-592.
- Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A., Joiner, R., Haseman, J., 2003. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisfenol A between postnatal days 91-97. *Toxicological Science* 74, 129-138.
- Barker, D.J.P., Osmond, C., 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart diseases in England and Wales. *Lancet* 1, 1077-1081.
- Barker, D.J.P., Winter, P.D., Osmond, C., Wield, G.A., 1995. Weight gain in infancy and cancer of the ovary. *Lancet* 345, 1087-1088.
- Barker, D.J.P., Clark, P.M., 1997. Fetal undernutrition and disease in later life. *Reviews of Reproduction* 2, 105-112.
- Bedford, J.M., 1966. Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *The Journal of Experimental Zoology* 163, 319-330.
- Bedford, J.M., 1967. Effect duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of rabbit. *The Journal of Experimental Zoology* 166, 271-282.
- Bielli, A., Pérez, R., Pedrana, G., Milton, J.T.B., Lopez, A., Blackberry, M.A., Duncombe, G., Rodriguez-Martinez, H., Martin, G.B., 2002. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproductive and Fertility Development* 14, 333-337.
- Boloker, J., Gertz, S.J., Simmons, R.A., 2002. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* 51, 1499-1506.
- Bostofte, E., Bagger, P., Michael, A., Stakemann, G., 1990. Fertility prognosis for infertile men from two different population evaluated by the Cox regression model. *Fertility and Sterility* 54, 1100-1106.
- Bruin, J.P., Dorland, M., Bruinse, H.W., Spliet, W., Nikkels, P.G.J., Te Velde, E.R., 1998.

- Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. *Early Human Development* 51, 39-46.
- Buchanan, T.A., Kitzmiller, J.L., 1994. Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. *Annual Review of Medicine* 45, 245-260.
- Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., Brasil, M.A.M., Henry, M.A.C.A., 1992. Diabete e gravidez experimental em ratas I. Indução do diabete, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cirúrgica Brasileira* 7, 142-6.
- Caluwaerts, S., Holemans, K., van Bree, R., Verhaeghe, J., Van Assche, A., 2003. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus? *Journal of Society for Gynecologic Investigation* 10, 216-221.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H., 2003. Developmental changes in signalling transduction factors in maturing sperm during epididymal transit. *Cellular and Molecular Biology* 49(3), 341-349.
- Cooper, T.G., Yeung, C.H., Fetic, S., Sobhani, A., Nieschlag, E., 2004. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Human Reproduction* 19(10), 2283-2288.
- Damasceno, D.C., Volpato, G.T., de Mattos Paranhos Calderon, I., Cunha Rudge, M.V., 2002. Oxidative stress and diabetes in pregnancy rats. *Animal Reproduction Science* 72(3-4), 235-244.
- Donnelly, G.P, Lewis, S.E.M., Nally, M.C., Thompson, W., 1998. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility* 70, 305-314.
- Engelbregt, M.J., Houdijk, M.E., Popp-Snijders, C., Delemarre-van de Waal, H.A., 2000. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research* 48(6), 803-807.
- Engelbregt, M.J., Van Weissenbrunch, M.M., Popp-Snijders, C., Lips, P., Delemarre-van de Waal, H.A., 2001. Body mass index , body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food nutrition. *Pediatric Research* 50(4), 474-478.
- Eriksson, U.J., Borg, L.A.H., 1991. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* 34(5), 325-331.

- Eriksson, U.J., Cedreberg, J., Wentzel, P., 2003. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers – animal and human studies. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 4(1),79-93.
- Ferreira, A.L., Lison, L., Valeri, V., 1967. Caryometric study of spermatogenesis in the rat. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 76(1), 31-55.
- Garfano, A., Czernichow, P., Breant, B., 1997. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 40, 1231-1234.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., 2004. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatric Research* 56, 311-317.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Spencer, H. G., Batenson, P., 2005a. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proceedings of the Royal Society B* 272, 671-677.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Pinal, C., 2005b. The developmental origins of adult disease. *Maternal and Child Nutrition* 1, 130-141.
- Hall, J.A, Fishel, S.B., Timson, J.A., Dowell, K., Klentzerus, D., 1995. Human sperm morphology evaluation pre and post Percoll gradient centrifugation. *Human Reproduction* 2, 342-346.
- Hoet, J.J., Hanson, M.A., 1999. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *Journal of Physiology* 51(3), 617-627.
- Hokken-Koèlega, A.C., 2002. Timing of puberty and fetal growth. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 16(1), 65-71.
- Holemans, K., Van Bree, R., Verhaeger, J., Meurrens, K., Van Assche, F.A., 1997. Maternal semistarvation and streptozotocin-diabetes in rats have different effects on the vivo glucose uptake by peripheral tissues in their female adult offspring. *Journal of Nutrition* 127, 1371-1376.
- Holemans, K., Gerber, R.T., Meurrens, K., De Clerck, F., Poston, L., Van Assche, F.A., 1999. Streptozotocin diabetes in the pregnant induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42, 81-89.
- Holemans, K., Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003a. Fetal Growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 10(7), 392-399.

- Holemans, K., Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003b. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *Journal of Physiology* 574, 11-20.
- Ingelfinger, J.R., 2004. Pathogenesis of perinatal programming. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 13, 459-464.
- Kalter, H., 1996. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. *Reproductive Toxicology* 10(6), 417-438.
- Kalter H., 2003. Frequency of neural tube defects in Mexico. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 67(7), 529.
- Korenbrod, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.I., 1977. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction* 17, 298-303.
- Lamano-Carvalho, T.L., Guimaraes, M.A., Kempinas, W.G., Petenusci, S.O., Rosa e Silva, A.A.M., 1996. Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats. *Andrologia* 28, 117-122.
- Leblond, C.P., Clermont, Y., 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 55, 548-573.
- Leonhardt, M., Lesage, J., Croix, D., Dutriez-Casteloot, I., Beauvillain, J.C., Dupouy, J.P., 2003. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin in rat pup at birth and weaning and timing of puberty. *Biology of Reproduction* 68, 390-400.
- Lésage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D., Darnaudery, M., 2004. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *Journal of Endocrinology* 181, 291-296.
- Lim, C.C., Lewis, S.E.M., Kenned, Y.M., Donnelly, E.T., Thompson, M., 1998. Human sperm morphology and in vitro fertilization: sperm tail defects are prognostic for fertilization failure. *Andrologia* 30, 43-47.
- López-Soldado, I., Herrera, E., 2003. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Experimental Diabetes Research* 4(2), 107-118.
- Main, K.M., Jensen, R.B., Asklund, C., Hoi-Hansen, C.E., Skakkebaek, N.E., 2006. Low birth weight and male reproductive function. *Hormone Research* 65, 116-122.

- Nathanielsz, P.W., Thornburg, K.L., 2003. Fetal programming: from gene to function systems an overview. *Journal of Physiology* 547, 3-4.
- Padmanabhan, R., Al-Zuhair, A.G.H., 1988. Congenital malformations and intruterine growth retardation in streptozotocin induced diabetes during gestation in rat. *Reproductive Toxicology* 1, 117-125.
- Petersen, C., Solder, O., 2006. The Sertoli cell - a hormonal target and super nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research* 66(4), 153-161.
- Plassmann, S., Urwyler, H., 2001. Improved risk assessment by screening sperm parameters. *Toxicology Letters* 119, 119-157.
- Rae, M.T., Rhind, S.M., Kyle, C.E., Miller, D.W., Brooks, A.N., 2000. Maternal undernutrition during early pregnancy up-regulates fetal testicular steroidogenesis in sheep. *Journal of Reproduction & Fertility. Abstract series* 25, 38.
- Rees, DA., Alcolado, JC., 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 22, 359-370.
- Rhind, S.M., Rae, M.T., Brooks, N., 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122, 205-214.
- Robb, G.W., Amman, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 103-107.
- Savion, S., Gidon-Dabush, S., Fein, A., Torchinsky, A., Toder, V., 2004. Diabetes teratogenicity is accompanied by alterations in macrophages and cell T subpopulations in the uterus and lymphoid organs. *International Immunopharmacology* 4(10-11), 1319-1327.
- Simmons, R.A., Templeton, L.J., Gertz, S.J., 2001. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in rat. *Diabetes* 50, 2279-2286.
- Soto, I.N., Mericq, G.V., 2005. Fetal growth restriction and insulin resistance. New findings and review of the literature. *Revista Medica de Chile* 133(1), 97-104.
- Srinivasan, M., Aalinkeel, R., Song, F., Mitrani, P., Pandya, J.D., Strutt, B., Hill, D.J., Patel, M.S., 2006. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 290(1), E129-E-134.

- Sun, F., Kawasaki, E., Akazawa, S., Hishikawa, Y., Sugahara, K., Kamihira, S., Koji, T., Eguchi, K., 2005. Apoptosis and its pathway in early post-implantation embryos of diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 67(2), 110-118.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50, 536-546.
- Uzumcu, M., Suzuki, H., Skinner, M., 2004. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and posnatal testis development and function. *Reproductive Toxicology* 18, 765-774.
- Van Assche, F.A., Holemans, K., Aerts, L., 2001. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *British Medical Bulletins* 60, 173-182.
- Van Weissenbruch, M.M., Engelbregt, M.J., Veening, M.A., Delemarre-van de Waal, H.A., 2005. Fetal nutrition and timing of puberty. *Endocrine Development* 8, 15-33.
- Walker, W.H., Cheng, J., 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130, 15-28.
- Wentzel, P., Eriksson, U.F., 2005. A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E₂ in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 73(7), 506-511.
- Wentzel, P., Eriksson, U.J., 2006. Ethanol-induced fetal dysmorphogenesis in the mouse is diminished by high antioxidative capacity of the mother. *Toxicological Sciences* 92(2), 416-22.
- West, I.C., 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine: a Journal of the British Diabetic Association* 17(3), 171-180.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P.M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005a. A maternal low protein diet durin pregnancy and lactation in the rat male reproductive development. *Journal of Physiology* 563, 275-284.
- Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P.M., Bautista, C.J., Deás, M., Guillén, L., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., Larrea, F., Nathanielz, P.W., 2005b. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female

offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *Journal of Physiology* 566, 225-236.

Zambrano, E., Bautista, C.J., Deás, M., Martínez-Samayoa, P.M., González-Zambrano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielz, P.W., 2006. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *Journal of Physiology*, 571, 221-230.

Zhao, Z., Reece, E.A., 2005. Experimental mechanisms of diabetic embryopathy and strategies for developing therapeutic interventions. *Journal of Society for Gynecologic Investigation* 12, 549-557.

Tabela 1. Peso corporal e idades nos dias da descida testicular e da separação prepucial

	Grupo 1 (12 ninhadas)	Grupo 2 (7 ninhadas)
Descida testicular (dias)	19,93 ± 0,19	22,89 ± 0,44***
Peso (g) da ninhada na idade da descida testicular	44,92 ± 1,12	23,07 ± 2,85***
Separação prepucial (dias)	42,83 ± 0,39	45,13 ± 0,36**
Peso (g) da ninhada no dia da separação prepucial	150,73 ± 3,24	96,48 ± 7,62 **

Grupo 1- prole de ratas controle; Grupo 2- prole de ratas diabéticas. Valores expressos em média ± EPM. ** p<0,01; *** p<0,001. Teste de Mann-Whitney.

Tabela 2. Peso corporal, glicemia, peso absoluto e relativo dos órgãos reprodutivos masculinos de ratos machos aos 40, 60 e 90 dias de idade.

	40 dias		60 dias		90 dias	
	Grupo1 (n=8)	Grupo 2 (n=6)	Grupo1 (n=8)	Grupo 2 (n=6)	Grupo 1 (n=6)	Grupo 2 (n=6)
Peso corporal (g)	148,89±,40	102,90±5,17***	269,14±9,54	219,38±10,45*	375,76±6,70	314,48±25,46
Glicemia (mg/dl)	132,25±12,18	142,33±11,40	109,00±3,71	113,67±2,94	103,00±2,37	103±0,39
Testículo (g)	0,69±63,78	0,44±49,10*	1,50±0,05	1,12±0,05**	1,63±0,15	1,39±0,10
Testículo (g/100g)	0,46±29,60	0,42±35,08	0,56±0,02	0,52±0,04	0,44±0,05	0,45±0,02
Epidídimo (mg)	74,51±6,44	49,50±4,30**	271,56±7,08	172,73±13,92**	532,92± ,92	423,70±28,32**
Epidídimo (mg/100g)	49,74±2,96	48,15± ,74	100,85±5, 26	80,13±7,95*	143,17±7,18	135,64±2,73
Próstata (mg)	51,60±5,74	40,98±2,58	167,30±1,22	112,70±9,06*	429,72±9,25	278,88±14,95**
Próstata (mg/100g)	34,43±3,54	40,08±2,65	60,37±5,07	51,84±4,46	115,04±7,96	91,23±7,34
Vesícula seminal (mg)	28,58±5,51	20,88±2,71	432,63±4,36	260,82±38,65*	1120,00±0,08	853,00±0,10
Vesícula seminal (mg/100g)	18,24±3,03	20,41±2,59	156,32±3,58	123,76±26,25	0,30±0,02	0,25±0,03

Grupo 1- prole das ratas controle; Grupo 2- prole das ratas diabéticas. Valores expressos em média ±

EMP. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Teste de Mann-Whitney.

Tabela 3. Produção espermática diária (absoluta e relativa), número de espermátides maduras no testículo, número e tempo de trânsito dos espermatozóides no epidídimo, de ratos aos 60 dias (púberes) e 90 dias de idade (maturidade sexual).

	60 dias		90 dias	
	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=6)	Grupo 1 (n=8)	Grupo 2 (n=6)
Testículo				
Produção espermática diária (X 10 ⁶) /testículo	24,38 ± 0,77	17,05 ± 1,70***	38,08 ± 0,85	34,50 ± 1,81
Produção espermática diária (X 10 ⁶) /g testículo	20,98 ± 0,45	20,85 ± 1,26	24,65 ± 0,69	29,52 ± 1,15**
Número de espermátides (X 10 ⁶) / testículo	148,70 ± 4,70	104,00 ± 10,38***	232,27 ± 5,16	210,62 ± 11,13
Número de espermátides (X 10 ⁶) /g testículo	127,97 ± 2,72	127,16 ± 7,67	150,60 ± 0,30	180,23 ± 6,97**
Cabeça/corpo do epidídimo				
Número de espermatozóides (X 10 ⁶)	59,71 ± 6,71	25,77 ± 6,21**	112,63 ± 6,90	92,03 ± 7,40
Número de espermatozóides (X 10 ⁶) / g	401,33 ± 30,55	279,41 ± 47,69*	365,95 ± 13,88	386,60 ± 14,23
Trânsito espermático (dias)	2,04 ± 0,21	1,47 ± 0,67*	2,97 ± 0,17	2,65 ± 0,15
Cauda do epidídimo				
Número de espermatozóides (X 10 ⁶)	27,07 ± 5,68	10,66 ± 5,10	188,08 ± 5,34	137,80 ± 10,55**
Número de espermatozóides (X 10 ⁶) /g	353,56 ± 3,11	249,18 ± 97,29	1024,25 ± 0,28	840,37 ± 26,67**
Trânsito espermático (dias)	1,07 ± 0,20	0,54 ± 0,18	4,95 ± 0,15	4,09 ± 0,26*

Grupo 1- prole de ratas controle; Grupo 2- prole de ratas diabéticas. Valores expressos em média ± EPM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Teste t de Student.

Tabela 4. Grau médio de maturação do epitélio dos túbulos seminíferos de ratos machos aos 40, 60 e 90 dias de idade

	40 dias de idade		60 dias de idade		90 dias de idade	
	Grupo1 (n=5)	Grupo 2 (n=5)	Grupo 1 (n=5)	Grupo 2 (n=5)	Grupo 1 (n=4)	Grupo 2 (n=4)
Grau médio de maturação	2,60 ± 0,14	2,30 ± 0,22	3,91 ± 0,13	3,74 ± 0,07	4,01 ± 0,03	4,01 ± 0,07

Grupo 1 – prole de ratas controle; Grupo 2 – prole de ratas diabéticas. Valores expressos em média ± EPM.

Tabela 5. Efeito do meio intra-uterino hiperglicêmico no processo da espermatogênese, estimado pela frequência relativa dos estágios I-VI, VII-VIII, IX-XIII e XIV do ciclo do epitélio seminífero e número médio de células de Sertoli por túbulo seminífero avaliados em ratos adultos (90 dias de idade).

	<i>Grupo 1 (n=5)</i>	<i>Grupo 2 (n=5)</i>
Frequência relativa dos estágios		
I-VI	41,75 ± 0,75	39,75 ± 1,32
VII-VIII	28,75 ± 1,49	31,00 ± 1,15
IX-XIII	24,75 ± 0,48	24,5 ± 1,44
XIV	4,75 ± 0,85	4,75 ± 0,48
Número médio de células de Sertoli	14,70 ± 0,15	14,33 ± 0,18

Grupo 1 – prole de ratas controle; Grupo 2 – prole de ratas diabéticas. Valores expressos em média ± EPM.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias de cortes transversais de testículos de ratos aos 40 dias de idade. Grupo 1- prole de ratas controle: coluna à esquerda; Grupo 2- prole de ratas diabéticas: coluna à direita. A e B: observar o aspecto panorâmico do epitélio germinativo (eg), luz tubular (*) e interstício (in). C a F: detalhe de túbulos seminíferos com as células germinativas mais maduras encontrada nessa fase do desenvolvimento. G e H: detalhe do interstício testicular com destaque para as células de Leydig (seta). 5µm, HE.

Figura 2. Fotomicrografias de cortes longitudinais da cabeça (A e B), cauda proximal (C e D) e cauda distal (E e F) de epidídimos de ratos aos 40 dias de idade. Grupo 1 - prole de ratas controle: coluna à esquerda; Grupo 2 - prole de ratas diabéticas: coluna à direita. Aspecto panorâmico mostrando o epitélio do ducto (ep), luz ductular (*), espermatozóides (sz) e interstício (in) (A a F). No alto de cada fotomicrografia, à direita, detalhe em maior aumento mostrando as células do epitélio de cada região. A seta indica restos citoplasmáticos presentes na luz do epidídimo (E e F). 5 µm, HE.

Figura 3. Fotomicrografias de cortes transversais de testículos de ratos aos 60 dias de idade. Grupo 1 - prole de ratas normoglicêmica: coluna à esquerda; Grupo 2 - prole de ratas hiperglicêmicas: coluna à direita. A e B: observar o aspecto panorâmico do epitélio germinativo (eg), luz tubular (*) e interstício (in). Figuras C a F: detalhe de túbulos seminíferos com as células germinativas mais maduras encontrada nessa fase do desenvolvimento. G e H: detalhe do interstício testicular com destaque para as células de Leydig (seta). 5µm, HE.

Figura 4. Fotomicrografias de cortes longitudinais da cabeça (A e B), cauda proximal (C e D) e cauda distal (E e F) de epidídimos de ratos aos 60 dias de idade. Grupo 1 - prole de ratas

normoglicêmicas: coluna à esquerda; Grupo 2 - prole de ratas hiperglicêmicas: coluna à direita. Aspecto panorâmico mostrando o epitélio do ducto (ep), luz ductular (*), espermatozóides (sz) e interstício (in) (A a F). No alto de cada fotomicrografia, a direita, detalhe em maior aumento mostrando as células do epitélio de cada região. 5 μ m, HE.

Figura 5. Fotomicrografias de cortes transversais de testículos de ratos aos 90 dias de idade. Grupo 1 - prole de ratas normoglicêmicas: coluna à esquerda; Grupo 2 - prole de ratas hiperglicêmicas: coluna à direita. A e B: observar o aspecto panorâmico do epitélio germinativo (eg), luz tubular (*) e interstício (in). C a F: detalhe de túbulos seminíferos nos estágios VII e VIII da espermatogênese. G e H: detalhe do interstício testicular com destaque para as células de Leydig (seta). 5 μ m, HE.

Figura 6. Fotomicrografias de cortes longitudinais da cabeça (A e B), cauda proximal (C e D) e cauda distal (E e F) de epidídimos de ratos aos 90 dias de idade. Grupo 1 - prole de ratas normoglicêmicas: coluna à esquerda; Grupo 2 - prole de ratas hiperglicêmicas: coluna à direita. Aspecto panorâmico mostrando o epitélio do ducto (ep), luz ductular (*), espermatozóides (sz) e interstício (in) (A a F). No alto de cada fotomicrografia, à direita, detalhe em maior aumento mostrando as células do epitélio de cada região. 5 μ m, HE.

Figura 7. Concentrações plasmáticas de testosterona total dos animais aos 40 dias (grupo 1, n= 5; grupo 2, n= 5), 60 dias (grupo 1, n= 7; grupo 2, n= 6) e 90 dias (grupo 1, n= 11; grupo 2, n= 8). Grupo 1- prole de ratas controle; Grupo 2- prole de ratas diabéticas. Valores expressos em média \pm EPM.

Figura 1

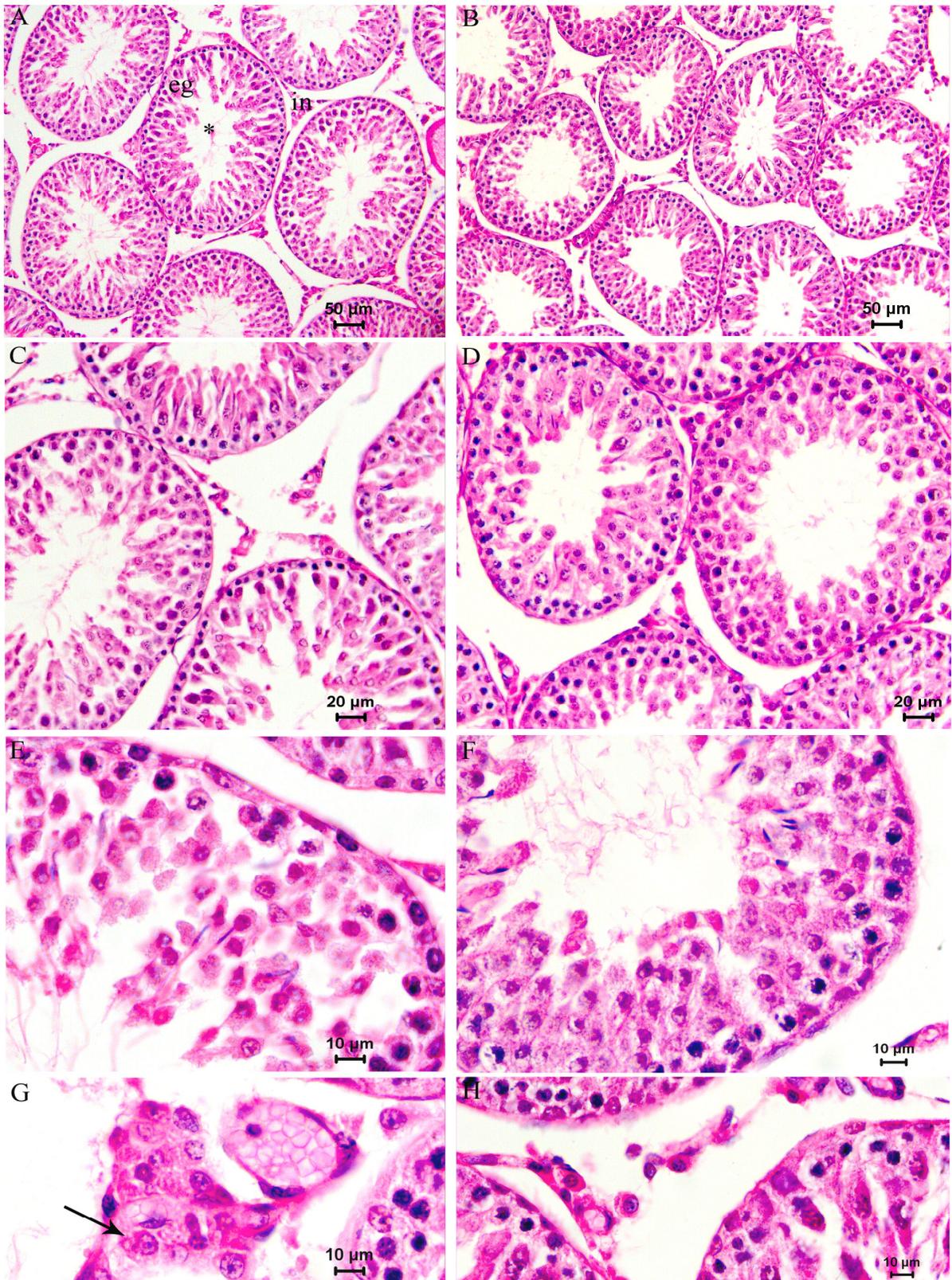


Figura 2

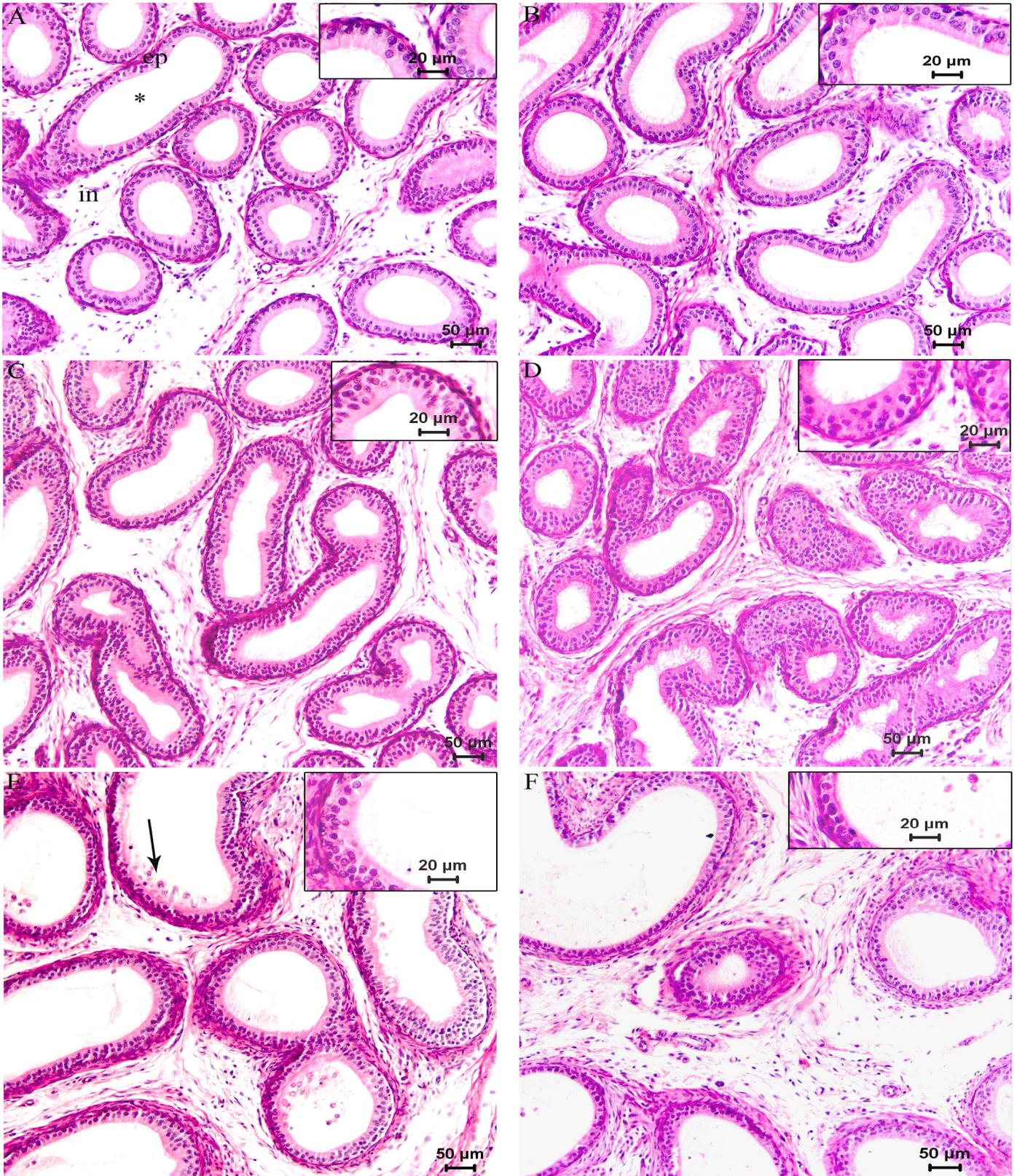


Figura 3

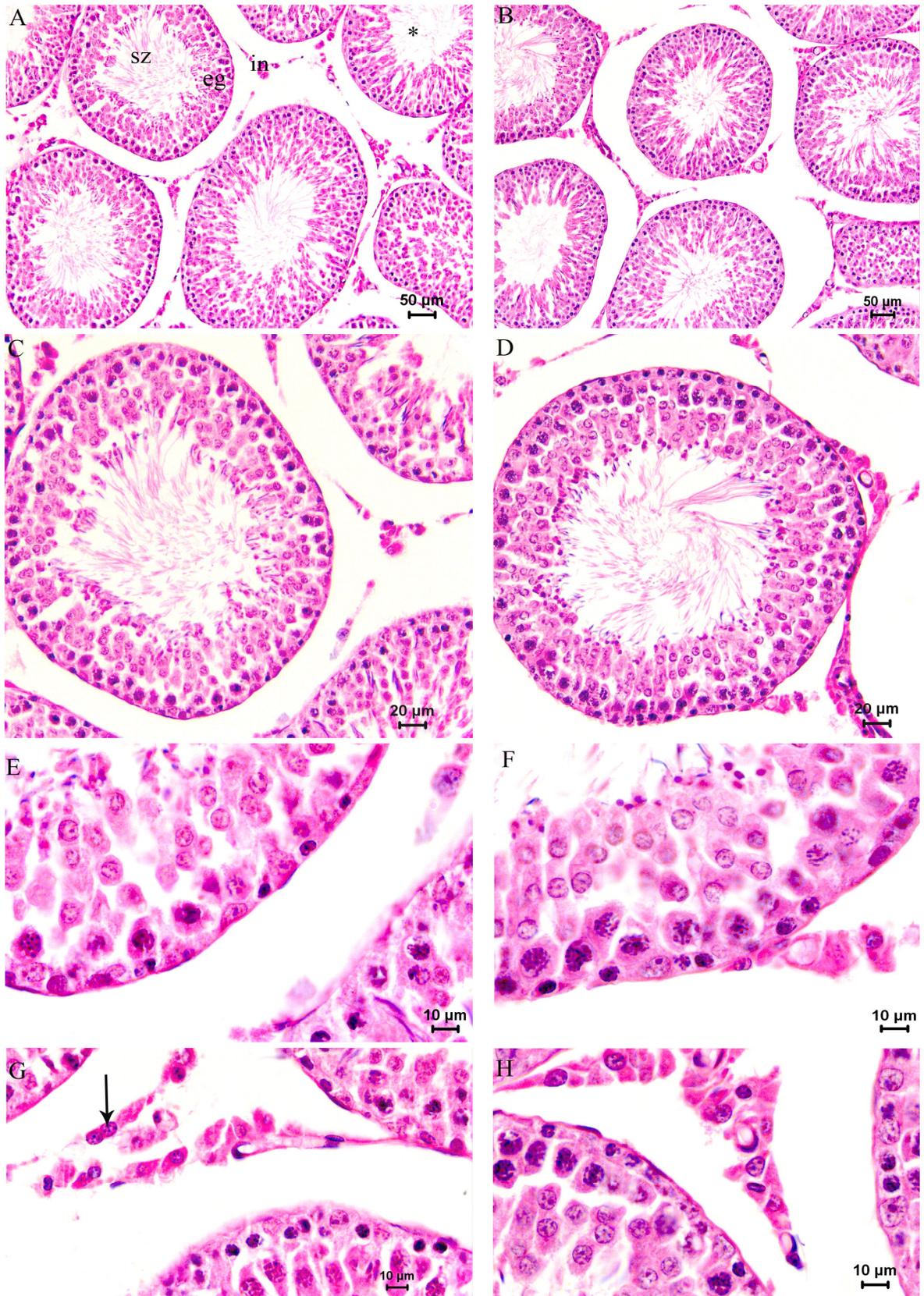


Figura 4

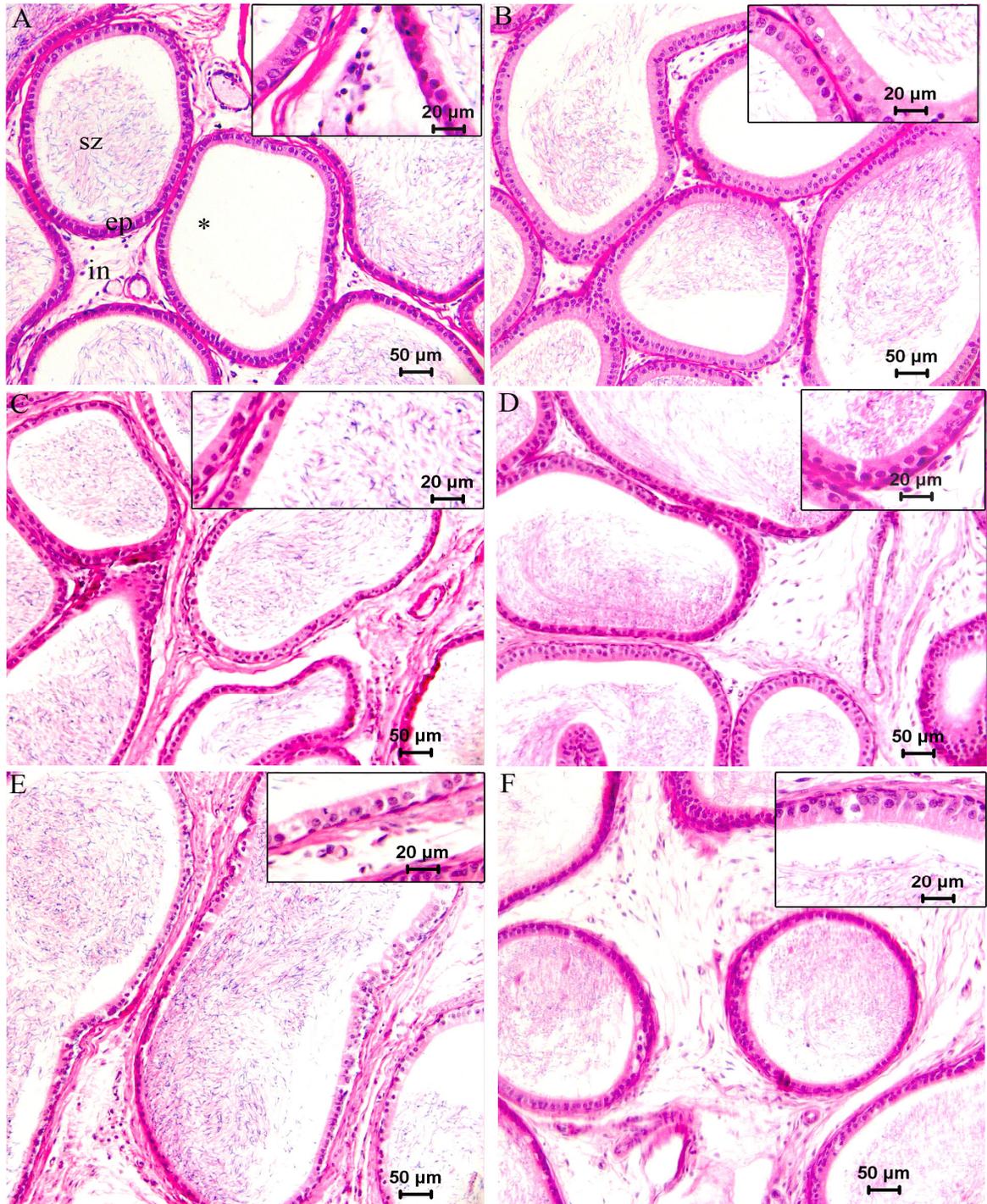


Figura 5

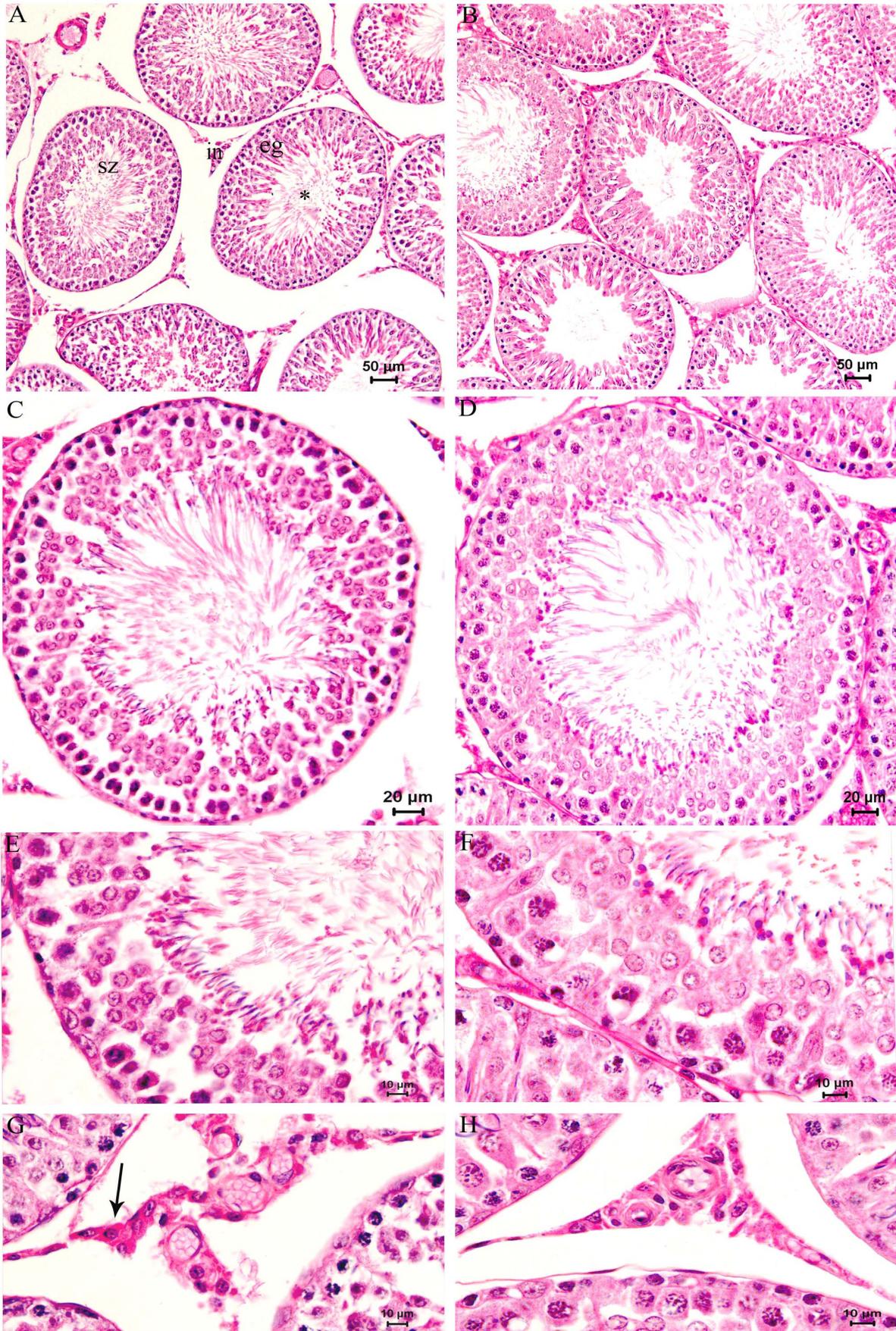
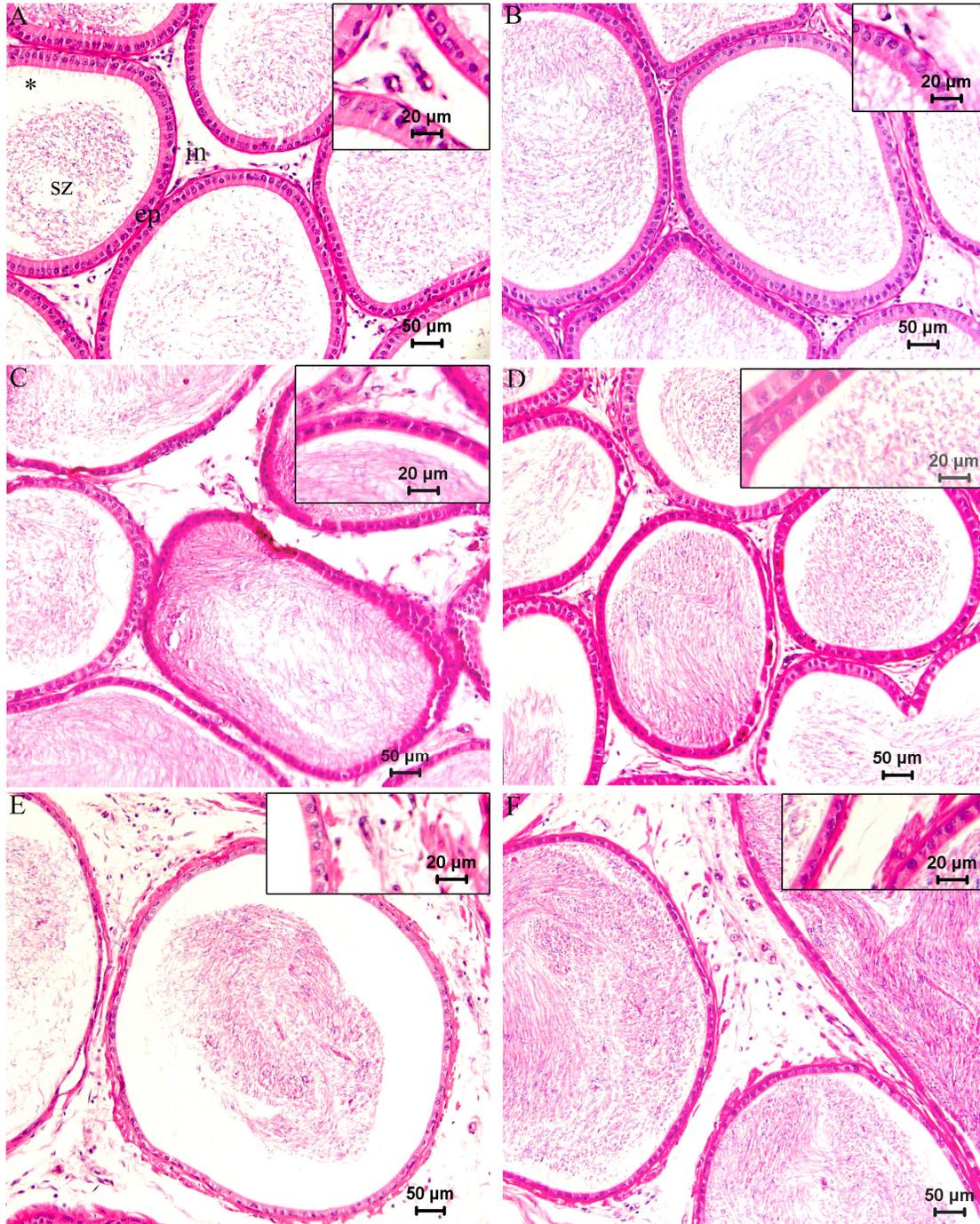


Figura 6



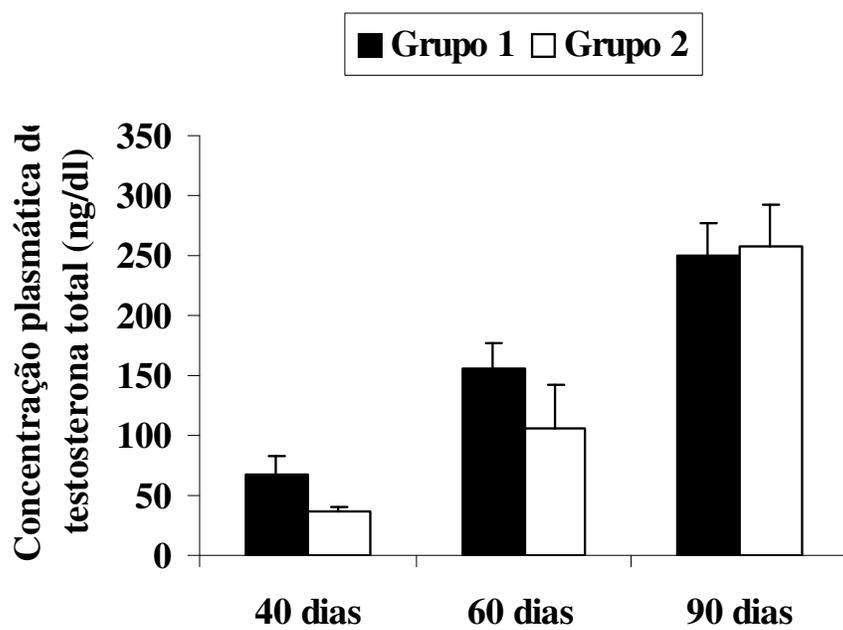
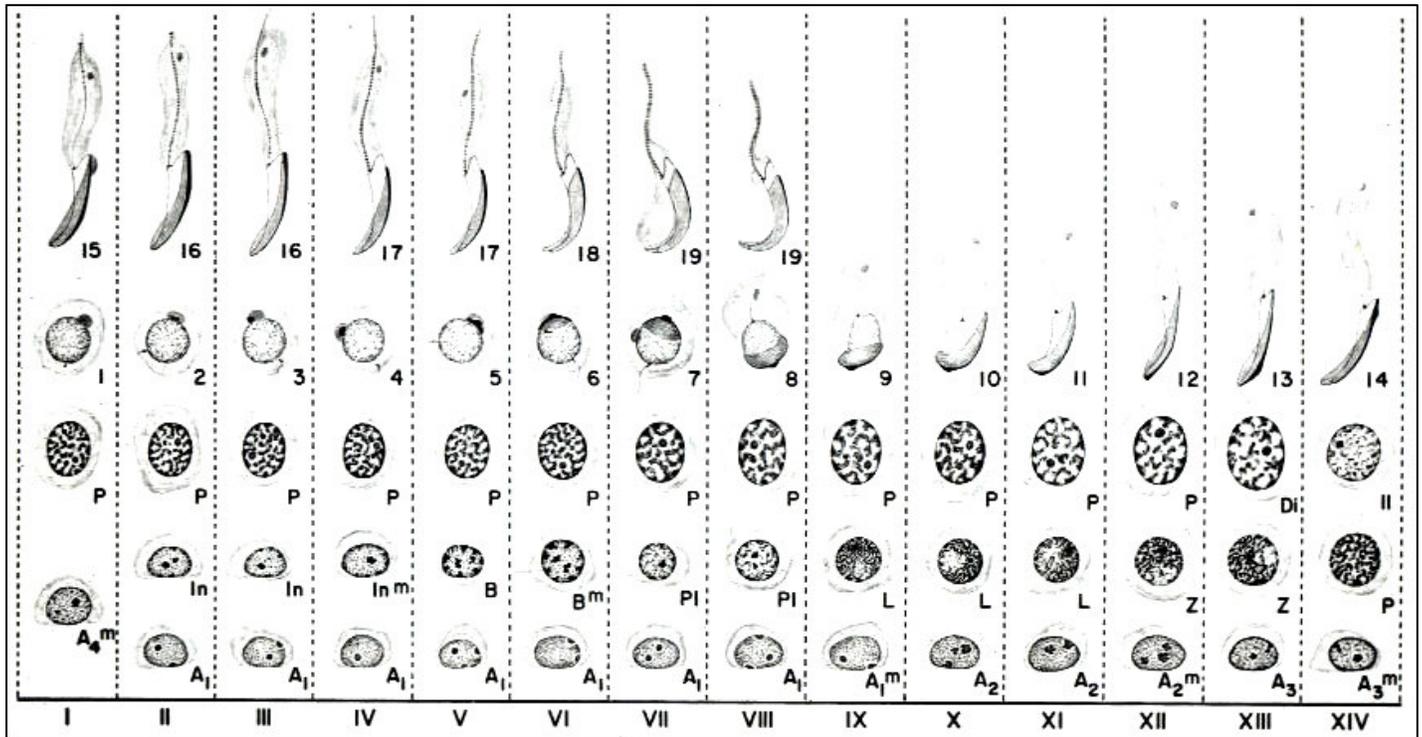


Figura 7

CONCLUSÕES FINAIS

A literatura carece de estudos sobre a influência do meio intra-uterino hiperglicêmico nas funções reprodutivas da prole, ao longo do seu desenvolvimento. A maioria dos estudos nessa área está relacionada aos efeitos do diabetes materno no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 nos filhotes. Embora esteja claro que o desenvolvimento reprodutivo seja claramente influenciado por fatores pré-natais, os mecanismos fisiológicos através dos quais essas influências alteram as funções de órgãos específicos é complexa e, em muitos casos, não compreendida. Este estudo demonstrou que a hiperglicemia crônica no meio intra-uterino, decorrente do diabetes materno, além de prejudicar a gestação das ratas, causou retardo no crescimento intra-uterino da prole, além de um prejuízo no início da puberdade. O peso de órgãos reprodutivos, assim como as reservas espermáticas e o tempo de trânsito no epidídimo foram alterados de maneira andrógeno-independente. A compreensão dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia materna, decorrente do diabetes, afeta o desenvolvimento fetal e altera as funções reprodutivas da prole masculina, pode ajudar a prevenir futuras complicações na prole e melhorar a sua qualidade de vida.

ANEXOS





Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP - fone (014) 3811 6014/ 3814 6013 - fax(014)38153744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 05/05-CEEA, sobre “*Relação entre o diabete materno e o desenvolvimento sexual da prole masculina de ratos*”, sob a responsabilidade da Profa. **Dra. WILMA DE GRAVA KEMPINAS**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, em reunião de 16/03/2005.

Botucatu, 16 de março de 2005.

Prof.Dr. Francisco de Assis Ganezo de Mello
Presidente - CEEA

Nádia Jovêncio Cotrim
Secretária - CEEA