



Universidade Estadual de Campinas

RAQUEL DE MENDONÇA ROSA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**ESTUDO DOS EFEITOS DO DIABETES INDUZIDO POR
ESTREPTOZOTOCINA SOBRE AS GLÂNDULAS SUPRA-RENAIS
E TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Raquel de Mendonça Rosa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Armando Mancio de Camargo

11/01/00

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL NA ÁREA DE
ANATOMIA

ORIENTADOR: PROF. DR. ARMANDO MANCIO DE CAMARGO



20.000.4049

UNIDADE	3e
N.º CHAMADA:	I/UNICAMP
V.	Ex.
TOMBO BC	40589
PROC.	278100
C	☐
D	☒
PREÇO	\$ 11,00
DATA	18/03/00
N.º CPD	

CM-00139023-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Rosa, Raquel de Mendonça
R71e Estudo dos efeitos do diabetes induzido por estreptozotocina sobre as glândulas supra-renais e testículos de camundongos/
 Raquel de Mendonça Rosa. --Campinas, SP: [s.n.], 2000
 100f: ilus.

Orientador: Armando Mancio de Camargo
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
 Instituto de Biologia.

1. Diabetes experimental. 2. Supra-renal. 3. Testículo. I. Camargo, Armando Mancio de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

DATA DA DEFESA: 11/01/2000

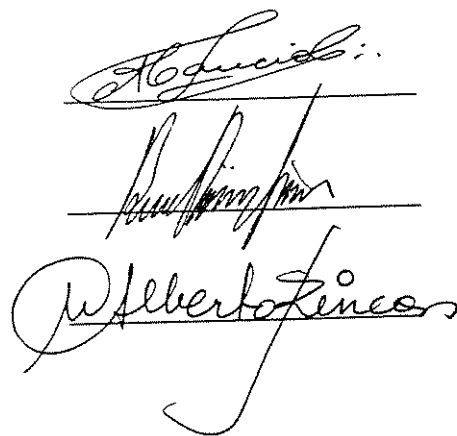
BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

PROF. DR. ARMANDO MANCIO DE CAMARGO

PROF. DR. BRUNO KÖNIG JÚNIOR

PROFA. DRA. MARIA DO CARMO ALBERTO-RINCON



SUPLENTES:

PROFA. DRA. VALÉRIA HELENA ALVES CAGNON QUITETE



*Aos meus pais,
Samuel e Dirce*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*“A ciência aumenta nosso poder
na mesma proporção que diminui o nosso orgulho.”*

Claude Bernard

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelo dom da vida e pelo sustento diário.

Aos meus pais, Samuel e Dirce, por me ensinar o valor da vida.

Ao meu orientador, Dr. Armando Mancio de Camargo, pelos ensinamentos científicos e pelas lições de vida.

À minha querida irmã Emília pela dedicação, incentivo e apoio, durante esta fase.

Ao Carlos pelo amor e companheirismo dedicados e por sempre acreditar em mim com muito carinho.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos, pelas inúmeras palavras de encorajamento.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Bruno König Júnior, Dr^a Maria do Carmo Alberto-Rincon, Dr^a Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, pelas valiosas sugestões.

Aos professores Dr^a Iara Maria Silva de Luca e Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, pelo auxílio nos estudos morfométricos.

Aos professores do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas palavras de encorajamento.

Ao professor Dr. Bruno Cesar Schimming, pelas contribuições feitas ao trabalho e pelo apoio durante esta caminhada.

Ao amigo Euro Marques Júnior, pela editoração desta dissertação.

Aos amigos Djanira Aparecida da Luz e Paulo Henrique Faria, pelo companheirismo na luta desta fase de nossas vidas.

Às secretárias do Departamento de Anatomia, Sílvia Helena Burghi Kalaf e Lourdes Pinheiro, pelo carinho e dedicação.

Aos técnicos Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula, do Departamento de Anatomia, pelos valiosos serviços técnicos realizados.

Às técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Antônia Maria Ferreira Lima e Adriane C. Sarti Sprogis, pela colaboração técnica prestada.

À Marlene Lima, responsável pelo biotério do Departamento de Anatomia e aos demais funcionários do Departamento de Anatomia, meu muito obrigado.

Ao Sílvio Garcia Manoel, pelo auxílio prestado na realização da documentação fotográfica.

Ao professor Dr. Manoel Henrique Salgado, do Departamento de Engenharia de Produção da UNESP-Bauru, pela orientação na análise estatística realizada.

Aos parentes e amigos, por me apoiarem e por orarem por mim constantemente.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido.

Resumo:

Neste trabalho, parâmetros morfológicos (histológico e ultra-estrutural) e morfométrico, das glândulas supra-renais e testículos de camundongos tratados com estreptozotocina (STZ) foram avaliados. Dezesesseis camundongos machos, com 90 dias, foram divididos nos seguintes grupos experimentais: Grupo I – controle; Grupo II – diabético. Durante o tratamento realizaram-se testes semanais de urina com fitas reagentes. Os animais foram sacrificados 32 dias após a constatação do estado diabético do grupo II, sendo fixados *in situ* por perfusão. Retirou-se em seguida as glândulas supra-renais e testículos, as quais foram pesadas e processadas para os estudos. Comparando-se a proteinúria média da urina dos animais dos grupos, obteve-se um acréscimo no grupo II da ordem de 1,4 vezes. Constatou-se que a glicose média da urina no grupo I foi negativa, enquanto que, no grupo II tal média foi de 950 mg/dl. O peso corpóreo médio dos animais do grupo I apresentou um acréscimo de 4,86% contra a perda média de 12,47% do grupo II. Através do estudo morfométrico constatou-se a redução de 15% no peso médio dos testículos dos camundongos diabéticos. Nestas glândulas constatou-se diminuição significativa ($p < 0,01$) do diâmetro dos túbulos seminíferos. As glândulas supra-renais apresentaram-se hipertrofiadas (23,75%), quando comparadas aos animais do grupo I. Observou-se através das microscopias de luz e eletrônica, e da morfometria, um aumento significativo ($p < 0,01$) da zona fasciculada, sugerindo um aumento do número de suas células. Nas zonas glomerulosa e reticular, não observou-se aumentos significativos. A microscopia de luz e eletrônica não evidenciaram alterações relevantes nas células das glândulas estudadas.

Summary:

In the present study, morphometrical and morphological (histological and ultra-structural) parameters of the adrenal and testicle glands of mice treated with estreptozotocin (STZ) were evaluated. Sixteen male mice, with 90 days, were divided in the following experimental groups: Group I - control; Group II - diabetic. During the treatment, weekly tests of urine were realized with reagent bands. The animals were sacrificed 32 days after the verification of the diabetic state of the group II, through the in situ fixation by perfusion. Soon after, the adrenal and testicles glands were removed, weighed and processed for the studies. The evaluation of the protein rate of the urine of the animals of the groups, showed an increase of 1,4 times in the group II. It was verified that the average glucose rate of the urine in the group I was negative, while in the group II the average was of 950 mg/dl. The average corporal weight of the animals of the group I presented an increment of 4,86% and it was noticed a decrease of 12,47% in the group II. Through the morphometrical study, it was verified the reduction of 15% in the average weight of the testicles of the diabetic mice. In these glands, significant decrease was verified ($p < 0,01$) of the diameter of the seminiferous tubules. The adrenal glands were shown larger (23,75%), when compared whit the animals of the group I. It was observed through the light and electron microscopy study, and the morphometrical analysis, a significant increase ($p < 0,01$) of the fascicular zone, suggesting an increase of the number of its cells. In the glomerular and reticular zones, significant increases were not observed. The light and electron microscopy study didn't evidence important alterations in the cells of the studies glands.

Key Words: 1. Experimental Diabetes. 2. Adrenal. 3. Testicle.

Índice

1 - Introdução.....	1
2 - Revisão Bibliográfica.....	7
3 - Materiais & Métodos.....	20
3.1 - Estudo Histológico.....	22
3.2 - Estudo Ultra-estrutural	22
3.3 - Estudo Morfométrico	23
3.4 - Estudo Estatístico	24
4 - Resultados	26
4.1 - Análise da Urina.....	26
4.2 - Análise de Peso	28
4.2.1 - Peso Corpóreo dos camundongos	28
4.2.2 - Peso dos órgãos dos camundongos	29
4.3 - Análise através da Microscopia de Luz	31
4.3.1 - Das Glândulas Supra-Renais	31
4.3.2 - Dos Testículos	32
4.4 - Análise Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	33
4.4.1 - Das Glândulas Supra-Renais	33
4.4.2 - Dos Testículos	36
4.5 - Análise Morfométrica	38
4.5.1 - Das Glândulas Supra-Renais	38
4.5.2 - Dos Testículos	42
4.6 - Documentação Fotográfica	44
4.6.1 - Fotomicrografias	44
4.6.2 - Eletromicrografias	50
5 - Discussão.....	72
6 - Conclusões	78
7 - Bibliografia	80

1 - Introdução

O Diabetes Mellitus é uma doença do metabolismo mediada por um fator genético, caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta de insulina, causada pela diminuição ou ausência da secreção desta substância pelas células β do pâncreas, a qual em sua expressão clínica completamente desenvolvida, caracteriza-se por hiperglicemia, doenças vasculares (como aterosclerose e microangiopatia) e neuropatias.

A insulina é um importante hormônio anabólico que desempenha papel significativo na regulação do metabolismo de carboidratos, no armazenamento de glicogênio, na síntese de ácidos graxos, no transporte de aminoácidos e na síntese de DNA, RNA e proteínas (Anderson et al., 1974). A administração desse hormônio permite um bom controle da glicemia, trazendo algum alívio da sintomatologia do diabetes, porém as complicações persistem.

No segundo século da era Cristã, Galeno observou o diabetes, considerando-o como disfunção dos rins, sendo que posteriormente, por volta do século VI, os hindus descreveram, em detalhes, alguns sintomas da doença, observando sua relação causal com o mal funcionamento do metabolismo humano, assinalando o “gosto adocicado da urina” (apud Arduíno et al., 1980).

A dificuldade de encontrar uma cura bem sucedida para o diabetes tem sido, em grande parte, devida à falta de melhor conhecimento da etiologia da doença, cujo

estudo apresenta várias dificuldades: 1) a complexidade de formas da doença, abrangendo um largo espectro de perfis clínicos e subclínicos; 2) a influência da idade, com relação ao início da doença; 3) diversidade de incidências nos diferentes grupos étnicos e geográficos, que parecem não ter relação definida com fenótipo, dieta ou habitat. Não restam dúvidas de que fatores genéticos desempenham um papel importante no desenvolvimento do diabetes. Apesar do papel da herança ser controvertido, (Creutzfeldt et al., 1976), o mecanismo que parece explicar as manifestações da potencialidade diabética inclui uma combinação de uma herança poligênica ou multifatorial e algumas influências ambientais, até agora de conhecimento restrito. Alguns relatos têm sugerido que existe também um componente autoimune para diabetes (Carson, 1979).

Duas formas clínicas do diabetes foram estabelecidas: Tipo I – Diabetes Mellitus Insulino Dependente (IDDM) (infanto-juvenil), o qual manifesta-se na adolescência e caracteriza-se pela instabilidade, alta sensibilidade à insulina e alta tendência à cetoses; Tipo II – Diabetes Mellitus não Insulino Dependente (NIDDM) (diabetes da maturidade), que manifesta-se no adulto, sendo relativamente estável, apresentando obesidade, relativa insensibilidade à insulina e ausência de cetoses, exceto durante complicações agudas ocasionais (Ellenberg & Rifkin, 1962; Arduíno et al., 1980; Robbins et al., 1989).

Os animais modelo utilizados em estudos experimentais do diabetes apresentaram, hiperglicemia, hipoinsulinemia (relativa ou absoluta) e obesidade, com características metabólicas comuns (Herberg & Coleman, 1977), sendo contudo apresentadas diferenças específicas, quanto a severidade do arranjo metabólico, nas diversas espécies já estudadas. A síndrome da doença nos camundongos diabéticos é caracterizada pela resistência à insulina e pela hiperglicemia, a qual constitui-se numa das mais severas síndromes de animais modelo (Rossini et al., 1977; Carson, 1979; Shafrir, 1996).

A indução do diabetes em animais pode ser realizada através de agentes químicos que produzem hiperglicemia, os quais foram classificados em três categorias: 1) agentes que destroem as células β , cuja recuperação é lenta, visto que requer a regeneração de tais células, caso seja possível; 2) agentes que causam inibição passageira da produção ou secreção de insulina; 3) agentes que prejudicam a eficiência metabólica de insulina em tecidos designados secundariamente. Substâncias químicas da primeira categoria são particularmente interessantes, pois duplicam as lesões que ocorrem durante a destruição das células β em IDDM, provocando diabetes relativamente satisfatória para estudos experimentais. A aloxona e a estreptozotocina (STZ), são agentes antineoplásticos, tóxicos para as células β do pâncreas (produtoras de insulina), os quais são extensivamente utilizados, pois doses diabetogênicas apropriadas desses agentes, produzem animais com uma deficiência de insulina semelhante à forma do diabetes do tipo I. As doses variam de acordo com a espécie, a idade e o estado metabólico do animal (Carson, 1979; Mordes & Rossini, 1981; Mordes et al., 1981; Grodsky et al., 1982).

A literatura relacionada com o diabetes experimental, relata um importante resultado quanto à diferença de peso dos animais, sendo que os animais diabéticos pesam menos que os normais e que alguns de seus órgãos sofrem uma redução significativa de peso e tamanho.

Carson (1979) e Harker et al. (1980), observaram os efeitos hipogonádicos do diabetes espontâneo sobre as glândulas submandibulares e rins, de camundongos machos e fêmeas, os quais provocaram transformações morfológicas nos referidos órgãos. O mesmo ocorreu em camundongos diabéticos por indução química de aloxana e de estreptozotocina (Hilton et al., 1981 e Camargo, 1984).

Camargo (1984) em trabalho experimental, relatou uma diferença significativa com relação ao peso dos animais, onde os camundongos diabéticos pesaram menos que os controles. Os animais que foram submetidos a indução do diabetes pela aloxana e

pela STZ, não só apresentaram a perda de peso durante os trinta dias de tratamento, como também, alguns de seus órgãos sofreram uma significativa redução de peso e tamanho. As glândulas submandibulares e os rins dos animais tratados com STZ, foram mais atingidos, apresentando maior redução de peso e tamanho. Para os animais tratados com aloxana foram as glândulas submandibulares e os testículos que apresentaram uma redução maior de peso. As glândulas supra-renais comportaram-se de maneira contrária, mostrando um acréscimo significativo de tamanho e peso, sendo maior para os animais tratados com aloxana, do que os que receberam injeções de STZ. Por outro lado, os animais do grupo controle que receberam apenas tampão citrato, tiveram seu peso significativamente aumentado. Os resultados apresentados por outros pesquisadores, também mostraram essa reação contrária das glândulas supra-renais, em relação aos outros órgãos importantes já estudados (De Nicola et al., 1976, 1977; Rebuffat et al., 1988).

Duboc et al. (1975); De Nicola et al. (1976, 1977); Rebuffat et al. (1988), observaram um aumento dos níveis de corticosterona no plasma, e Wilke et al. (1993), relatou que muitos indivíduos com diabetes mellitus insulino dependentes perdem, eventualmente, a capacidade de secretar epinefrina da medular da glândula supra-renal. O mecanismo para esta mudança patológica é desconhecido. Esses autores hipotetizaram, que tais anormalidades possam ser atribuídas às mudanças neuropáticas nos nervos esplâncnicos maiores, ou nas células cromafins que eles inervam. Evidências histológicas de degeneração no interior dos nervos colinérgicos terminais, que inervam essas glândulas, foram observadas.

Os estudos de Naeye (1968), mostraram que no período de 32 a 50 dias de idade, o peso das glândulas supra-renais de camundongos diabéticos atingiu apenas 71% do peso médio das glândulas dos camundongos controles; além do que, apresentaram resultados interessantes quanto à massa citoplasmática das células da

supra-renal cortical nos camundongos diabéticos, pois registrou-se o nível médio de 75% daquela constatada nos animais controles.

Ratsimamanga (1969) relatou que, com camundongos diabéticos (db/db) de 2 a 4 meses de idade, o peso do par de glândulas supra-renais era em média 11mg, sendo este valor quase duas vezes aquele encontrado para os camundongos controles. Seus resultados apresentaram ainda, a hipertrofia do córtex e da medula da glândula supra-renal, sendo este fato, posteriormente relatado por De Nicola et al (1976, 1977) e Rebuffat et al.(1988).

No final do primeiro milênio (D.C.), um grande médico árabe, Avicena, forneceu excelente descrição do diabetes, ressaltando a perda das funções sexuais, como um de seus sintomas (apud Arduíno et al., 1980). Outros pesquisadores relataram a existência de alterações no sistema reprodutor masculino, tanto no homem, como nos animais com diabetes (Berquist, 1954; Schöffling et al., 1963, 1967; Faerman et al., 1972; Kolodny et al., 1974; Paz et al., 1978; Ficher et al., 1984; Ho, 1991).

Pesquisas realizadas na década de 60, em ratos diabéticos quimicamente pela injeção de aloxana (Hunt & Bailey, 1961); em camundongos geneticamente diabéticos (Hellman et al., 1963); e em hamster chinês com diabetes espontâneo (Schöffling et al., 1967), ressaltaram que as modificações na fertilidade, podem estar acompanhadas por alterações patológicas nos testículos e glândulas sexuais acessórias. De maneira geral, as alterações encontradas são semelhantes às seguidas de hipofisectomia (Foglia et al., 1969).

Oksanen (1975), relatou diminuições do diâmetro dos túbulos seminíferos e reduções no peso dos testículos, além da atrofia da vesícula seminal, em se tratando de ratos diabéticos pela estreptozotocina. Relatou também, a diminuição das células de Leydig, resultado igualmente observado por Schöffling et al. (1963, 1967) e Paz et al. (1978).

Motivados pelas questões levantadas na literatura, envolvendo o diabetes experimental e sua grande importância nos dias atuais, propõe-se nesta pesquisa, um estudo morfológico e morfométrico das glândulas supra-renais e dos testículos de camundongos, controles e diabéticos por indução de estreptozotocina.

Para os estudos morfométricos foram utilizados, inclusive, os mais recentes métodos de quantificação, dados pela estereologia (Baddeley et al., 1986; Mandarin-De-Lacerda, 1995).

2 - Revisão Bibliográfica

Na literatura referente ao diabetes, está presente uma questão muito discutida, que diz respeito a possível causa do diabetes mellitus. Será o diabetes mellitus causado pela resistência à ação da insulina, ou por uma deficiência em sua produção nas células β -pancreáticas?

Ziv & Shafrir (1997), embasados na segunda hipótese, utilizaram em suas pesquisas os ratos *Psammomys*, mostrando que esses animais são dotados de um pâncreas frágil e notável resistência à insulina, chegando à degeneração de suas células β -pancreáticas, caso sejam submetidos, por várias semanas, à condição de super estimulação da secreção de insulina, causada por um diabetes experimental. A degeneração dessas células β impossibilita a produção de insulina, sendo necessário neste caso, a insulina externa para manter a vida do animal, prevenindo as cetoses. Os ratos *Psammomys* são bons modelo para pacientes que apresentam resistência à ação da insulina, muito antes da deterioração das células β do pâncreas (diabetes tipo II).

Segundo Kanety et al. (1994), a hiperglicemia nos ratos *Psammomys*, pode ser induzida pela super nutrição, servindo também como modelo para estudos desta natureza. Esses estudos são muito úteis, tendo em vista, populações com a Síndrome de resistência à insulina, onde a incidência do diabetes é notavelmente alta, sempre que seus indivíduos melhoram sua nutrição e imergem numa vida abundantemente sedentária (Shafrir, 1996).

Com base nos resultados obtidos, os pesquisadores anteriormente citados, sugeriram que a resistência à insulina ocorre, principalmente, para compensar sua secreção extra e as disfunções das células. A hiperinsulinemia tem sido causa de uma variedade de efeitos de deterioração observadas *in vitro* e *in vivo*.

A hiperglicemia e hipoinsulinemia foram avaliadas em ratos diabéticos pela STZ, mostrando que era possível a correção da hiperglicemia desses animais através da administração de insulina; enquanto que correções da hipoglicemia não são duradouras (Lisato et al., 1992).

Grodsky et al. (1982), enfatizaram a utilização de animais modelos, no estudo do genótipo específico ou expressões do fenótipo, associadas com o diabetes, podendo-se desta forma, refletir diversas nuances da doença humana. No mesmo trabalho, os pesquisadores observaram animais diabéticos e normais, como modelo genético do diabetes induzido quimicamente. Características de animais espontaneamente diabéticos, com e sem obesidade são descritos, com ênfase no desarranjo genético e metabólico.

A dose diabetogênica, da aloxana e STZ, é normalmente de 4 a 5 vezes menor, que suas doses letais, sendo que estas doses variam consideravelmente entre as espécies, a idade e o estado metabólico do animal (Grodsky et al., 1982).

Gaulton et al. (1985) ressaltaram a eficácia das drogas diabetogênicas STZ e aloxana, avaliando-as nos modelos, em estudos de inúmeras deficiências associadas com o diabetes. Camundongos tratados com STZ ou aloxana, que apresentaram diabetes estável foram severamente prejudicados em suas habilidades de formação de anticorpos, de divisão celular ou de resposta de hipersensibilidade *in vivo*. Camundongos diabéticos por aloxana, puderam reverter completamente os efeitos de imunidade, com administração de insulina *in vivo*, enquanto que os camundongos tratados com STZ, restauraram as funções de imunidade no máximo à 80% dos níveis normais. Aloxana e STZ exibem forte toxicidade *in vitro*, para células das ilhotas

pancreáticas isoladas. Resultados indicaram que disfunções de imunidade associada com STZ podem ser atribuídas diretamente às funções de células linfócitas. Em contraste, as disfunções associadas com o diabetes induzido por aloxana, parecem ser uma consequência do estado diabético do animal.

A proteinúria é característica de doença renal, entretanto as causas das lesões renais sugeridas por Sodeman & Sodeman (1983) são variadas. Os pesquisadores Stolinsky et al. (1972), Schein et al. (1974), Dupriest Jr. et al. (1975) e Oberg et al. (1981) atribuíram a proteinúria apresentada por pacientes portadores de câncer, aos efeitos tóxicos da STZ sobre os rins, após tratamento utilizando esse agente diabetogênico. Os resultados sugeriram que essa proteinúria era transitória, visto que a suspensão da droga permitiu o restabelecimento das funções renais, não sendo observado o aparecimento do diabetes clínico, apesar da presença de glicose na urina dos pacientes.

A STZ produz um efeito tóxico específico nas células β (Mordes & Rossini, 1981), sendo geralmente mais eficiente do que a aloxana, em muitas espécies. Uma hipótese primária da ação da STZ, pode ser a estimulação da ADP-ribose polimerase (Whish et al., 1975), a qual modifica a síntese do DNA, que repara e diferencia células β (Gold et al., 1981 e Robbins et al., 1989). Os efeitos metabólicos da insulinopenia induzida pela STZ são similares àqueles descritos para aloxana.

Três tipos de relatos das síndromes do diabetes induzidos pela STZ, foram apresentados por Gold et al. (1981): A) Quando a droga é administrada em doses únicas de alta concentração, causa necroses agudas nas células β e o desaparecimento da insulina provinda dessas células (maior com 24 – 72 horas). Doses efetivamente letais são sentidas mais fortemente com a idade, o sexo e o estado nutricional (sensibilidade maior nos animais jovens, machos e estressados). Nos roedores, uma forte e única dose de STZ pode, não somente destruir as funções das células β , como também prejudicar a estimulação do aminoácido pelo glucagon. A STZ tem sido

utilizada, em estudos experimentais, para induzir diabetes agudas em macacos, sendo somente utilizado, nestes casos, a injeção de dose única de alta concentração (Gold et al., 1981); B) Doses únicas e de pequena concentração de STZ são frequentemente atribuídas como subdiabetogênicas, porém isto não é necessariamente verdadeiro. A administração dessas doses (aproximadamente 50% da dose básica) pode resultar num demorado (de 10 a 60 dias) e gradual desenvolvimento de um diabetes severo. Este fato foi observado em camundongos jovens, podendo também ocorrer em adultos. A insulites não foi observada neste caso. Como nos demais modelos de STZ, a sensibilidade foi mais forte em animais machos e estressados. (Gold et al., 1981); C) Múltiplas doses menores, administradas durante um período maior que 4 a 5 dias, produzem um demorado, porém, progressivo diabetes, começando pouco tempo depois da última dose e aumentando com o passar dos dias, provocando necroses nas células β e severa hiperglicemia (Mordes & Rossini, 1981). Pouco tempo após a iniciação da administração da droga, ocorre uma infiltração intensa nas ilhotas pancreáticas, de macrófagos e linfócitos, resultando numa insulites similar àquela vista em jovens diabéticos insulino dependentes. Estudos com pâncreas perfundido *in vitro* indicaram que a secreção de insulina era seriamente prejudicada após a infiltração dos linfócitos (Gold et al., 1981).

O diabetes insulino dependente induzido em camundongos suscetíveis, por múltiplas doses de pequena concentração de STZ, foi proposto para o estudo da destruição das células β , considerando camundongos C57BL/KsJ com, e sem timo, por fatores genéticos ou devido à intervenção cirúrgica. A cirurgia para retirada do timo aumentou a suscetibilidade de um grupo de machos, induzindo-os à severa hiperglicemia. Necroses das células β e infiltrações inflamatórias das células foram constatadas em estudos histopatológicos. Em geral, as fêmeas, dos dois grupos: timo intacto e timectomizadas apresentaram menos suscetibilidade, que os machos à uma induzida pela STZ, exibindo porém, uma insulites igualmente severa. Assim a detecção

da insulites não prediz o desenvolvimento de uma hiperglicemia mais severa, pois muitas das fêmeas tratadas com STZ, depois de 35 dias do experimento, continuaram apresentando modesta hiperglicemia (abaixo de 200mg/dl) comparada com os machos (acima de 400mg/dl) (Leiter, 1982).

Segundo Paik et al. (1982), a suscetibilidade de camundongos para o diabetes experimental insulino dependente por indução de doses múltiplas subdiabetogênica de STZ, apresentou-se mais forte nos machos, do que nas fêmeas. Tal observação é consistente com a visão de que, o fator crítico que determina a suscetibilidade dos camundongos aos efeitos da hiperglicemia por STZ, é o nível global de andrógenos bastante maior que o nível de estrógenos nos animais receptores. Atualmente estudam-se vários mecanismos alternativos para o efeito dos hormônios nos sexos, de acordo com a sensibilidade diabetogênica.

Rossini et al. (1977), através de injeções múltiplas de doses subdiabetogênica de STZ em camundongos machos CD-1, produziram uma síndrome diabética que inclui uma reação imune das células das ilhotas do pâncreas. A importância do animal modelo na patogênese genética desse diabetes, foi estudado comparando várias linhagens inatas de camundongos. De oito linhagens de camundongos estudadas, só o C57BL/KsJ desenvolve insulites e hiperglicemia, comparável àquelas observadas em camundongos CD-1. Em duas linhagens de camundongos (DBA/2J e BALB/cJ) observaram-se insulites moderada e intolerância de glicose.

Brand et al. (1994), estudaram o papel do glucagon na hiperglicemia diabética, uma questão de controvérsia tendo em vista que, na produção de glucagon seletiva existem dificuldades e deficiências. Camundongos recém-nascidos foram tratados com STZ e desenvolveram uma hiperglicemia moderada, enquanto que camundongos adultos tratados com STZ, desenvolveram uma hiperglicemia severa, sendo que após um tratamento com insulina, a glicose no sangue foi parcialmente nivelada. Os resultados produziram forte evidência adicional, para a hipótese de que o glucagon está

envolvido na patologia do diabetes. O hormônio representa um papel importante no desenvolvimento da hiperglicemia do diabético por STZ, mas a neutralização do glucagon só conduz à normalidade de glicemia na presença de insulina.

Bestetti & Rossi (1980), estudaram o cérebro de ratos Wistar machos, um ano depois das injeções de STZ em tampão citrato, através da microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Foram observadas as seguintes alterações significativas: acúmulo de glicogênio, degeneração de neurônios e mudanças nos axônios. Na microscopia eletrônica dos ratos diabéticos, foi revelado o aumento de glicogênio nos corpos neurais e processos (axônios, sinapses), assim como nas células glia. Estas mudanças demonstram a existência, debaixo de condições experimentais, de patogenicidade de encefalopatia relacionado ao diabetes induzido por STZ.

Nos sistemas circulatório, visual, renal e nervoso periférico, os efeitos adversos do diabetes são comumente reconhecidos e tem sido amplamente estudados; assim como, os efeitos da diminuição de secreção de insulina, ou da resistência da ação da insulina nas glândulas endócrinas. (Steger & Rabe, 1997).

Pesquisas clínicas, e com animais, demonstraram que o diabetes mellitus está geralmente associado às alterações na glândula tireóide, na supra-renal e nas funções gonadais. Algumas dessas alterações podem ser revertidas com tratamento à base de insulina, porém, as funções endócrinas, algumas vezes não são restauradas, mesmo com rigoroso controle de glicemia. O funcionamento do córtex da supra-renal, frequentemente intensifica-se por causa do diabetes, sendo isto devido às alterações das respostas de realimentação glucocorticóides. As respostas ao estresse e aos exercícios, foram frequentemente anormais (Steger & Rabe, 1997).

Muitas evidências indicam a existência de uma inter-relação entre a insulina e o córtex da supra-renal. Experimentos com o diabetes crônico, tem apresentado uma hipertrofia da supra-renal (Devercerski et al., 1963; Ratsimamanga et al., 1969; Kraus, 1973; De Nicola et al., 1976, 1977).

Segundo Jean et al. (1994), embora o estresse possua um importante papel no desenvolvimento do diabetes mellitus, não há evidências experimentais do envolvimento direto da medula da supra-renal, no início do distúrbio; assim estes pesquisadores propuseram-se a examinar essa possível ação. Utilizando-se ratos machos Wistar, divididos em dois grandes grupos (diabéticos por indução de STZ e não diabéticos), os quais foram subdivididos em ratos ADM (cuja supra-renal foi retirada cirurgicamente) e ratos SHAM (cuja supra-renal foi mantida), detectou-se um nível de glicose menor no plasma dos ratos ADM, em comparação com aquele observado nos ratos SHAM, ambos injetados apenas com tampão. O nível de glicose aumentou ($p < 0,001$), nos dois grupos de ratos tratados com STZ, sendo 28% maior nos ADM do que nos ratos SHAM ($p < 0,03$). O nível de insulina no plasma não difere entre os animais ADM e SHAM, tratados somente com tampão ($p > 0,05$), porém é diminuído em animais injetados com STZ, sendo que os ratos ADM possuem níveis de insulina mais altos do que os SHAM ($p < 0,03$). A insulina contida no pâncreas apresenta grande diminuição ($p < 0,001$) nos diabéticos em geral, sendo que, a insulina contida no pâncreas foi maior nos ADM do que nos SHAM ($p < 0,05$). O glucagon contido no pâncreas foi maior nos SHAM injetados com STZ do que naqueles injetados apenas com tampão ($p < 0,05$). Tais resultados indicam que os ratos ADM apresentam maior resistência ao desenvolvimento da hiperglicemia, depois de uma injeção de STZ, do que os animais SHAM, ao que associa-se o alto grau de insulina contido no pâncreas. Em geral, estas observações sugerem que a medula da supra-renal deve estar envolvida no desenvolvimento do diabetes mellitus experimental.

Deane (1962), apresentou uma descrição da estrutura das glândulas supra-renais de mamíferos, com o auxílio da microscopia de luz, dividindo-a em zonas. A arquitetura dessas glândulas foi estudada, através de microscopia eletrônica, por Motta et al. (1979, 1984). Nussdorffer (1986), apresentou um conjunto de investigações ultra-

estruturais da glândula supra-renal de ratos, fazendo também uma breve descrição comparativa das células dessa glândula em outras espécies.

Existem hipóteses relativas à proliferação de células, bem como suas renovações no córtex da supra-renal de mamíferos, porém, este tópico está longe de ser elucidado. As células do córtex da supra-renal, de mamíferos adultos, possuem baixa atividade de proliferação, levando um tempo considerável para serem renovadas. Este fato torna difícil a investigação das características dinâmicas da proliferação destas células, visando o esclarecimento da cinética das mesmas, pois gastar-se-ia um longo tempo de estudo com ratos, utilizando-se a técnica de auto-radiografia (Kataoka et al., 1996). Assim esses pesquisadores radiocatalogaram quase todas as células do corpo de ratos recém-nascidos, sendo a exceção, os neurônios do sistema nervoso central. Para isso, fizeram uso de injeções subcutâneas de (H) trimidine a cada seis horas durante 30 dias, sendo registrados os impulsos observados. As pesquisas revelaram que as células do córtex da supra-renal proliferam-se entre a zona glomerulosa e a fasciculada; e que as células novas ou renovadas moveram-se, com o tempo, em duas direções: superfície cortical e superfície medular. Metade das células do córtex nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticular foram renovadas em 30, 60 e 120 dias respectivamente, levando-se, desta maneira, aproximadamente 240 dias para que as células do córtex pudessem ser substituídas por células renovadas.

De Nicola et al. (1976, 1977) apresentaram resultados que sugeriram maior probabilidade para a existência de uma hiperfunção da supra-renal, do tipo misturado (isto é, gluco e mineralocorticóides), logo após a indução do diabetes por STZ, em ratos machos Wistar, sendo que mais tarde (2 a 3 meses), o desarranjo metabólico dos ratos diabéticos, apresentou-se como em um estresse crônico. Sugeriram ainda, que o limiar da reação dos esteróides foi menos sensível à variação do corticosterona no plasma, sendo detectada uma destruição deste hormônio na região periférica da supra-

renal, e que outros fatores, inclusive o fígado, regularam e removeram os hormônios da corrente sanguínea dos animais diabéticos.

Hausberger & Hausberger (1960) relataram que as glândulas supra-renais dos ratos obesos (ob/ob) são hiperplásticas. Shimomura et al. (1987), relataram que a glândula supra-renal, e seus esteróides, possuem grande importância no desenvolvimento e manutenção de muitas características dos ratos obesos (ob/ob) ou dos diabéticos (db/db).

Appel et al. (1979), observaram em seus experimentos com camundongos YKK de idade avançada, um hiperadrenocorticalismo ou um aumento do córtex da supra-renal, resultado imediato de uma hiperplasia da zona fasciculada e reticular. Nos estudos de ultra-estrutura realizados, observaram poucas gotículas de triglicerídeos e maior número de mitocôndrias, além do aparelho de Golgi bastante desenvolvido, nas células da zona fasciculada e reticular. Anormalidades estruturais e funcionais, desta glândula, foram precedidas pelo desenvolvimento de obesidade, hiperglicemia e hiperinsulinemia.

Rebuffat et al. (1988) relataram que o estado dos eixos hipofisários hipotalâmicos (intactos ou farmacologicamente interrompidos) dos ratos diabéticos pela indução de STZ, alteraram significativamente os resultados obtidos. Uma hipertrofia das células da zona fasciculada e uma alta concentração de corticosterona no plasma, foram detectadas nos ratos do primeiro grupo. Contrapondo-se a isso, observou-se no outro grupo de animais, que o diabetes experimental provocou atrofia das células da zona fasciculada e um decréscimo no nível de corticosterona do plasma. Os efeitos do diabetes induzido por STZ foram completamente revertidos pela infusão de insulina nos grupos de ratos, discutindo-se, porém, a deficiência crônica de insulina.

Scribner et al. (1991), usaram o diabetes induzido pela STZ em ratos e obtiveram resultados revelando que, ratos diabéticos crônicos (STZ) secretam muito corticosterona (evidenciado pelo decréscimo do peso do timo), aumentam a excreção

urinária de corticosterona e possuem elevado nível desse hormônio no plasma durante algumas horas do dia.

Um estudo histológico da supra-renal de ratos com diabetes hipotalâmico hereditário insípido (DI), em comparação com ratos Brattleboro normais, revelou uma estrutura normal (Arimura et al., 1967).

As funções reprodutoras (macho e fêmea) foram frequentemente deturpadas na presença do diabetes. Com base nos estudos com animais, sugeriu-se que a maior causa da alteração secundária de secreção de LHRH hipotalâmica para o diabetes induzido, foi o metabolismo neurotransmissor hipotalâmico (Steger & Rabe, 1997).

Rossi & Aeschlimann (1982) relataram, não apenas um decréscimo significativo nos pesos dos testículos, considerando ratos Wistar controles e diabéticos por STZ, bem como a diminuição da superfície dos túbulos seminíferos. Estes resultados foram comprovados por análises qualitativas e quantitativas, sendo estudados três momentos no decorrer de um ano (4, 8 e 12 meses).

A resposta de hiperglicemia, em camundongos machos e fêmeas (castrados e não castrados) com doses múltiplas e baixas de injeções de STZ foi determinada com ou sem tratamento de testosterona. A castração dos machos diminuiu a resposta hiperglicêmica, enquanto que o tratamento com testosterona restabeleceu este quadro (Rossini et al., 1978).

Ford & Hamilton (1984), observaram em ratos diabéticos por aloxana a concentração de glicose no plasma e a concentração de insulina. Os pesos corpóreos apresentaram-se diminuídos com relação aos controles, o que não ocorreu significativamente com o peso dos testículos. Mudanças semelhantes foram vistas em ratos diabéticos tratados com STZ. A produção de glicose através das espermatogônias e dos túbulos seminíferos dos ratos diabéticos foi diminuída quando comparado com os animais controles.

Küln-Velten et al., 1982 estudaram os mecanismos para redução das respostas das células de Leydig testicular *in vitro*, em ratos adultos machos tratados com STZ, pela estimulação com gonadotrofina coriônica humana. Um decréscimo na formação de testosterona após 6 semanas do diabetes mellitus foi observado, assim como a diminuição do acúmulo AMP cíclica intercelular e a conversão da progesterona para andrógeno.

Nos estudos de Thliveris et al. (1984), as células de Leydig dos ratos controle e dos animais injetados com STZ, foram caracterizadas por um número moderado de mitocôndrias, algumas gotículas de lipídios, e abundância de retículo endoplasmático liso. Uma análise quantitativa dos números de mitocôndrias e gotículas de lipídios não revelou nenhuma diferença entre os animais controle e os diabéticos por STZ; entretanto observaram que as mitocôndrias ficaram menores, as gotículas de lipídios maiores, notou-se também uma tendência para menos células com perfis dilatados de retículo endoplasmático liso nos diabéticos. Os resultados citológicos e bioquímicos sugerem que o diabetes causa pequeno efeito nas funções da célula de Leydig.

Orth et al. (1979) induziram o diabetes experimental por STZ, em ratos Wistar machos, através de uma única injeção intravenosa. Os estudos foram seriados (2, 3 e 4 semanas após a injeção da droga), revelando que ocorreram alterações morfológicas nas células de Leydig.

Howland & Zebrowski (1976), relataram que o diabetes mellitus experimental induzido por aloxana e STZ, interferiu nos pesos dos órgãos reprodutores e na gonadotrofina pituitária (glândula que nivela a testosterona no plasma). Estes estudos foram realizados em ratos (castrados e não castrados) com três meses, e a duração da experiência foi de três semanas, sendo que todas as fases resultaram em perdas de peso corporal, em concentrações elevadas de glicose no plasma e na redução dos pesos das glândulas acessórias sexuais (ratos intactos).

O eixo pituitário-testicular foi investigado em ratos machos diabéticos para determinar a relação entre as alterações hormonais e as atividades esteroidogênica. Ratos machos Sprague-Dawley que pesavam cerca de 250-300g foram usados nas experiências. O diabetes induzido por STZ resultou em uma redução significativa de hormônio luteinizante (LH) no plasma (34%, $p < 0,02$) e de prolactina (53%, $p < 0,001$) mas não modificou as concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH). O tratamento com insulina restabeleceu completa e parcialmente, o LH anormal e o lançamento de prolactina no plasma. Os resultados obtidos sugerem que a insulina possa ter um papel fisiológico diferencial, regulando a atividade de secreção da glândula pituitária. A insulina é necessária para um nível normal de LH, bem como para a produção normal de prolactina e o funcionamento das células de Leydig, porém sua influência na produção de FSH e na função das células de Sertoli não apresentou-se claramente (Perez et al., 1982).

Zanato et al. (1994) investigaram o desenvolvimento sexual de ratos Wistar machos no período de 22 a 97 dias de idade, através de métodos morfométrico, bioquímico e de radioimunologia. O primeiro aumento significativo de testosterona no plasma (T) foi observado entre os dias 40 e 50, sendo acrescido progressivamente depois disso, atingindo um máximo em 76 dias. A prolactina no plasma aumentou em paralelo, alcançando um máximo em 76 dias e atingindo uma baixa por volta de 83 a 97 dias de idade. A evolução do epitélio germinal foi investigada, em cortes transversais de túbulos seminíferos analisados ao acaso. Espermatócitos eram as células germinativas mais avançadas nos testículos de 22 dias de idade. Aos 40 dias, as espermatogônias evoluíram para espermatídes em fase de maturação e aos 50 dias de idade, espermatídes maduras foram achadas nos testículos, embora em pequenas quantidades. A partir de 63 dias de idade, um progressivo aumento na quantidade das espermatídes maduras foi observado, sendo que a produção de esperma aumentou até 97 dias de idade. Estes resultados estão relacionados com ratos Wistar machos na

puberdade entre 40 e 50 dias de idade (180-200 g de peso corpóreo) e completamente amadurecidos entre 83 e 97 dias de idade (aproximadamente 400 g de peso corpóreo).

Diante dos relatos apresentados nestas seções, esta pesquisa tem como objetivo, o estudo abrangente dos efeitos do diabetes sobre as glândulas supra-renais e testículos de camundongos, envolvendo:

- a Morfologia, através da microscopia de luz e eletrônica de transmissão;
- a Morfometria, utilizando o cálculo planimétrico por contagem de pontos;
- a Estereologia, considerando parâmetros tridimensionais de estruturas anatômica através de cortes bidimensionais; e
- a Análise Estatística, através do teste “t-Student”, aplicada a todos os dados obtidos.

3 - Materiais & Métodos

Neste trabalho, foram utilizados dezesseis camundongos machos C57BL/6J, normais com três meses de idade, pesando aproximadamente 25 gramas cada um. Estes animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB). Ao chegarem no biotério do Departamento de Anatomia, foram divididos em dois grupos (I e II), com oito camundongos cada um e mantidos apenas dois animais por gaiola.

Durante toda a experiência, todos os animais foram pesados semanalmente e receberam alimentação sólida balanceada na forma de grânulos (ração purina) e água *ad-libitum*.

Como agente diabetogênico utilizou-se a estreptozotocina (Sigma Chemical Company).

O Grupo I recebeu apenas tampão citrato, o qual serviu para controle e comparação e o Grupo II recebeu tratamento com estreptozotocina.

O meio utilizado para administração do agente diabetogênico foi o tampão citrato 0,1 M e pH 4,4. Cada animal recebeu 5 injeções intraperitoniais, de 0,1 ml da solução, em intervalos de 7 dias. A dosagem utilizada foi de 75 mg/kg de peso nas três primeiras doses e 150 mg/kg nas duas últimas, perfazendo um total de 525 mg/kg de peso, para cada animal. O grupo controle recebeu ao mesmo tempo 0,1 ml de tampão citrato 0,1 M e pH 4,4 pela mesma via intraperitonal.

Para a determinação do estado diabético dos animais, foi usado o Multistix 10SG - Tira Reagente (Bayer), que determinou a variação aproximada de glicose

(mg/dl), proteína (mg/dl) e pH na urina. A urina foi recolhida por compressão manual da bexiga de cada camundongo, e uma gota de urina era colocada no reagente da fita, mas sempre desprezando a primeira gota. A urina era colocada nas áreas da fita reagente respectivamente, da glicose, da proteína e do pH. Após dois segundos, o excesso da gota de urina era removida com o auxílio do papel de filtro. A leitura dos resultados foi feita trinta segundos após a aplicação da urina na fita reagente, em comparação com a tabela fornecida pelo laboratório.

Dois testes de urina foram feitos com Multistix 10SG em todos os animais, para análise quantitativa de glicose, de proteína e do pH, durante a semana que antecedeu o início do tratamento com estreptozotocina para servir de controle padrão. Outros 8 testes foram feitos, um por semana, em todos os animais em experiência durante o tratamento, aplicando a mesma técnica e condições, para certificar-se do estado diabético e quantificar a proteína da urina dos animais.

Após 32 dias da constatação do estado diabético, os camundongos foram pesados, anestesiados com éter etílico e fixados *in situ* por perfusão através do ventrículo esquerdo do coração. Com o animal anestesiado e em decúbito dorsal, foi aberto a parede ântero-lateral esquerda do tórax e, através do ventrículo esquerdo foi injetada rapidamente solução salina com a ajuda de uma seringa de 20 ml. A drenagem do sangue e do excesso de fixador foi efetuada através de uma pequena incisão no ventrículo direito até que todo o sangue tivesse sido eliminado, e em seguida, foi injetado com uma seringa, 20 ml de 2% de paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato, pH 7,4. Seguiu-se rapidamente a abertura da parede abdominal e a retirada das glândulas supra-renais e testículos, e colocados em solução salina. As peças foram pesadas e cortadas sob fixador, e destinadas a rotina para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

Os órgãos do lado direito de quatro animais de cada grupo foram colocados em solução salina e sob lupa, removeu-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo para, rapidamente serem secos em papel de filtro e, em seguida pesados e fotografados.

3.1 - Estudo Histológico

Os órgãos do lado direito dos outros quatro animais de cada grupo e, do esquerdo de dois animais foram imediatamente cortados ao meio sob fixador para microscopia de luz, completando-se a fixação por mais duas horas e meia sob imersão em 2% de paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4 e logo após, foram lavados e conservados em 0,22 M sacarose em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4, para posteriormente serem utilizados.

Os fragmentos das glândulas supra-renais e testículos dos grupos controle e diabético induzido por STZ, foram processados pela técnica histológica de rotina e incluídas em Paraplast Plus (combinação de parafina purificada e plástico polimerizado, contendo Dimethyl Sulphoxide - DMSO), para em seguida, serem cortados com 6 micrômetros de espessura em um Micrótomo Reichert-Jung (Mod. 1130/Biocurt). Os cortes histológicos foram corados pela Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Tricrômico de Mallory, e posteriormente fotografados em um microscópio Carl Zeiss – Jenapol.

3.2 - Estudo Ultra-estrutural

Os órgãos do lado esquerdo de seis animais de cada grupo foram cortados sob fixador em tamanhos apropriados (1mm) para microscopia eletrônica de transmissão, completando-se sua fixação por imersão em 3% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4, por um período de duas horas e meia.

Posteriormente, os fragmentos foram pós-fixados por um período de duas horas em solução de tetróxido de ósmio a 1% diluído em tampão fosfato, pH 7,4. Seguindo-se a pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e corados com acetato de uranila a 0,5% em solução aquosa de sacarose, *overnight*.

Após a passagem pelo acetato de uranila, os fragmentos foram desidratados em série de concentrações crescentes de acetona até atingir 100%. A inclusão foi feita em resina Araldite, para a polimerização e o endurecimento; o material foi colocado em moldes especiais e submetido a uma temperatura de cerca de 60° C overnight. Em seguida, os blocos foram preparados e cortados em um ultramicrotomo (LKB 8800 Ultratome III), com 0,5 micrômetros de espessura. Esses cortes semifinos foram feitos com navalha de vidro, montados em lâmina e corados pela técnica de Richardson et al. (1960), (Azul de Metileno - Azur II de Mallory), para serem examinados sob microscopia de luz. Após definir as áreas desejadas para a análise em microscopia eletrônica de transmissão, os blocos foram trimados e submetidos a novos cortes. Em seguida, foram feitos cortes ultrafinos em um ultramicrotomo (Ultracut UCT 020 Leica), com navalha de diamante, montados em telas de cobre de 200 mesh, contrastados com citrato de chumbo (Reynolds, 1963 e Glauert, 1975), examinados e fotografados em um microscópio eletrônico LEO 906, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.3 - Estudo Morfométrico

Para o estudo morfométrico foram utilizados quatro animais de cada grupo (controle e diabético). Os cortes para esta análise, foram os preparados histologicamente, com coloração em H.E. e Tricrômico de Mallory. Selecionou-se dez cortes de cada animal, e em seguida foram feitas medidas para determinação quantitativa da fração de volume, (V_V), através de um retículo quadrilátero na ocular graduada (1mm/100) acoplada ao microscópio de luz Olympus CBB e objetiva de 10X. A medida foi feita tendo como parâmetros o córtex e a medula da glândula supra-renal.

Utilizou-se a estereologia para quantificar, a Densidade de Volume (V_V), e a densidade de superfície (S_V), nas três zonas do córtex da glândula supra-renal (glomerulosa, fasciculada e reticular), através do Sistema-teste Ciclóides (Baddeley et al., 1986), o qual utiliza secções verticais. O sistema-teste foi reproduzido em acetato e

com o auxílio de um microscópio Nikon (Optiphot-2) sob luz transmitida, utilizando-se a objetiva de 40x/0,55 NA de imersão em água, acoplado a uma vídeo-câmara Hamamatsu e um monitor Sony. O acetato foi fixado no monitor permitindo a quantificação das zonas.

A porcentagem média das zonas foi determinada pela equação:

$$V_V = P_P / P_T,$$

sendo, P_P o número de pontos coincidentes sobre cada uma das zonas da glândula e P_T o número total de pontos, isto é, somatória dos P_P das zonas consideradas.

A densidade de superfície foi determinada através da contagem das intersecções dos arcos ciclóides com as células de cada zona em particular, aplicando-se a seguinte equação:

$$S_V = 2I/L,$$

onde, I é a intersecção dos arcos ciclóides com o citoplasma das células e L é o comprimento do arco.

Nos testículos a média dos diâmetros ortogonais (D_1 e D_2) foi obtida através da medição de 20 túbulos seminíferos por animal, com uma régua graduada inserida na ocular, onde as unidades de medida obtidas (μm ocular) foram aferidas em mm, mediante o uso de uma lâmina (ZEISS) contendo 1mm dividido em 100 partes, 0,01mm ou 10 μm (μm objeto).

3.4 - Estudo Estatístico

O estudo estatístico foi realizado nas seguintes variáveis: peso corpóreo inicial e final (g); peso das glândulas (mg); a quantificação da glicose e proteína na urina; a densidade de volume e a densidade de superfície da glândula supra-renal e a média dos diâmetros ortogonais dos túbulos seminíferos dos testículos. Em todas essas variáveis foi realizado análise estatística, utilizando-se o Teste t-student para verificar se as médias dos resultados morfométricos de variáveis de duas amostras eram

estatisticamente iguais ou não. Deste modo utilizamos o test-t para amostras independentes. Todo estudo foi realizado com nível de probabilidade de erro de 5% (Guedes & Guedes, 1988).

4 - Resultados

4.1 - Análise da Urina

Alterações químicas significativas na urina dos camundongos utilizados no experimento, foram reveladas pela utilização de fitas reagentes. O valor padrão normal de proteína na urina obtido antes do tratamento, foi de 34,69 mg/dl. Durante os dias do experimento, no lote de animais controle (n=8), os quais receberam apenas injeções de tampão citrato, o valor médio de proteína na urina, foi de 34,86 mg/dl, enquanto que os animais que receberam tratamento com STZ, apresentaram uma taxa média de proteína, da ordem de 1,4 vezes maior, que aquela encontrada nos controles, conforme mostra a Tabela 1.

Reações negativas para glicose nos testes que antecederam o tratamento, foram observadas em todos os animais. As mesmas reações negativas foram encontradas nos animais que receberam apenas tampão citrato, durante o tratamento. Os animais que receberam injeções de estreptozotocina (agente diabetogênico), apresentaram valores significantes de glicosúria, indicando o estado diabético dos animais, como indica a Tabela 1.

O pH da urina manteve-se constante em todos os animais, tanto antes do tratamento, como durante o mesmo.

Tabela 1 – Análise da Urina com Fita Reagente (Multistix 10 SG)

	Antes do Tratamento n=16	Controle n=8	Diabético (STZ) n=8
Proteína (mg/dl)	34,69 ± 7,92	34,86* ± 7,72	49,17* ± 7,26
Glicose (mg/dl)	0	0	950 ± 190
pH	6,4	6,53	6,23

* significativo; $p < 0,01$

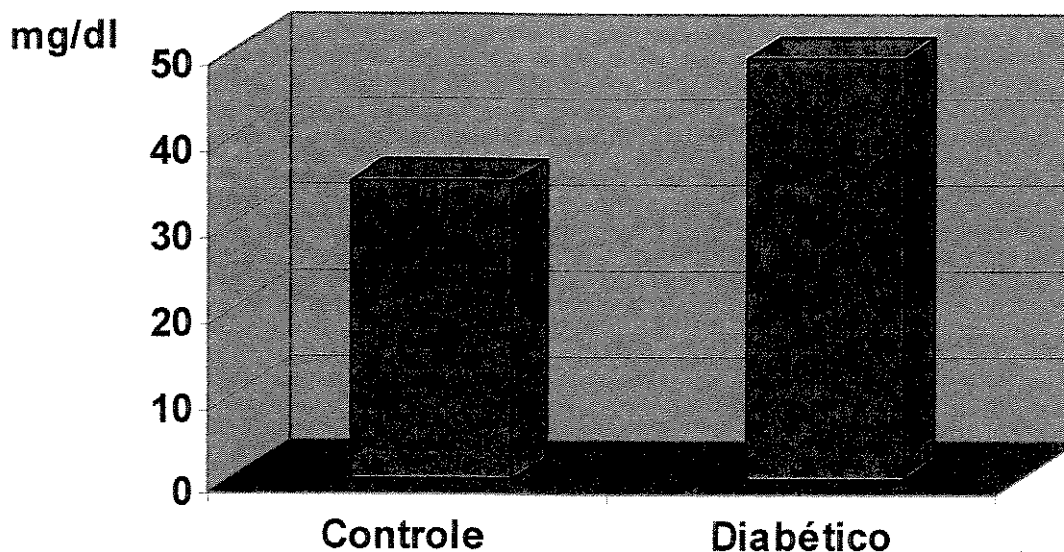
Os valores mostrados são a média de (n) animais

Proteína

Controle x Estreptozotocina : $p < 0,01$

Glicose

Controle x Estreptozotocina : $p < 0,01$



significativo; $p < 0,01$

Gráfico 1 – Taxa média de proteína em mg/dl, na urina de camundongos machos controle (n=8) e diabético (n=8).

4.2 - Análise de Peso

4.2.1 - Peso Corpóreo dos camundongos

O peso dos animais foi aferido durante o experimento e, como pode-se observar na tabela 2, os camundongos utilizados para a indução do diabetes apresentaram uma perda de peso significativa desde o início do tratamento. Por outro lado, os animais que receberam apenas tampão citrato, integrantes portanto do grupo controle, revelaram aumento significativo em seu peso médio.

Tabela 2 – Peso Corpóreo Médio (em g) dos Animais Durante o Experimento

	Controle n=8	Diabético (STZ) n=8
Peso inicial	23,39* $\pm$ 0,61	24,48* $\pm$ 0,65
Peso no sacrifício	27,20* $\pm$ 0	21,41* $\pm$ 1,88
Variação	3,81	- 3,07

* significativo; $p < 0,01$

Os valores mostrados são a média de (n) animais.

<u>Peso Inicial</u>	x	<u>Peso no Sacrifício</u>
Controle	x	Controle : $p < 0,01$
Estreptozotocina	x	Estreptozotocina : $p < 0,01$

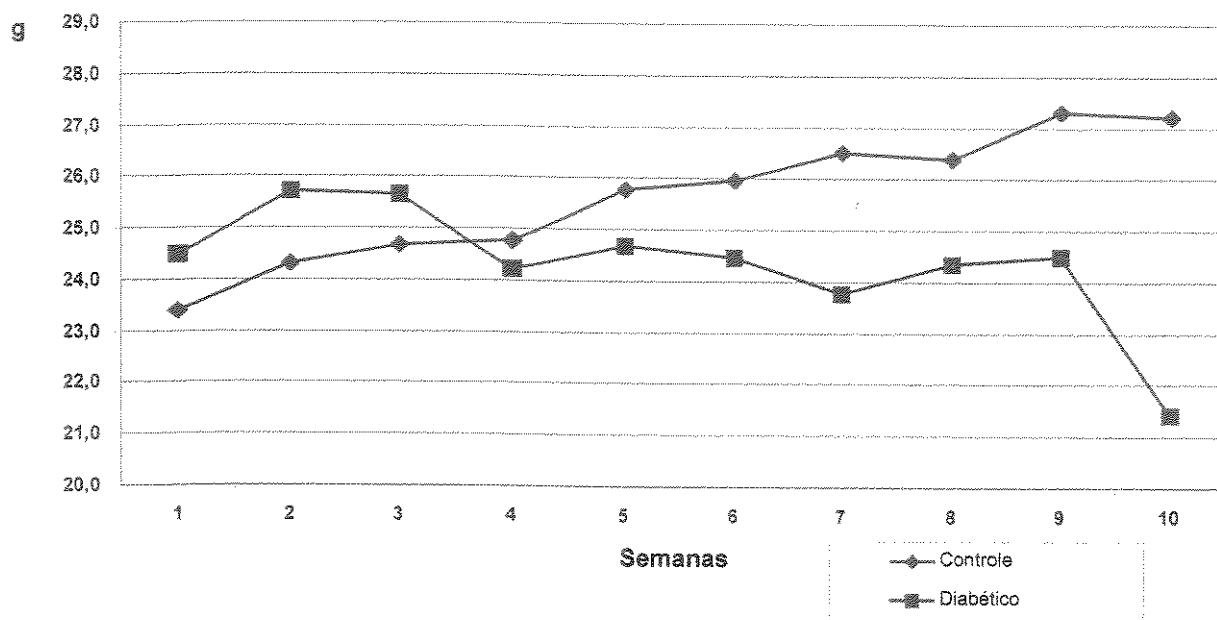


Gráfico 2 - Evolução do peso corpóreo médio (em g) de camundongos machos controle (n=8) e diabético (n=8).

4.2.2 - Peso dos órgãos dos camundongos

Os animais que foram submetidos à indução do diabetes pela estreptozotocina não só apresentaram perda de peso corpóreo durante o tratamento, como também apresentaram alterações significativas no peso e tamanho dos testículos e das glândulas supra-renais. Os testículos dos animais diabéticos pela estreptozotocina foram os mais atingidos, revelando uma redução média de peso da ordem de 15%. As glândulas supra-renais se mostraram de maneira contrária, pois apresentaram um aumento significativo de tamanho, e um acréscimo de peso da ordem de 23,75%. (Gráficos 3 e 4).

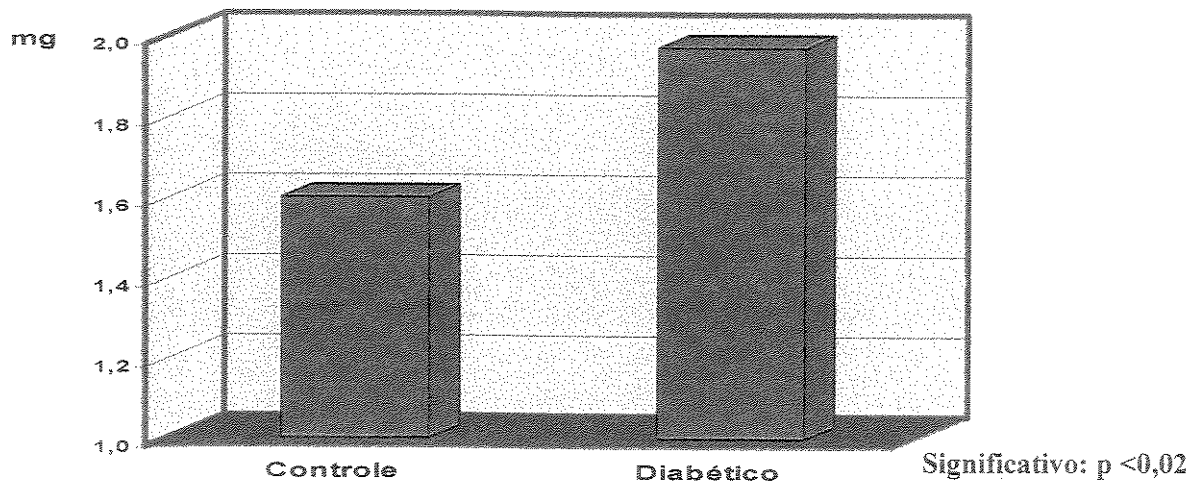


Gráfico 3 – Peso médio (mg) das glândulas supra-renais de camundongos machos controle (n=8) e diabético (n=8).

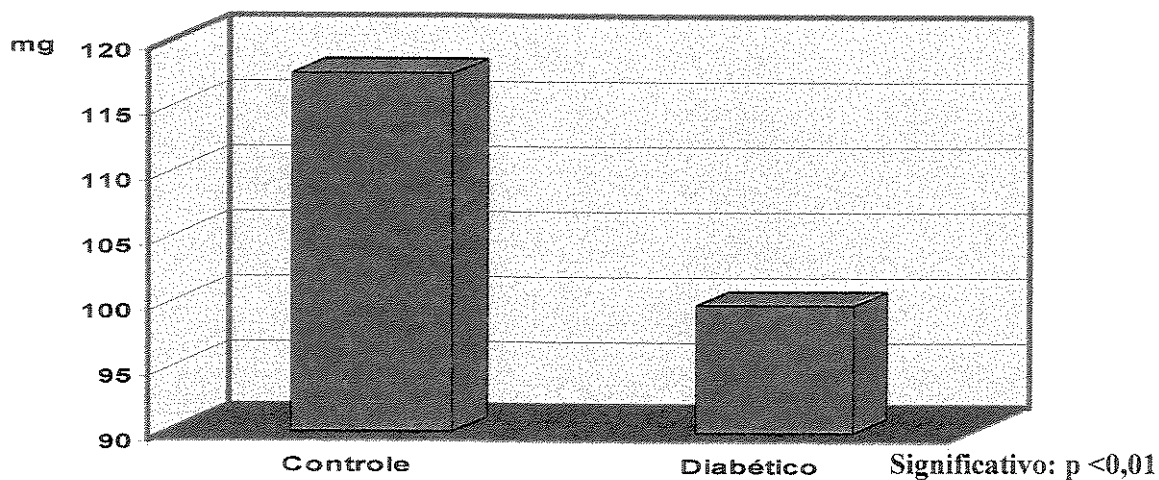


Gráfico 4 – Peso médio (mg) dos testículos de camundongos controle e diabético.

4.3 - Análise através da Microscopia de Luz

4.3.1 - *Das Glândulas Supra-Renais*

As glândulas supra-renais dos camundongos machos controle apresentaram-se revestidas por uma cápsula conjuntiva. A camada cortical era constituída de três zonas histológicas, designadas de acordo com a disposição das células secretoras: zona glomerulosa, adjacente à cápsula; zona fasciculada, a mais desenvolvida e intermediária; zona reticular, a mais interna e delgada. A camada medular apresentou suas células dispostas em cordões e sustentadas por uma delicada rede colágena, a qual continha canais venosos e capilares (Figs. 1 e 3).

Na zona glomerulosa, as células secretoras apresentaram-se pequenas e compactas, dispendo-se em forma de agregações ovóides irregulares ou arciformes, com núcleos alongados e citoplasma pouco acidófilo, contendo gotículas de lipídios (Fig. 5).

A zona fasciculada consistia de estreitos cordões de células secretoras, com espessura de apenas uma célula, entre os quais, observaram-se capilares. Suas células eram grandes e poliédricas, cujo citoplasma apresentou-se levemente basofílico e rico em gotículas de lipídios, podendo conferir, às células, uma aparência espumosa (Fig. 5).

A zona reticular é a mais interna do córtex, limítrofe da camada medular, e apresentou-se constituída de cordões irregulares, tornando-se assim, menos espessa, em relação às demais. Suas células apresentaram-se menores e de contornos irregulares, quando comparadas às células das outras zonas do córtex; apresentaram ainda um núcleo pequeno e arredondado, e citoplasma com pequena quantidade de gotículas de lipídios em seu interior (Fig. 7).

A camada medular era composta de grupos de células secretoras, intimamente ligadas, as quais apresentaram formato poliédrico, com grandes núcleos e citoplasma

fortemente basofílico, no qual observou-se a presença de muitos grânulos. Suas células formam uma densa rede, contendo capilares e vênulas em suas malhas (Fig. 7).

Na análise dos órgãos dos animais tratados com estreptozotocina, observou-se que a camada cortical das glândulas supra-renais era ligeiramente aumentada (Figs. 2 e 4).

Na zona glomerulosa dos animais diabéticos, as células secretoras apresentaram-se também pequenas e compactas, com a mesma disposição e forma daquelas dos animais controles; o mesmo ocorreu com as células da zona reticular, ou seja, formando cordões irregulares e apresentando células menores, tornando-se assim, uma camada menos espessa, em relação às demais (Fig. 6).

Na zona fasciculada, as células apresentaram-se organizadas em cordões, mantendo seus núcleos arredondados e mostrando um ligeiro aumento do volume citoplasmático, porém, tendo um aspecto histológico aparentemente normal, quando comparadas às células dos controles (Fig.6).

Na camada medular das glândulas supra-renais dos animais diabéticos, as células apresentaram-se na forma poliédrica, dispostas em cordões irregulares, cujos núcleos mostraram-se grandes e os citoplasmas repletos de grânulos. Tais células formam uma densa malha, abrigando capilares e vênulas, com aspectos histológicos normais, quando comparados aos animais controles (Fig. 8).

4.3.2 - Dos Testículos

Nos testículos dos animais controles observou-se que os túbulos seminíferos eram altamente contorcidos, sendo vistos cortes transversais, oblíquos e longitudinais. O epitélio germinal apresentou vários estágios da espermatogênese e espermiogênese, sincronizados pelas ondas de atividades sequenciais ao longo da extensão de cada túbulo. Nos espaços intersticiais observou-se a presença das células endócrinas, denominadas Células de Leydig, fixadas no tecido de sustentação (Fig. 9).

As espermatogônias apresentaram-se na camada basal do epitélio seminífero, possuindo um grande núcleo arredondado, com cromatina condensada ou dispersa. Pôde-se observar os espermatócitos primários e as espermátides, cuja maturação (processo de espermiogênese) as transformariam nos espermatozóides (Fig. 11).

Observou-se que as células da série espermatogênica eram sustentadas pelas células de Sertoli, nas quais foram vistos que os núcleos possuíam uma forma predominantemente piramidal e estavam próximos à membrana da região basal, sendo entremeadas com as espermatogônias. Observou-se ainda que existe um único nucléolo, bem centralizado, nos núcleos das células de Sertoli (Fig. 11).

Nos animais diabéticos, observou-se uma ligeira redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e uma diferença pequena na quantidade de células germinativas, de alguns dos túbulos observados. As células de Leydig apresentaram-se agrupadas nos espaços intersticiais. Alterações celulares significativas não foram observadas (Figs. 10 e 12).

4.4 - Análise Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão

4.4.1 - Das Glândulas Supra-Renais

Na zona glomerulosa das glândulas supra-renais (GSR) dos camundongos machos controle, as células secretoras apresentaram-se definidas, com núcleos de forma alongada, mais de um nucléolo e membranas evidentes. Os citoplasmas mostraram-se, em sua maioria, repletos de mitocôndrias ligeiramente ovais, apresentando cristas tubulares e membranas externas definidas. As gotículas de lipídios apresentaram-se dispersas no citoplasma das células e de tamanhos variados. Observaram-se capilares fenestrados entre as agregações celulares (Fig. 13).

Em maior aumento, as células desta região, apresentaram várias gotículas de lipídios em diversos tamanhos, as quais estavam envoltas por retículo endoplasmático

liso de forma tubular e mitocôndrias com cristas tubulares e membranas externas bem delimitadas (Fig. 15).

Na zona fasciculada das GSR dos camundongos controle, as células apresentaram-se em forma de cordões, onde os citoplasmas eram abundantes e repletos de gotículas de lipídios de vários tamanhos, e as mitocôndrias bem evidentes e espalhadas aleatoriamente. Nos espaços intercelulares podiam-se observar interdigitações entre células vizinhas. Nas células observou-se núcleo arredondado, caracterizado por mais de um nucléolo proeminente (Fig. 17).

Em maior aumento, as células secretoras, da mesma zona, apresentaram-se separadas por tecido de sustentação e capilares. Pôde-se observar o núcleo com mais de um nucléolo e a heterocromatina agrupou-se ao redor da periferia do núcleo, caracterizando-se por áreas elétron-densas, sendo o material nuclear não elétron-denso, a eucromatina. Os citoplasmas apresentaram grande quantidade de gotículas de lipídios em vários tamanhos. As mitocôndrias mostraram cristas tubulares e membranas externas bem delimitadas e preservadas (Fig. 19).

Considerando ainda as GSR de camundongos machos controle, observou-se a boa caracterização da zona reticular (a mais interna do córtex) na qual as células agruparam-se de maneira irregular e em tamanhos reduzidos, quando comparadas àquelas da zona fasciculada. Os citoplasmas mostraram-se com poucas gotículas de lipídios elétron-densos e grande quantidade de mitocôndrias proeminentes e espalhadas ao acaso, com membrana externa bem preservada e cristas internas de forma tubular. Os núcleos apresentaram-se com formato irregular, e mais de um nucléolo. Observou-se também a presença constante de vasos sanguíneos fenestrados entre as células dessa zona (Fig. 21).

Na zona medular das GSR dos camundongos machos controle, as células apresentaram-se intimamente ligadas, com núcleos grandes e arredondados, características importantes desta região. Os citoplasmas apresentaram-se grandes e repletos de grânulos, com pequena quantidade de mitocôndrias (Fig. 23).

Nas mesmas células, em maior aumento, foram observadas as membranas nucleares preservadas e nucléolos bem definidos. Os citoplasmas mostraram-se repletos de grânulos e mitocôndrias, com membrana externa e cristas tubulares bem definidas, sendo evidentes, em algumas áreas, os retículos endoplasmáticos lisos. O aparelho de Golgi também fez-se presente próximo ao núcleo, onde observaram-se brotamentos das cisternas (Fig. 25).

Nas glândulas supra-renais de camundongos machos tratados com estreptozotocina, as células da zona glomerulosa apresentaram núcleos arredondados e grandes, com mais de um nucléolo. Os citoplasmas mostraram-se ricos em mitocôndrias e também em gotículas de lipídios, as quais estão espalhadas de maneira aleatória. Capilares fenestrados entre as agregações celulares também foram observados (Fig. 14).

Em maior aumento, as mitocôndrias das células da zona glomerulosa apresentaram o padrão das cristas de forma tubular e membrana externa preservada. Os núcleos arredondados apresentaram invaginações em sua membrana, nucléolo proeminente e grande quantidade de heterocromatina, agregadas na face interna da membrana nuclear e eucromatina difusa no interior do núcleo. O aparelho de Golgi fez-se presente de modo bem desenvolvido, circundando a mitocôndria, não havendo portanto, alterações aparentes, em comparação aos controles (Fig. 16).

Na zona fasciculada das GSR dos animais diabéticos, as células apresentaram-se na forma de cordões e ligeiramente maiores do que aquelas apresentadas nos controles. Numerosas gotículas de lipídios e de mitocôndrias puderam ser vistas espalhadas de forma aleatória pelo citoplasma celular. Núcleos grandes e arredondados, caracterizados por mais de um nucléolo e corpos de cromatina, localizavam-se no centro do citoplasma das células. Os capilares fenestrados também foram vistos entre as células (Fig. 18). Num maior aumento foram observadas invaginações das membranas celulares (Fig. 20).

As células da zona reticular, em camundongos tratados com STZ, apresentaram-se de maneira irregular quando comparadas àquelas da camada adjacente (a zona fasciculada). Seus núcleos apresentaram-se grandes e irregulares, com a presença de mais de um nucléolo e cromatina densa adjacente à face interna da membrana nuclear, podendo-se observar ainda eucromatina difusa. Grande quantidade de mitocôndrias com membranas externas e cristas tubulares bem caracterizadas, foram vistas nas células. Perfis de retículo endoplasmático liso e algumas estruturas elétron-densas estavam presentes. Observaram-se também capilares fenestrados entre os agrupamentos celulares (Fig. 22).

Nos camundongos machos tratados com STZ, a zona medular das GSR apresentou grupos de células com núcleos grandes e arredondados. Os citoplasmas repletos de grânulos elétron-densos e com quantidade reduzida de mitocôndrias próximo ao núcleo, foram vistos. Foram observados também o aparelho de Golgi e perfis de retículo endoplasmático liso ao redor do núcleo (Fig. 24).

As células da zona medular das GSR dos camundongos diabéticos (Fig. 26), apresentaram grânulos e mitocôndrias evidentes, espalhadas ao acaso, nos citoplasmas. Os aparelhos de Golgi mostraram certa dilatação em suas cisternas. Observaram-se os perfis de retículo endoplasmático rugoso concentrados de um lado do núcleo e os retículos endoplasmáticos liso espalhados pelo citoplasma. Observaram-se que os núcleos eram arredondados, porém de tamanho menor que os dos controles, apresentando também nucléolos proeminentes e membrana nuclear bem definida.

4.4.2 - Dos Testículos

Nos testículos dos camundongos controle, devidamente processados para a microscopia eletrônica de transmissão, foram observados em cortes transversais, túbulos seminíferos ativos. Foram observadas espermatogônias localizadas sobre a membrana da região basal, nas quais destacaram-se seus grandes núcleos com

nucléolos proeminentes e corpos de cromatina. As células mióides apresentaram-se sob a mesma membrana, em forma delgada. Os espermatócitos primários e as espermatídes foram observadas, sendo que no citoplasma das espermatídes foi visto o aparelho de Golgi e vesículas acrossômicas (Fig. 27).

Em maior aumento (Fig. 29), observaram-se as células de Sertoli, as quais localizavam-se adjacentes à membrana da região basal, apresentando núcleo piramidal e citoplasma abundante e irregular. Os corpos de cromatina densos apresentaram-se associados ao nucléolo, cuja forma oval foi observada. As invaginações da membrana nuclear puderam ser vistas com facilidade. Um número moderado de mitocôndrias foi observado nas células do testículo.

Células de Leydig foram estudadas, sendo observados núcleos irregulares. Os nucléolos apresentaram-se proeminentes e próximos à membrana nuclear (Fig. 31). Adjacentes à essa membrana, observaram-se corpos de cromatina densos (Fig. 33).

Em maior aumento, nos citoplasmas das células de Leydig aparecem gotículas de lipídios semelhantes às células secretoras de esteróides do córtex da glândula supra-renal, espalhadas e circundadas por retículo endoplasmático liso. Estas células apresentaram citoplasmas repletos de mitocôndrias, onde a membrana externa e cristas tubulares internas estavam preservadas (Fig. 33).

Na análise dos testículos dos camundongos tratados com STZ, observaram-se vários túbulos seminíferos ativos em cortes transversais. As espermatogônias eram aparentes e não apresentaram alterações morfológicas. Notou-se a presença de células mióides. Os espermatócitos primários, em contato com as células germinativas, e as espermatídes foram examinadas, não sendo constatadas quaisquer alterações celulares, quando comparados com os animais controle (Figs. 28 e 30).

As células de Leydig, apresentaram núcleos de forma irregular, cromatina dispersa e nucléolo na periferia, porém não foram observadas alterações ultra-estruturais (Fig. 32), contudo observou-se, em maior aumento, um ligeiro acréscimo

dos perfis de retículo endoplasmático liso, que circundavam as gotículas de lipídios (Fig. 34).

4.5 - Análise Morfométrica

4.5.1 - Das Glândulas Supra-Renais

Através da análise morfométrica dessas glândulas, de camundongos controle e diabéticos por STZ, observaram-se alterações nas dimensões de suas regiões cortical e medular. Os córtex das glândulas dos camundongos diabéticos apresentaram um acréscimo da ordem de 14,34% ($p < 0,05$), em relação às glândulas dos animais controles, enquanto que a região medular aumentou 6,58%, aumento este que não é significativo ($p > 0,05$) (Tabela 3 e Gráfico 5).

Tabela 3 – Área Média (mm^2) das Regiões da Glândula Supra-Renal

	Controle n=4	Diabético (STZ) n=4
Córtex	0,46350* $\pm$ 0,049	0,53000* $\pm$ 0,032
Medula	0,14050 $\pm$ 0,030	0,14975 $\pm$ 0,029

* significativo; $p < 0,05$

Para cada animal (n) foram analisados 10 cortes aleatórios, sendo a média geral apresentada acima.

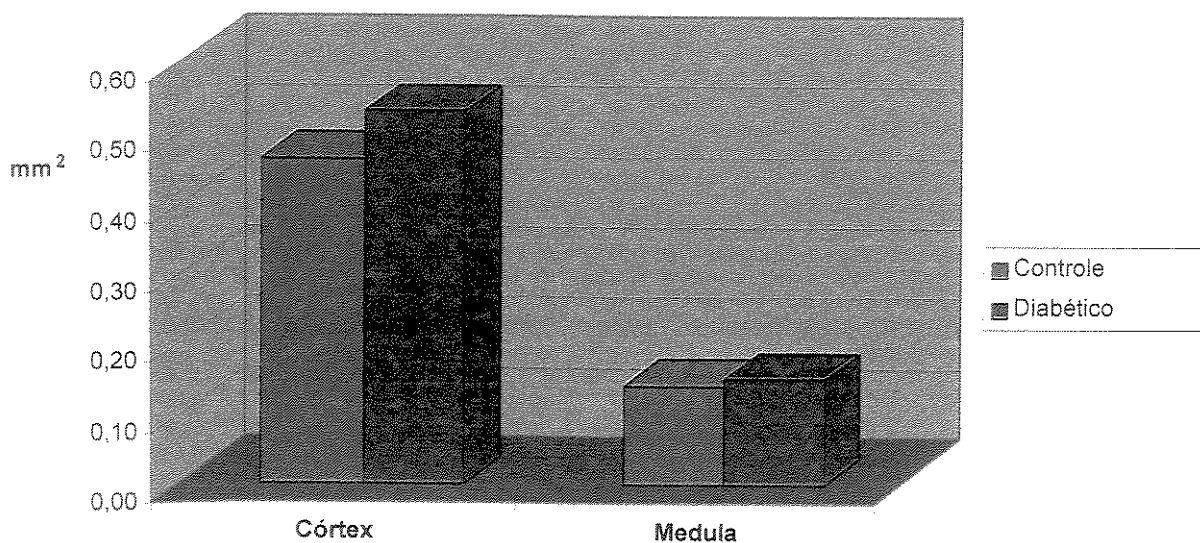


Gráfico 5 – Área Média (mm²) das Regiões da Glândula Supra-Renal

A partir desses resultados, realizaram-se estudos da fração de volume dessas regiões, cujos dados são mostrados na Tabela 4 e Gráfico 6.

Tabela 4 – Fração de Volume do Córtex e da Medula da Glândula Supra-Renal

	Controle n=4	Diabético (STZ) n=4
Córtex	76,74%	77,97%
Medula	23,26%	22,03%

Os valores mostrados são a média de (n) animais.

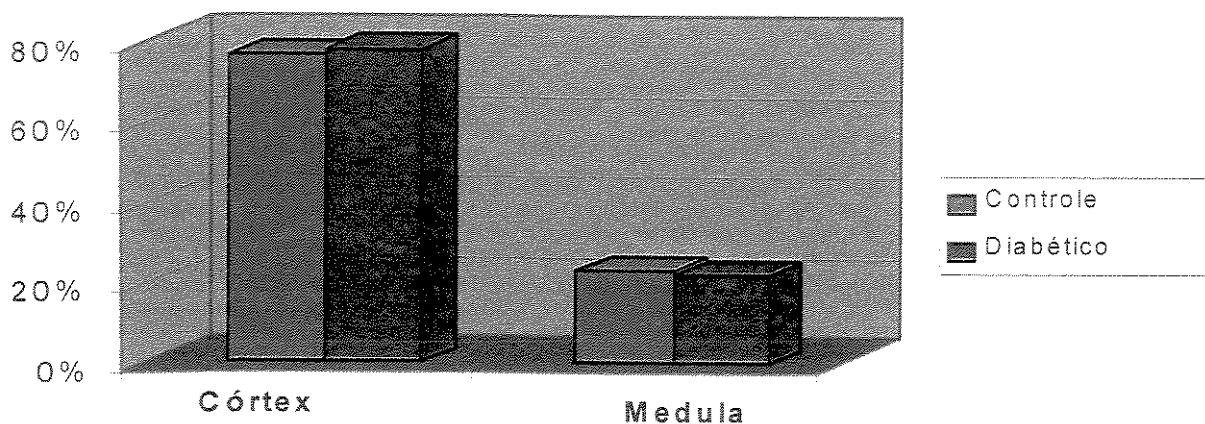


Gráfico 6 – Fração de Volume (em porcentagem) do Córtex e da Medula da Glândula Supra-Renal de camundongos controle e diabético.

Considerando o aumento observado do córtex, foram realizadas quantificações morfométricas de suas zonas, através do Sistema-teste Ciclóides, envolvendo a estereologia. Observou-se (ver gráfico 7) que o aumento da densidade de volume da zona fasciculada foi significativo ($p < 0,01$), provocando desta maneira uma ligeira diminuição nas outras duas.

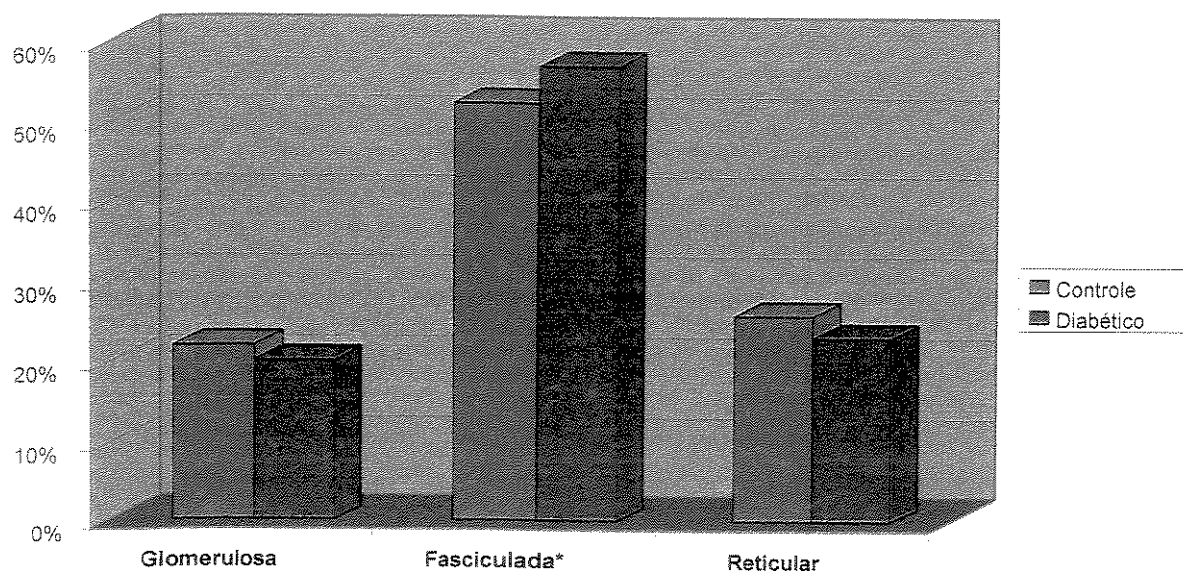


Gráfico 7 - Densidade de Volume do Córtex na Glândula Supra-renal

A densidade de superfície mostrou-se alterada, ao se considerar as três zonas do córtex. Entretanto esse aumento não foi significativo ($p > 0,05$), sugerindo que as células das zonas não aumentaram significativamente de tamanho, ou seja, o número das células da zona fasciculada possivelmente sofreu um aumento significativo. O aumento do número das células das outras zonas do córtex, não foi significativo. Esses resultados estão apresentados no gráfico 8.

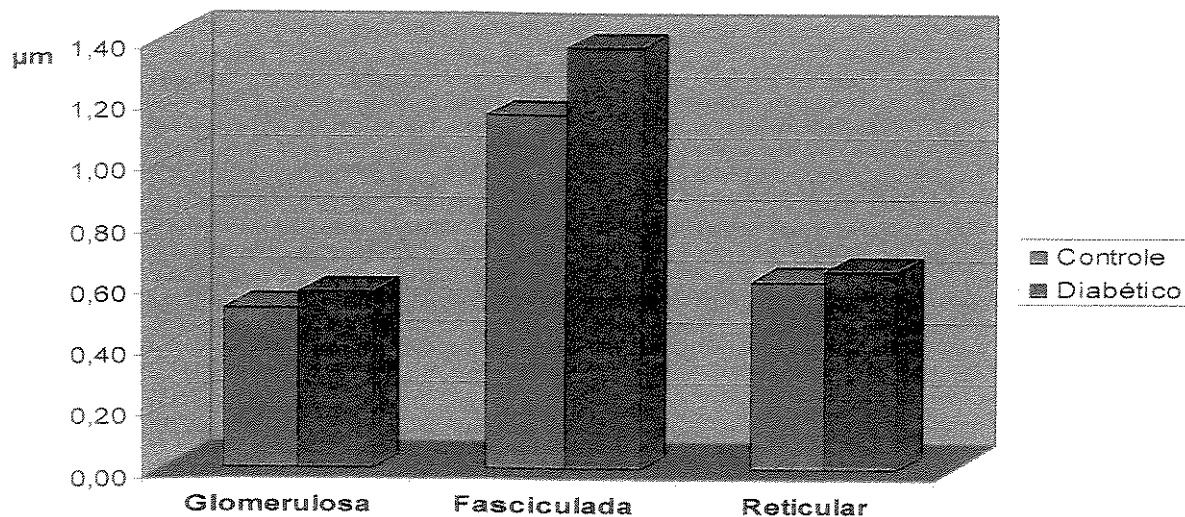


Gráfico 8 - Densidade de Superfície no Córtex da Glândula Supra-renal

4.5.2 - Dos Testículos

Tendo em vista a significativa diminuição dos testículos dos animais diabéticos, em comparação com os dos controles (Gráfico 4), analisou-se morfometricamente o diâmetro médio dos túbulos seminíferos. Os estudos estatísticos comprovaram que ocorreu uma diminuição média significativa ($p < 0,01$) dos referidos diâmetros, conforme mostra o Gráfico 9.

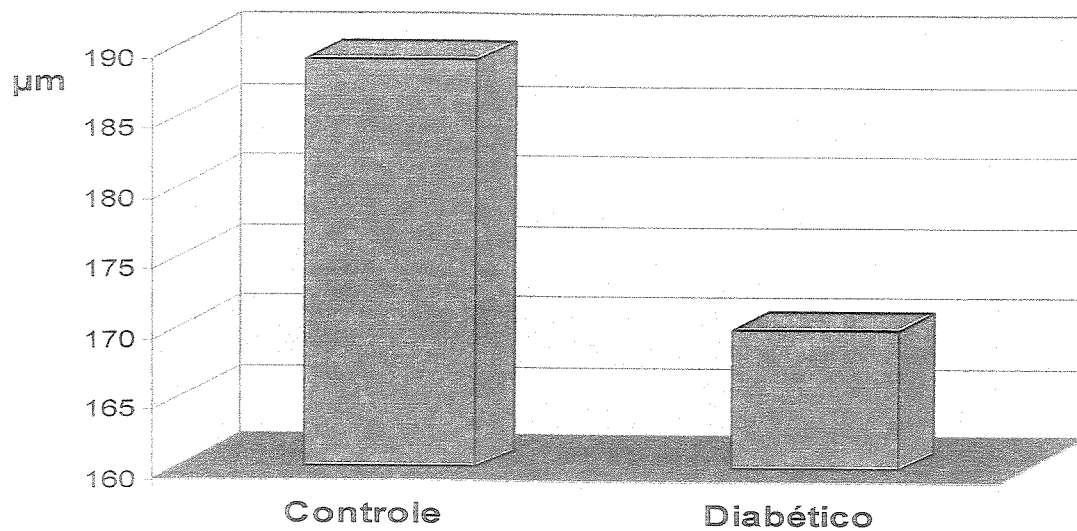


Gráfico 9 - Diâmetro Médio dos Túbulos Seminíferos

4.6 - Documentação Fotográfica

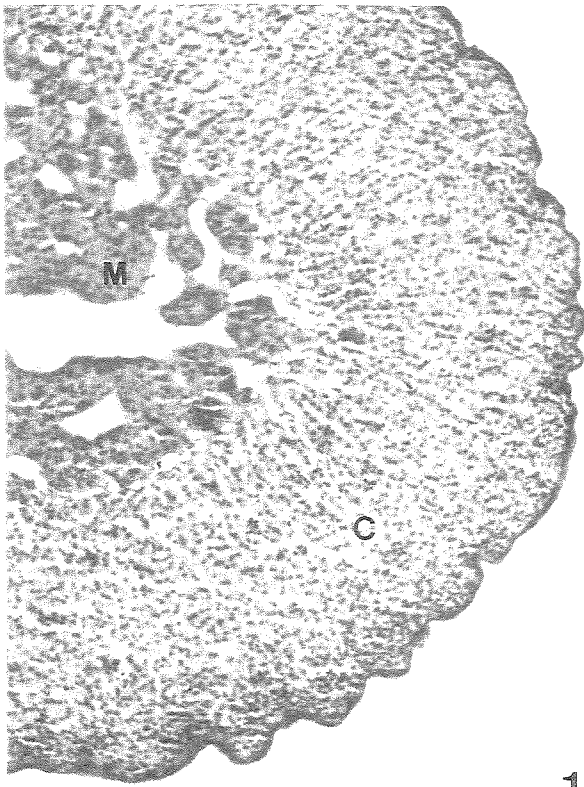
4.6.1 - Fotomicrografias

Fig. 1 – Glândula supra-renal (GSR) de camundongo controle. Numa visão panorâmica, observa-se a glândula dividida em Córtex (C) e Medula (M). Tricrômico de Mallory. 144X

Fig. 2 – GSR de camundongo tratado com estreptozotocina (STZ). Visão panorâmica da glândula dividida nas regiões cortical (C) e medular (M). Tricrômico de Mallory. 144X

Fig. 3 – GSR de camundongo controle. Revestida por uma cápsula (seta), a região cortical consiste de três zonas: Glomerulosa (ZG), Fasciculada (ZF) e Reticular (ZR). Região Medular (M). H & E. 288X

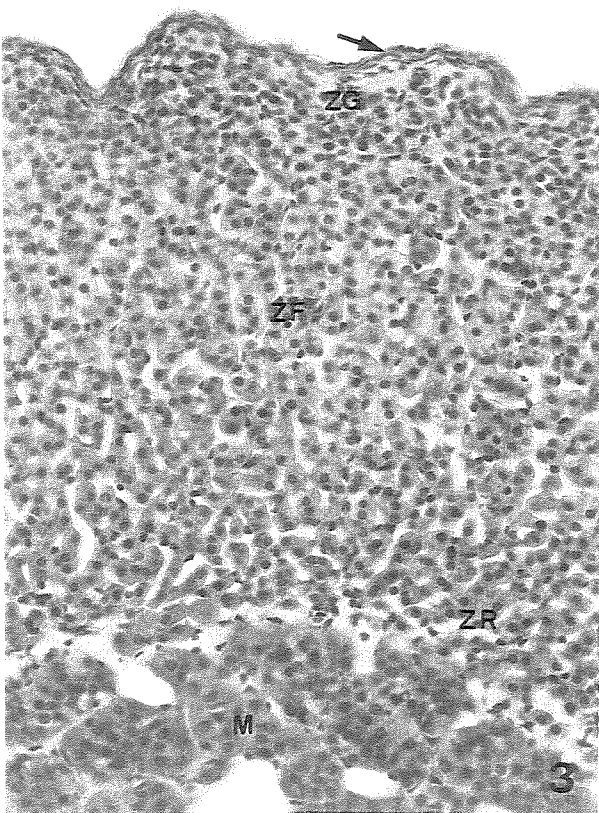
Fig. 4 – GSR de camundongo tratado com STZ. Cápsula (seta) envolvendo toda glândula. Região cortical dividida nas zonas: Glomerulosa (ZG), Fasciculada (ZF) e Reticular (ZR). Região Medular (M). H & E. 288X



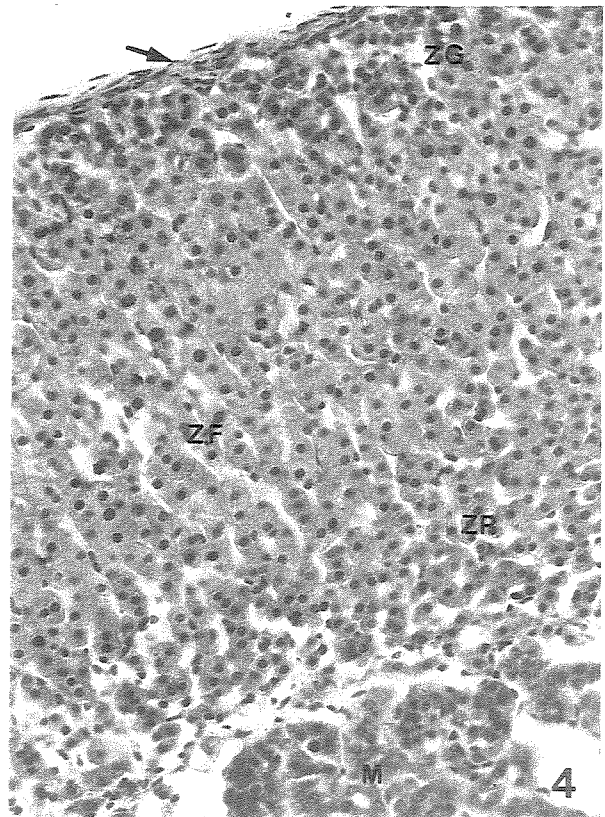
1



2



3



4

Fig. 5 – GSR de camundongo controle. Zona Glomerulosa apresentando células pequenas e compactas com núcleo (cabeça de seta) alongado. Zona Fasciculada, com células de forma poliédrica, organizadas em cordões. Núcleo arredondado (N). Capilares sanguíneos (seta grossa). H & E. 576 X

Fig. 6 – GSR de camundongo tratado com STZ. Zona Glomerulosa, cujas células estão dispostas em aglomerações ovóides. Núcleo (cabeça de seta) alongado e pouco citoplasma. Zona Fasciculada com células de núcleos (N) arredondados e um ligeiro aumento no citoplasma. Capilares sanguíneos (seta grossa). H & E. 576X

Fig. 7 – GSR de camundongo controle. Zona Reticular. Células agrupadas em cordões irregulares e menores que as da Zona Fasciculada. Núcleo (cabeça de seta) pequeno e arredondado. Citoplasma eosinofílico. Região Medular (M), células poliédricas com grandes núcleos (seta fina) e citoplasma granular. Canais venosos (V). Tricrômico de Mallory. 576X

Fig. 8 – GSR de camundongo tratado com STZ. Zona Reticular. Suas células são menores que a da Zona Fasciculada. Núcleo (cabeça de seta) e citoplasma eosinofílico. Região Medular (M), citoplasma basofílico contrastando com as células da Zona Reticular. Canais venosos (V). Tricrômico de Mallory. 576X

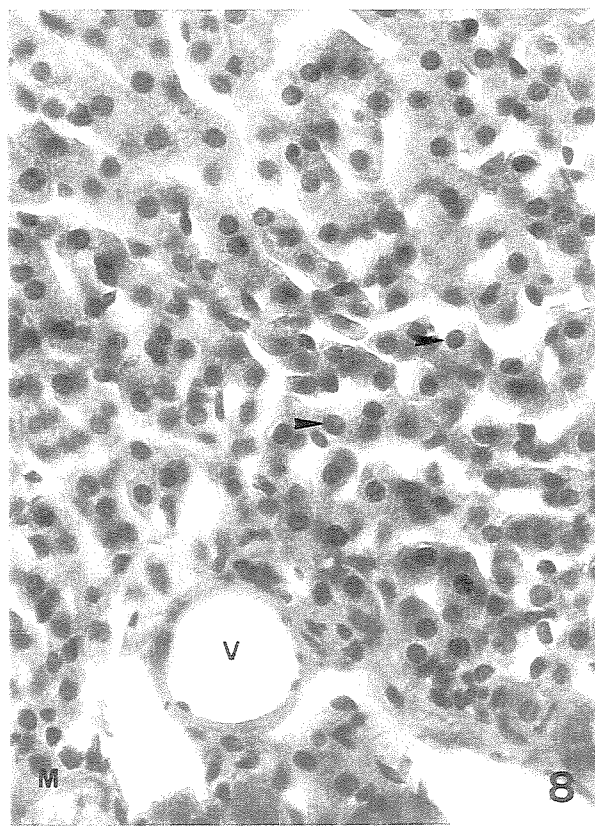
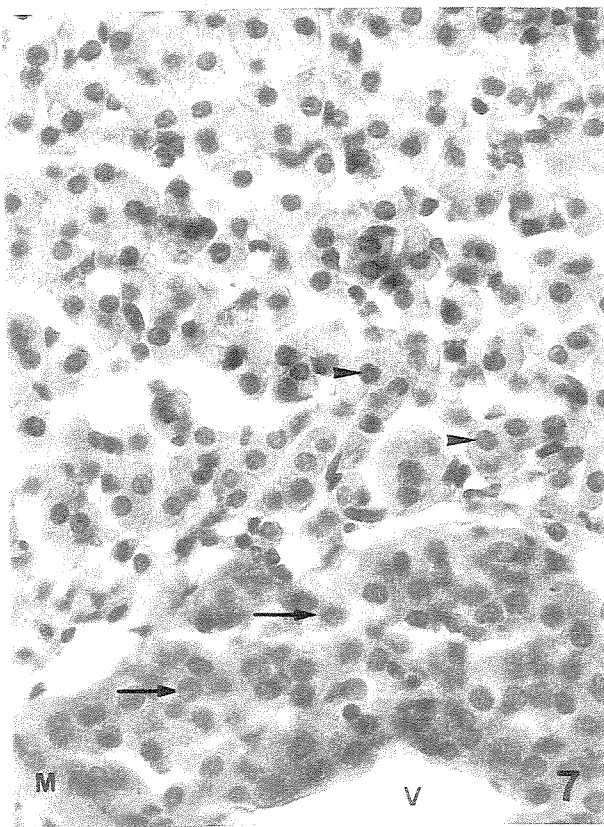
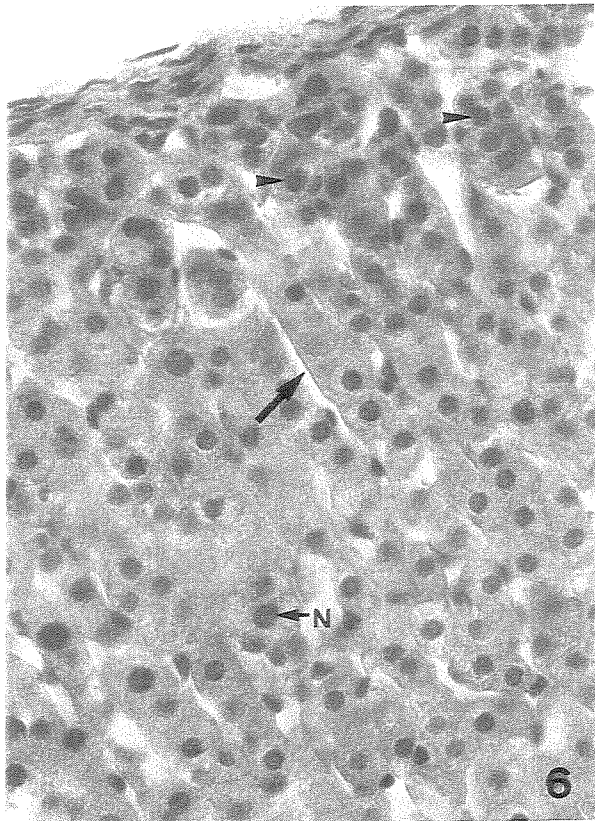
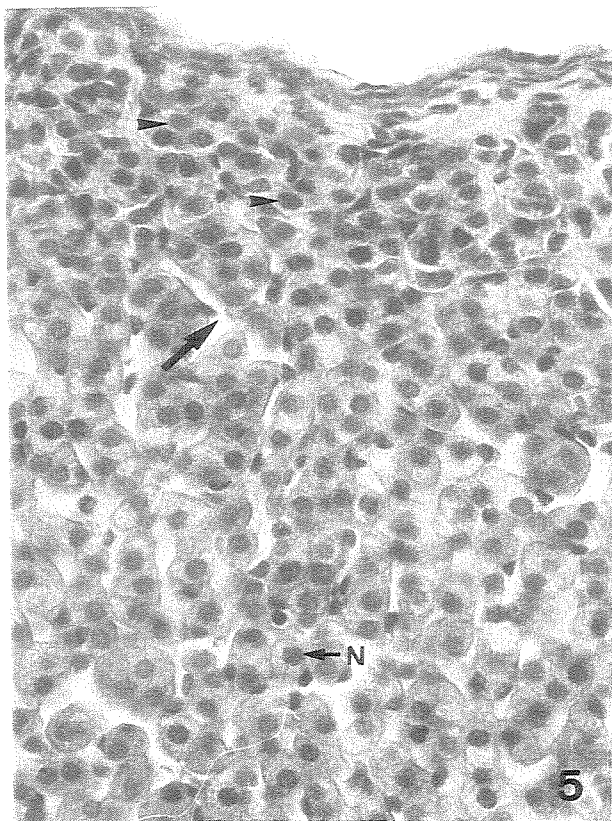
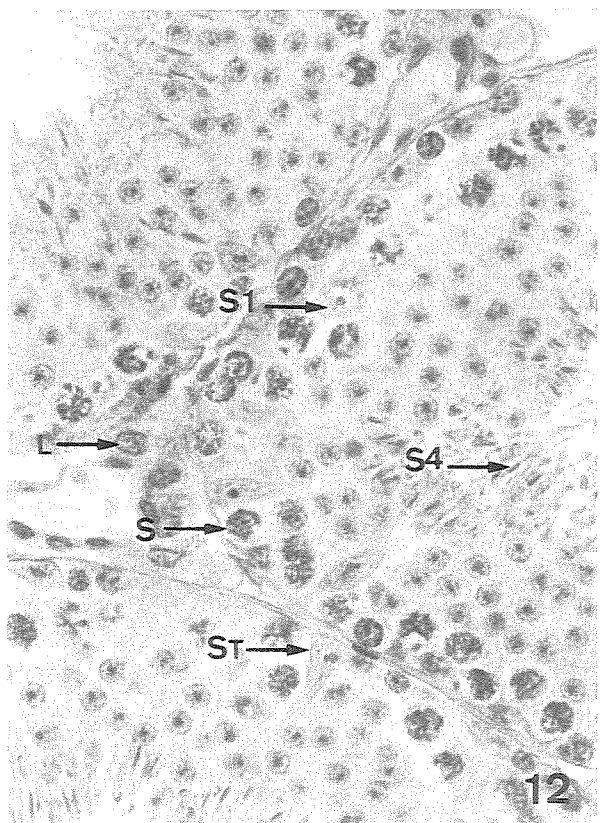
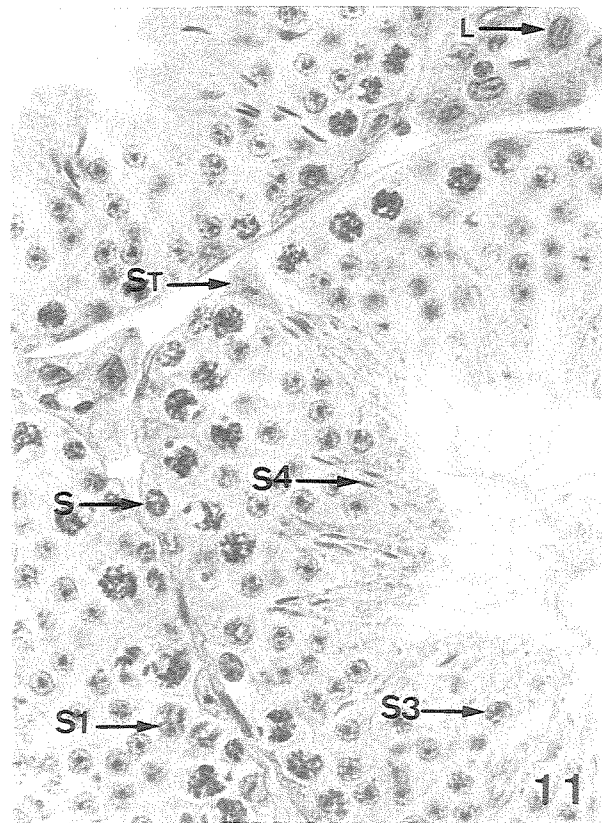
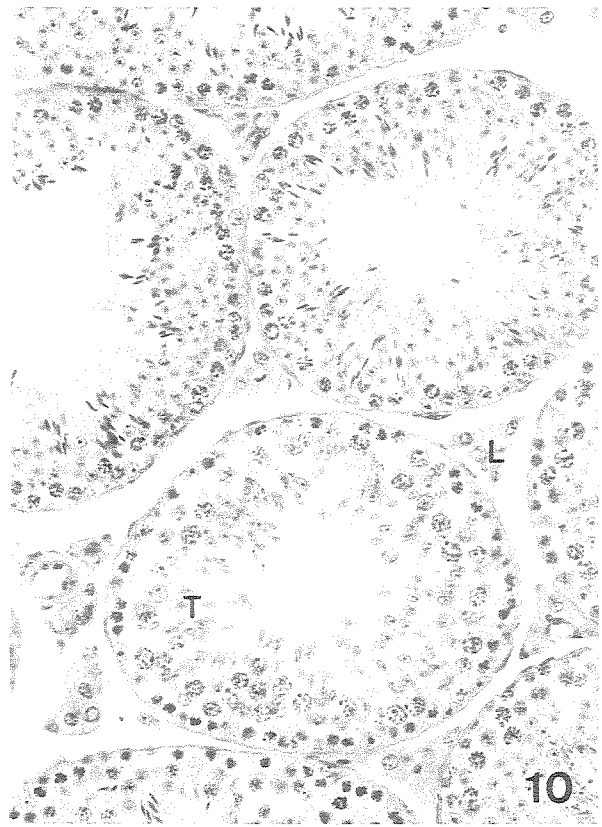
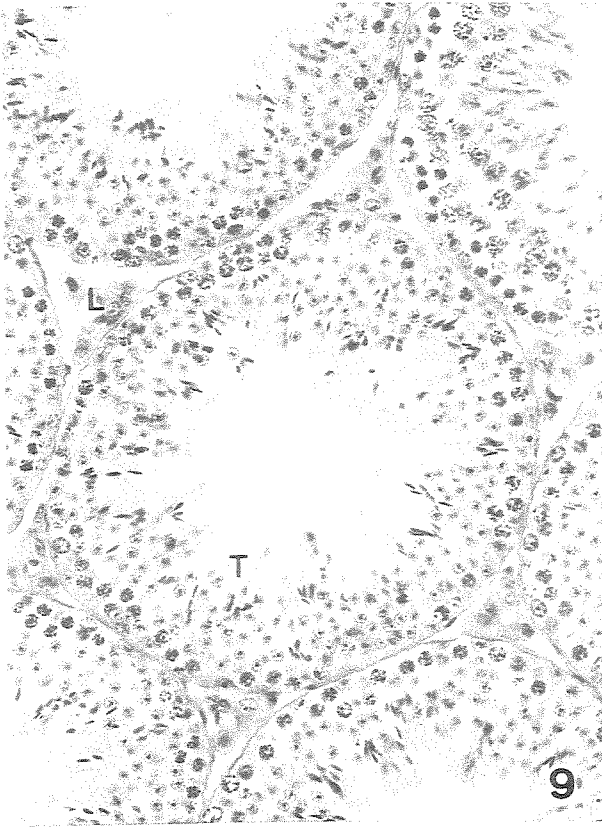


Fig. 9 – Testículo de camundongo controle. Observa-se túbulos seminíferos (T) ativos em corte transversal. Células em vários estágios da série espermatogênica. Nos espaços intersticiais, encontra-se as Células de Leydig (L). Tricrômico de Mallory. 288X

Fig. 10 – Testículo de camundongo tratado com STZ. Túbulos seminíferos (T) ativos em corte transversal. Células da série espermatogênica em vários estágios. Células de Leydig (L) são vistas nos espaços intersticiais. Tricrômico de Mallory. 288X

Fig. 11 – Testículo de camundongo controle. Espermatogônias (S). Espermatócitos primários (S1). Espermatídes (S3). Espermatozóides (S4) assumem a forma puntiforme. Observa-se Células de Sertoli (ST) com núcleo piramidal. Células de Leydig (L) apresentam-se agrupadas no espaço intersticial. H & E. 576X

Fig. 12 – Testículo de camundongo tratado com STZ. Espermatócitos primários (S1). Espermatozóides (S4). Células de Sertoli (ST) com núcleo perpendicular a membrana do túbulo seminífero, as quais são vistas entre as espermatogônias (S). Células de Leydig (L) localizadas no espaço intersticial. H & E. 576X



4.6.2 - Eletromicrografias

Fig. 13 – Glândula Supra-renal (GSR) de camundongo controle. Zona Glomerulosa. Grande quantidade de mitocôndrias (cabeça de seta) de forma ligeiramente ovais e espalhadas por todo o citoplasma. Gotículas de lipídios (T). Núcleo (N). Presença de capilar fenestrado (CF). 6.400X

Fig. 14 – GSR de camundongo tratado com estreptozotocina (STZ). Zona Glomerulosa. As mitocôndrias (cabeça de seta) apresentam-se espalhadas pelo citoplasma. Estruturas eletrôn-densas (seta) próximas ao núcleo. Gotículas de lipídios (T). Núcleo (N). Capilar fenestrado (CF). 6.400X

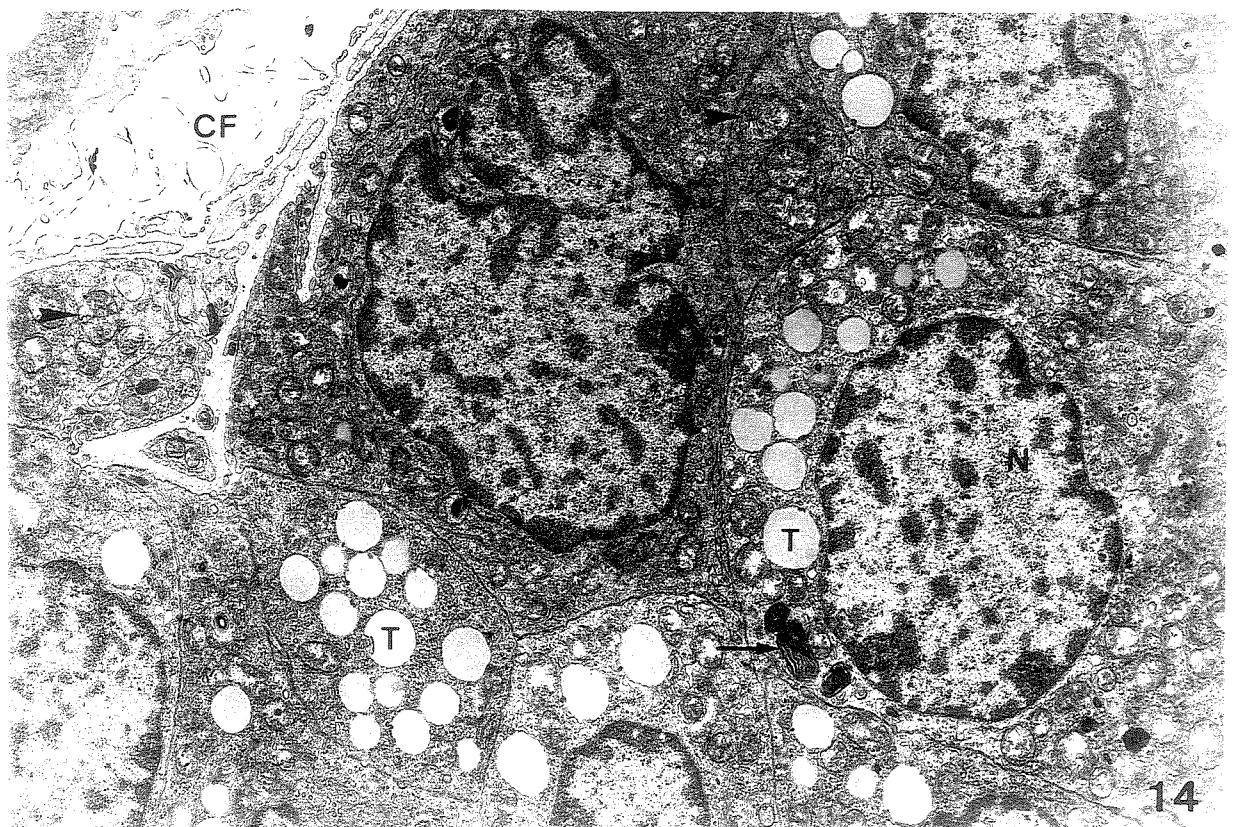
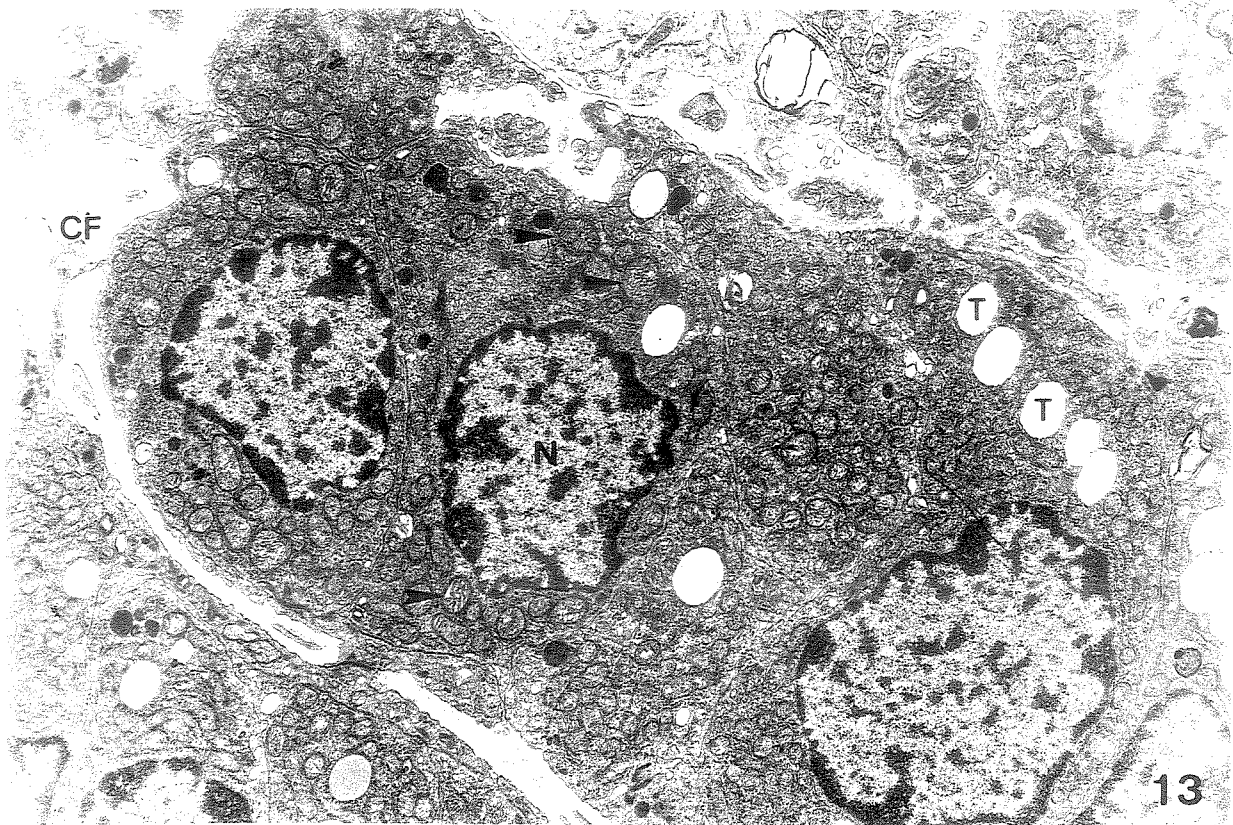


Fig. 15 – GSR de camundongo controle em maior aumento. Zona Glomerulosa. Gotículas de lipídios (T) e perfís de retículo endoplasmático liso (REL) espalhados por todo o citoplasma. Mitocôndrias (M), com cristas tubulares bem definidas. Núcleos (N) caracterizados por mais de um nucléolo (Nu). 23.000X

Fig. 16 – GSR de camundongo tratado com STZ. Zona Glomerulosa em maior aumento. Gotículas de lipídios (T). Presença de perfís de retículo endoplasmático liso (REL). Aparelho de Golgi (G). Numerosas mitocôndrias (M) com cristas tubulares bem evidentes. Núcleo (N). 23.000X

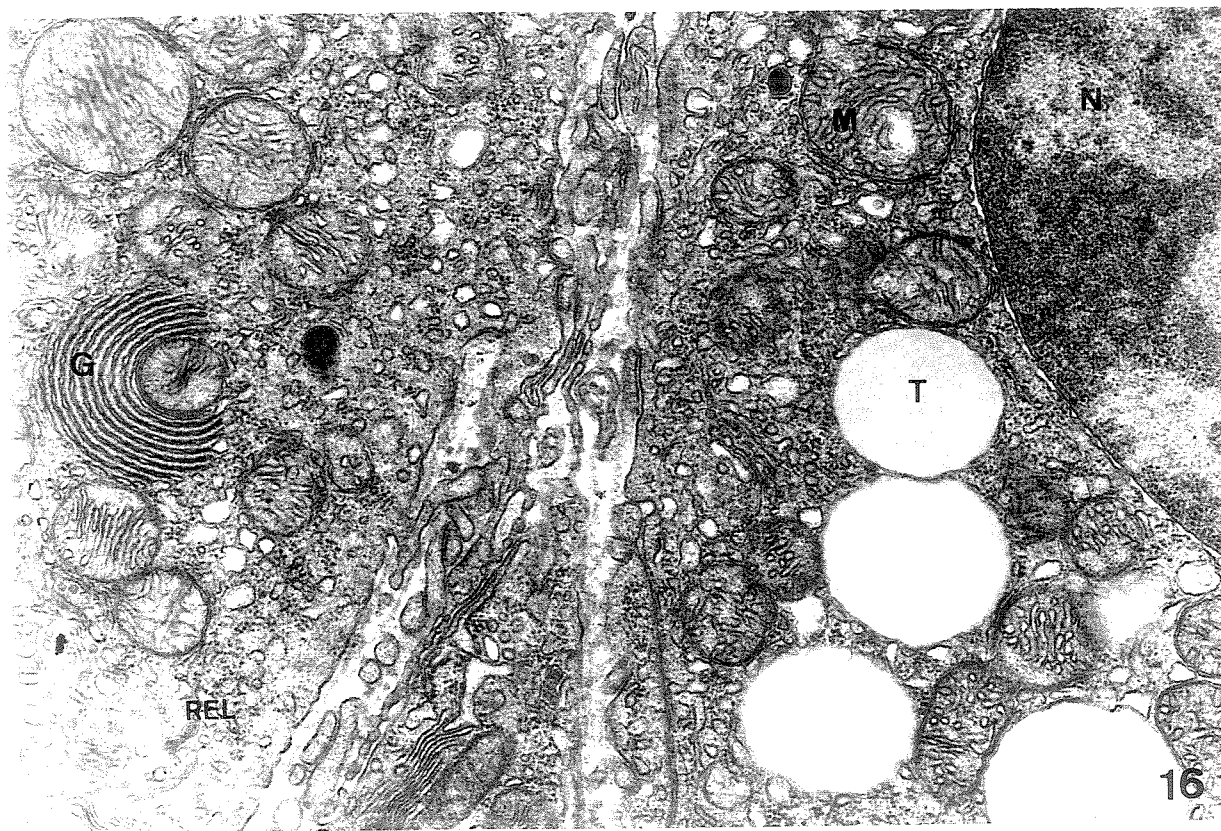
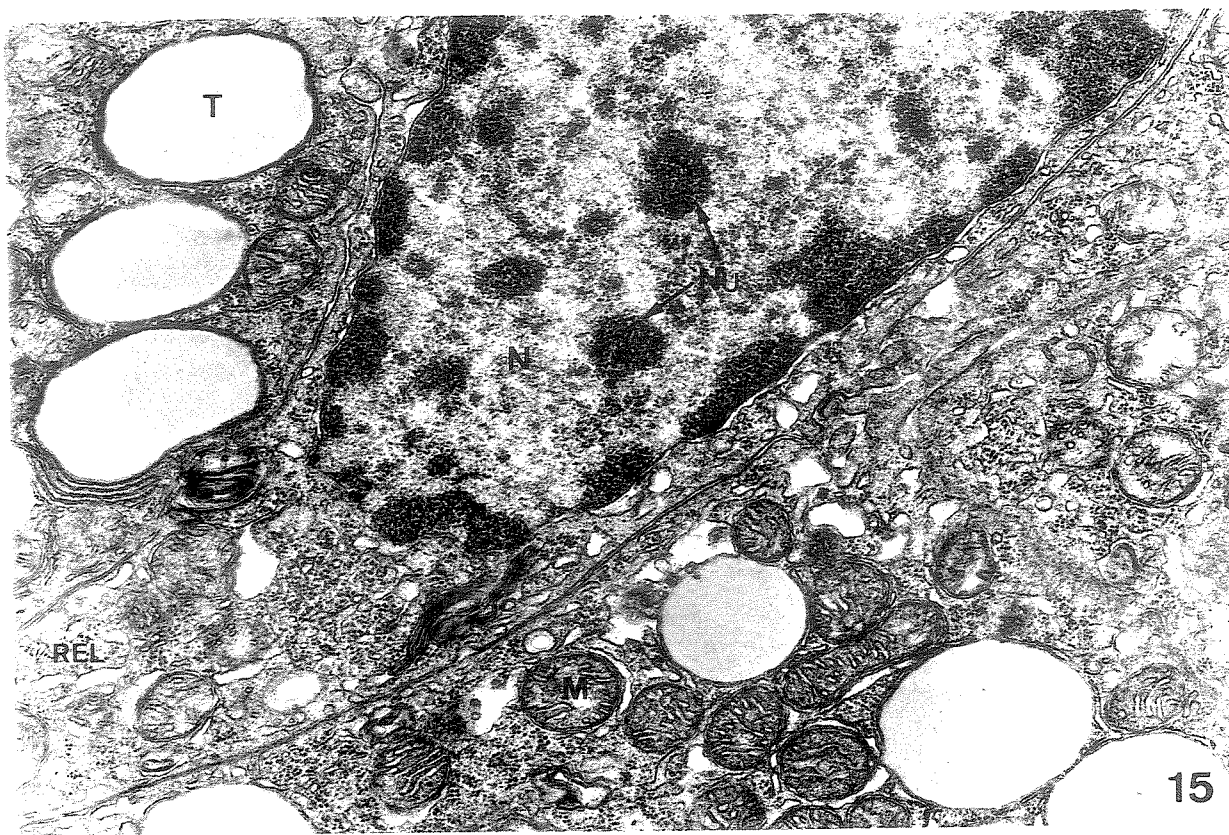


Fig. 17 – GSR de camundongo controle. Zona Fasciculada. As células apresentam-se na forma de cordões, o citoplasma é abundante e repleto de gotículas de lipídios (seta grossa) e mitocôndrias (cabeça de seta). Capilar fenestrado (CF). Núcleo (N) arredondado. Processos citoplasmáticos (seta fina) apresentando interdigitações. 3000X

Fig. 18 – GSR de camundongo tratado com STZ. Zona Fasciculada. As células apresentam-se na forma de cordões, ressaltando as interdigitações dos processos citoplasmáticos (seta fina). Numerosas gotículas de lipídios (seta grossa) e mitocôndrias (cabeça de seta) espalhadas de modo aleatório pelo citoplasma celular. Núcleo (N) arredondado e nucléolo (Nu). Presença de capilares fenestrados (CF). 3.000X

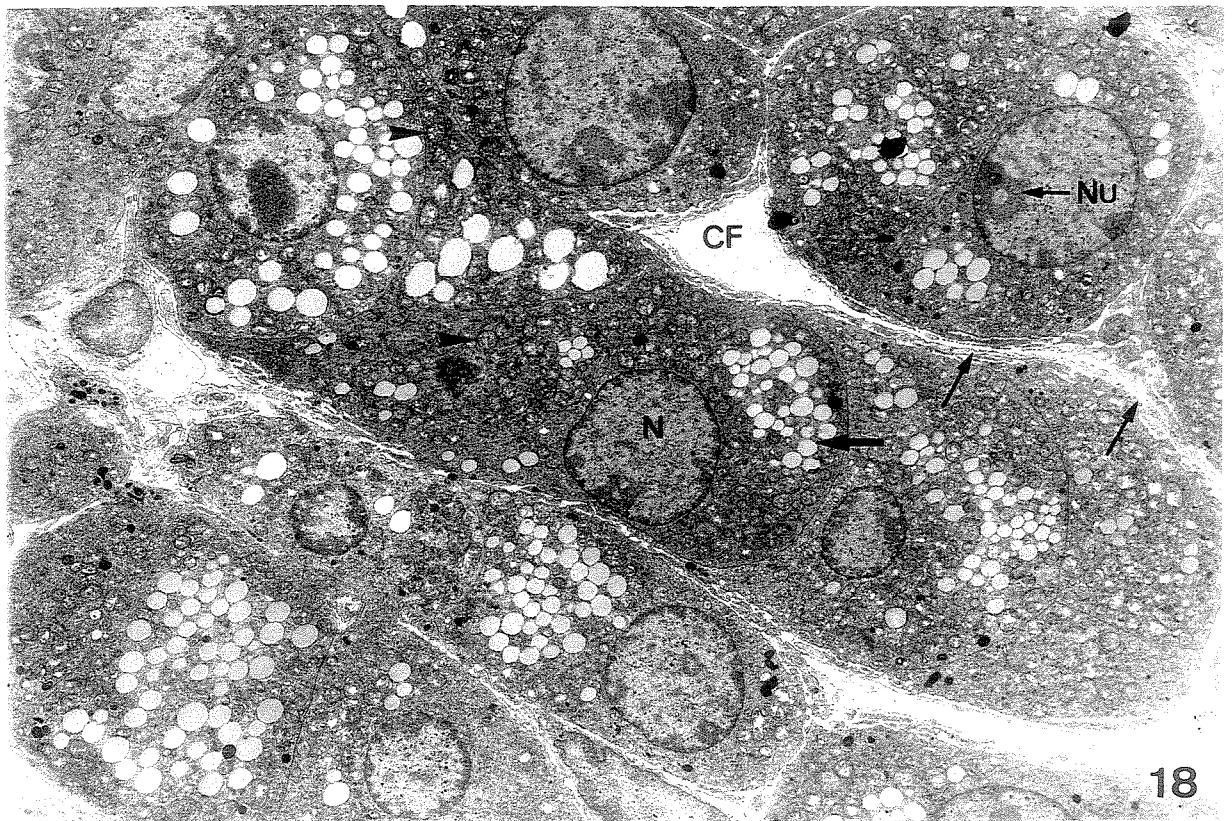
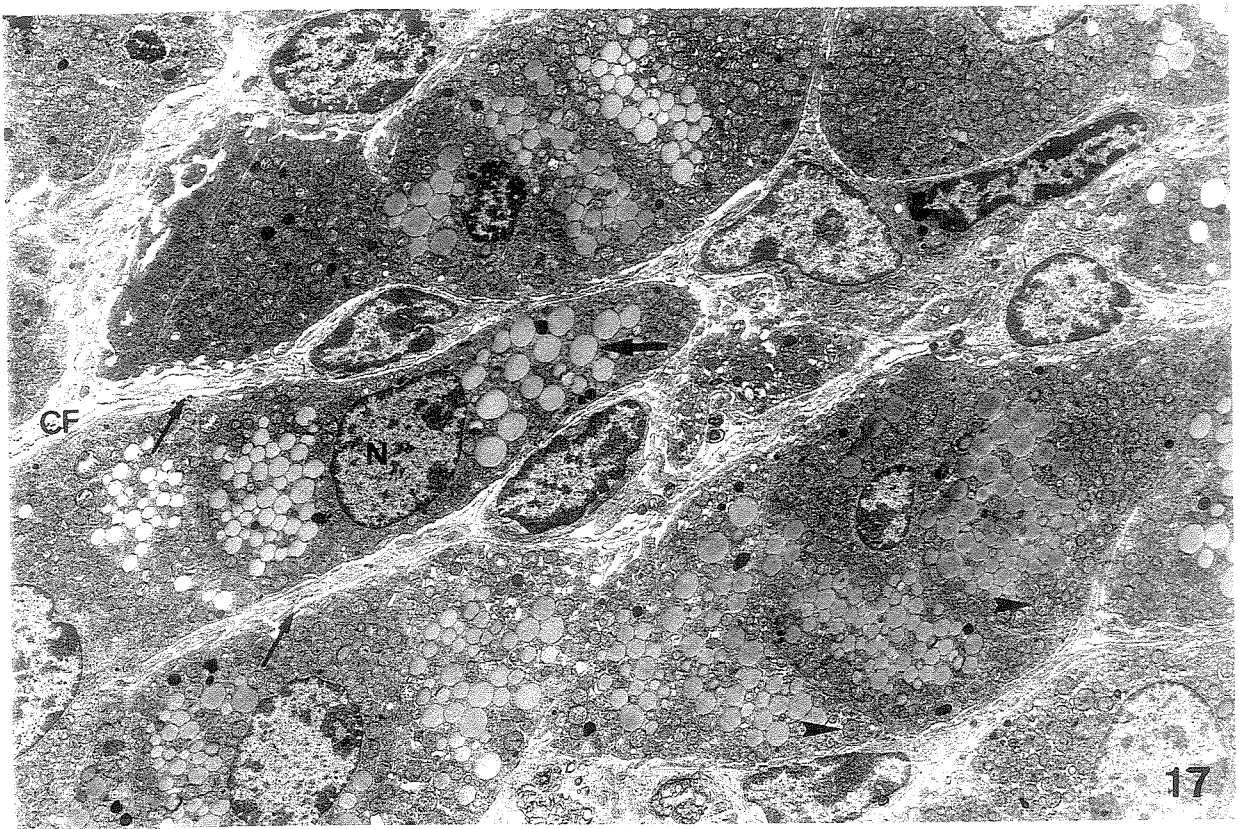


Fig. 19 – GSR de camundongo controle. Maior aumento da Zona Fasciculada. Observa-se núcleo (N) e nucléolo (Nu). No citoplasma apresentam-se muitas gotículas de lipídios (T) e mitocôndrias (cabeça de seta). Processos citoplasmáticos apresentando interdigitações (setafina). 6.000X

Fig. 20 – GSR de camundongo tratado com STZ. Maior aumento da Zona Fasciculada. Observa-se grande quantidade de gotículas de lipídios (T) e mitocôndrias (cabeça de seta) espalhadas por todo o citoplasma. Núcleo (N) e nucléolo (Nu). 6.000X

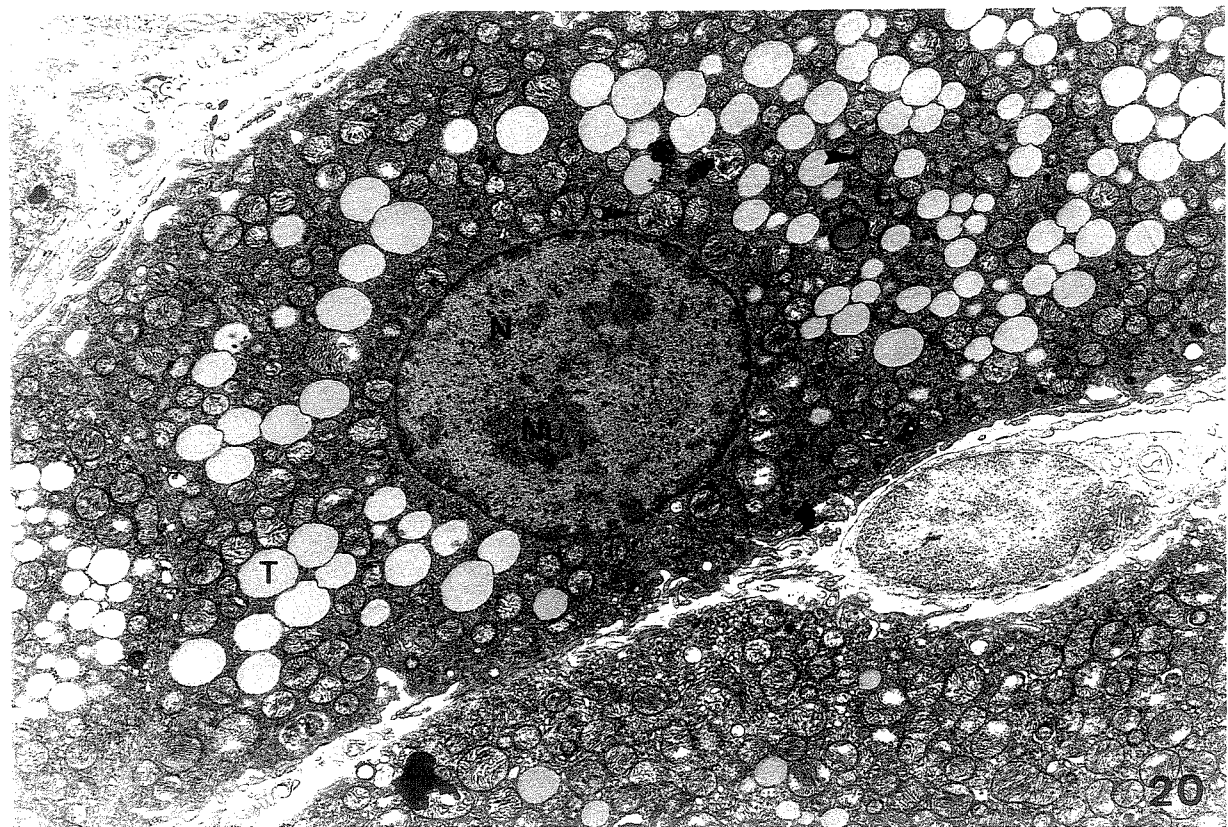
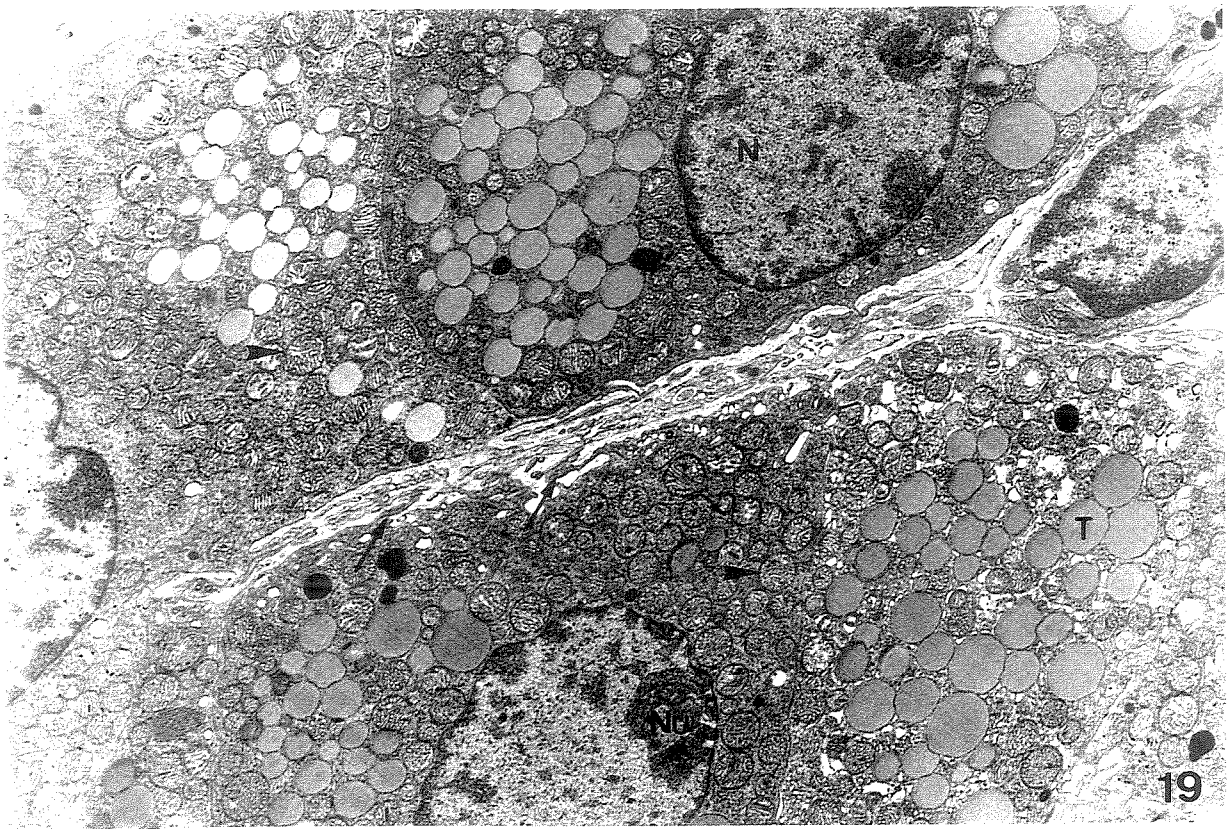


Fig. 21 – GSR de camundongo controle. Zona Reticular. Camada mais interna do córtex. Suas células apresentam-se menores e agrupadas de maneira irregular, comparado às outras zonas. O citoplasma apresenta-se rico em mitocôndrias (cabeça de seta). Poucas gotículas de lipídios (T). Núcleo (N) com mais de um nucléolo (Nu) proeminente. Capilares fenestrados (CF). Processos citoplasmáticos com interdigitações (seta fina). 9.700X

Fig. 22 – GSR de camundongo tratado com STZ. Zona Reticular. Grande quantidade de mitocôndrias (cabeça de seta), sendo sua membrana externa bem caracterizada. Perfis de retículo endoplasmático liso (REL). Presença de algumas estruturas elétron-densas (seta grossa). Núcleo (N) com corpos de cromatina (C) organizados na periferia. Capilares fenestrados (CF) e processos citoplasmáticos com interdigitações. 9.700X

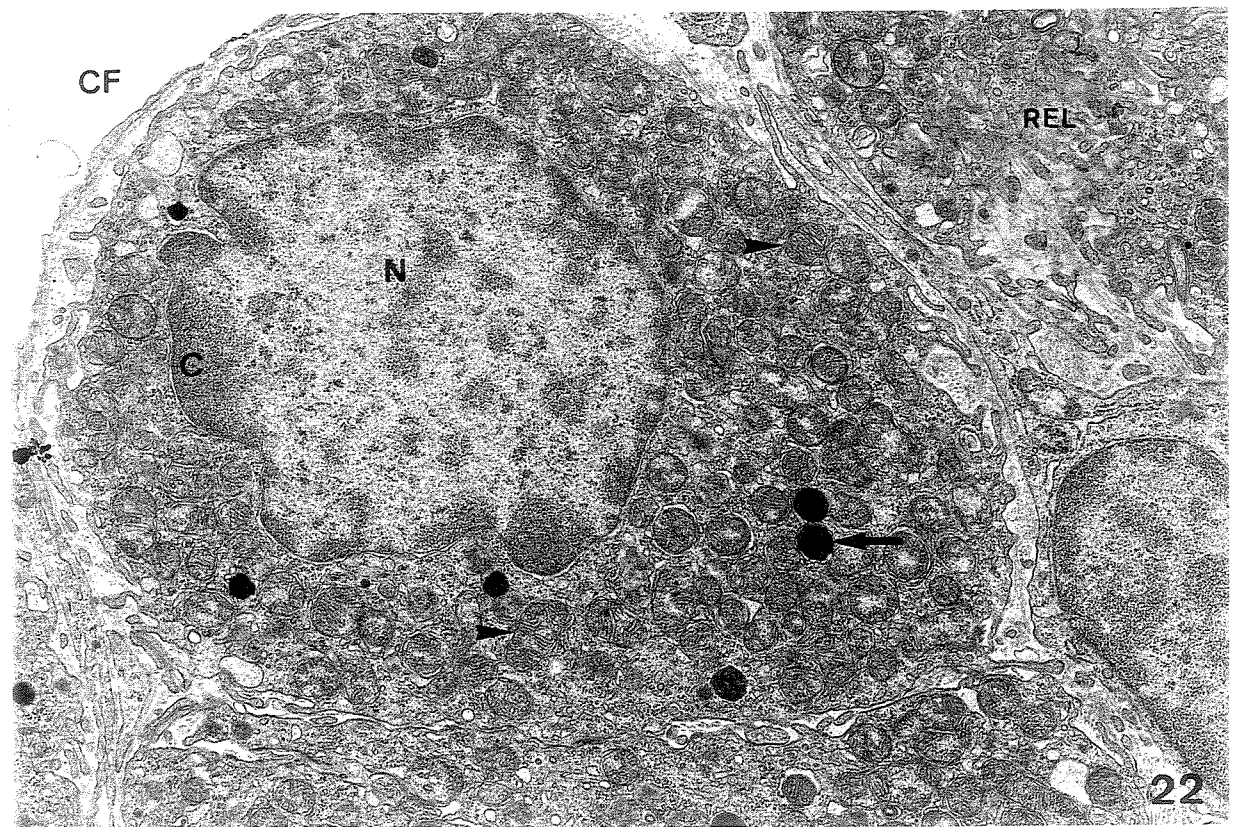
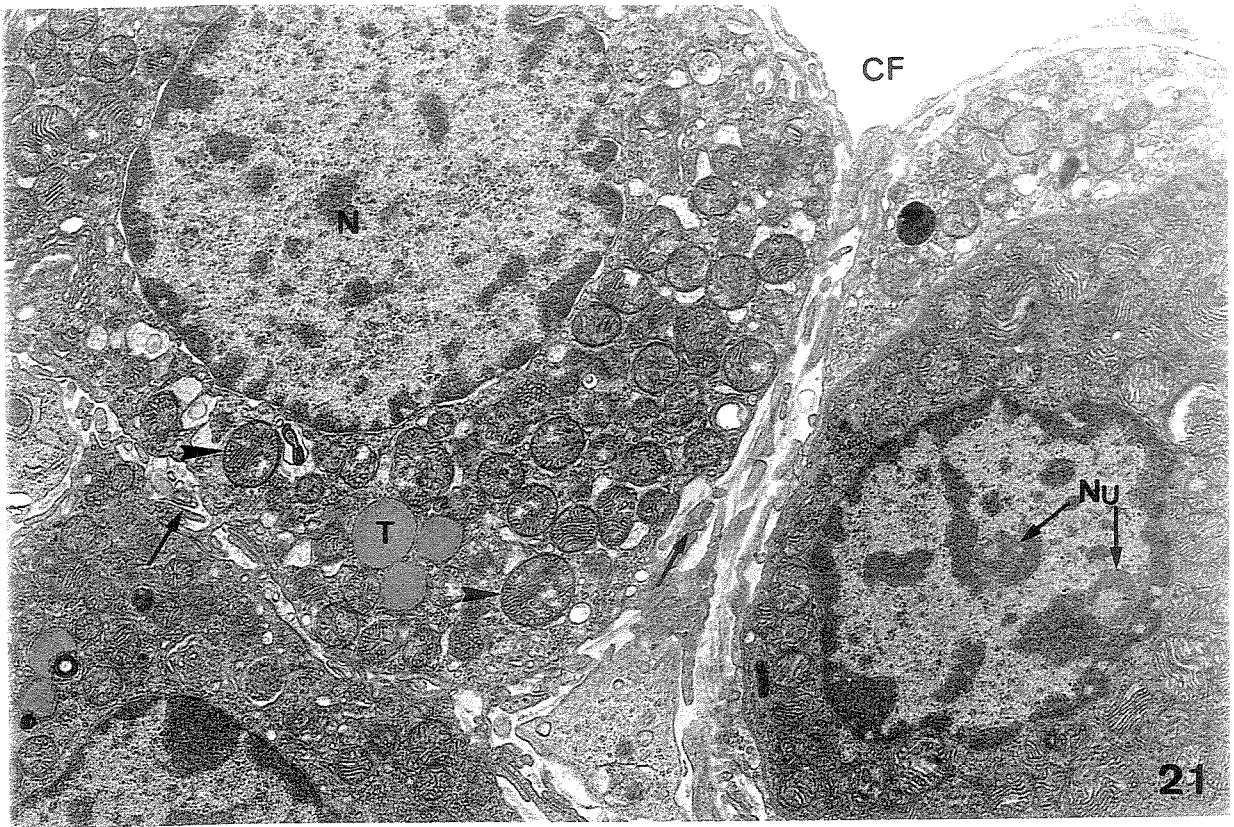


Fig. 23 – GSR de camundongo controle. Zona Medular. Grupo de células intimamente acondicionadas. Núcleo (N) grande e arredondado e nucléolo (Nu). Citoplasma extenso e repletos de grânulos. Observa-se pequena quantidade de mitocôndrias (cabeça de seta). 6.400X

Fig. 24 – GSR de camundongo tratado com STZ. Zona Medular. Grupo de células apresentando núcleo (N) grande e arredondado. Citoplasma granular. Reduzido número de mitocôndrias (cabeça de seta). 6.400X

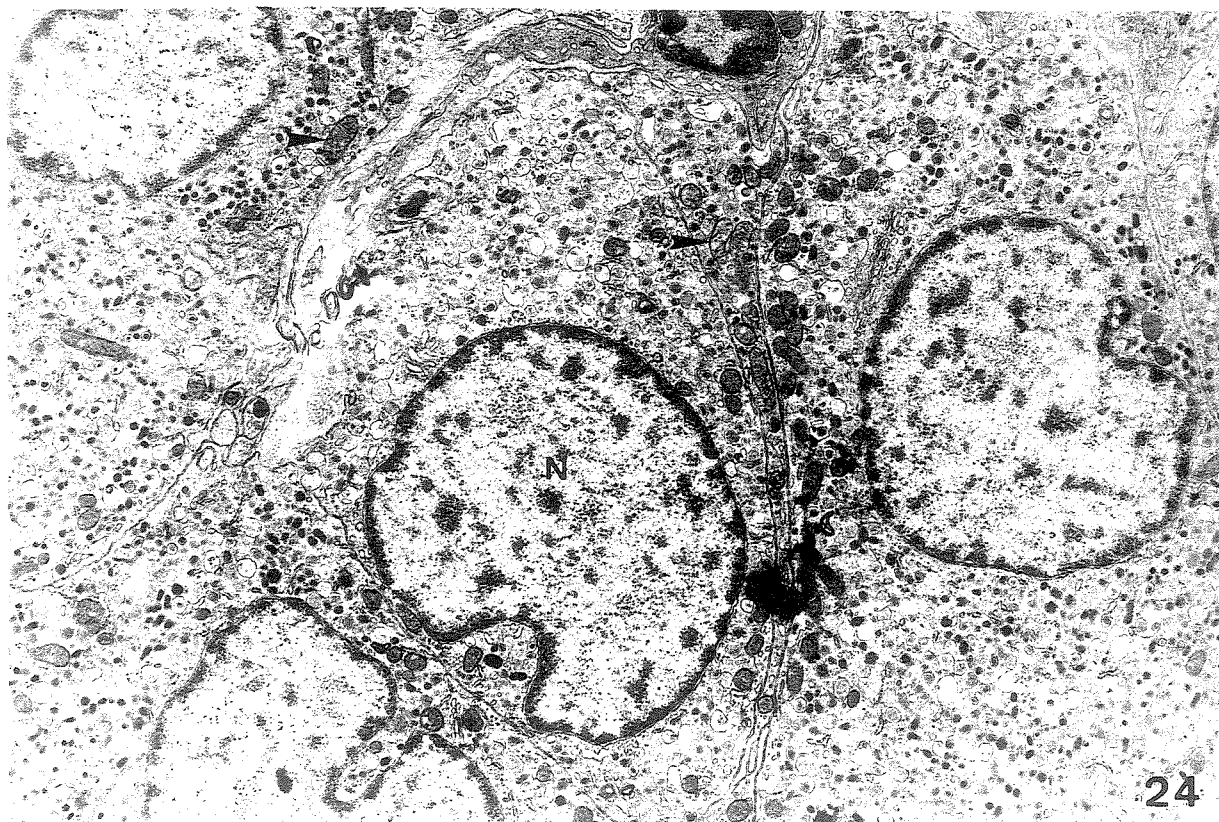
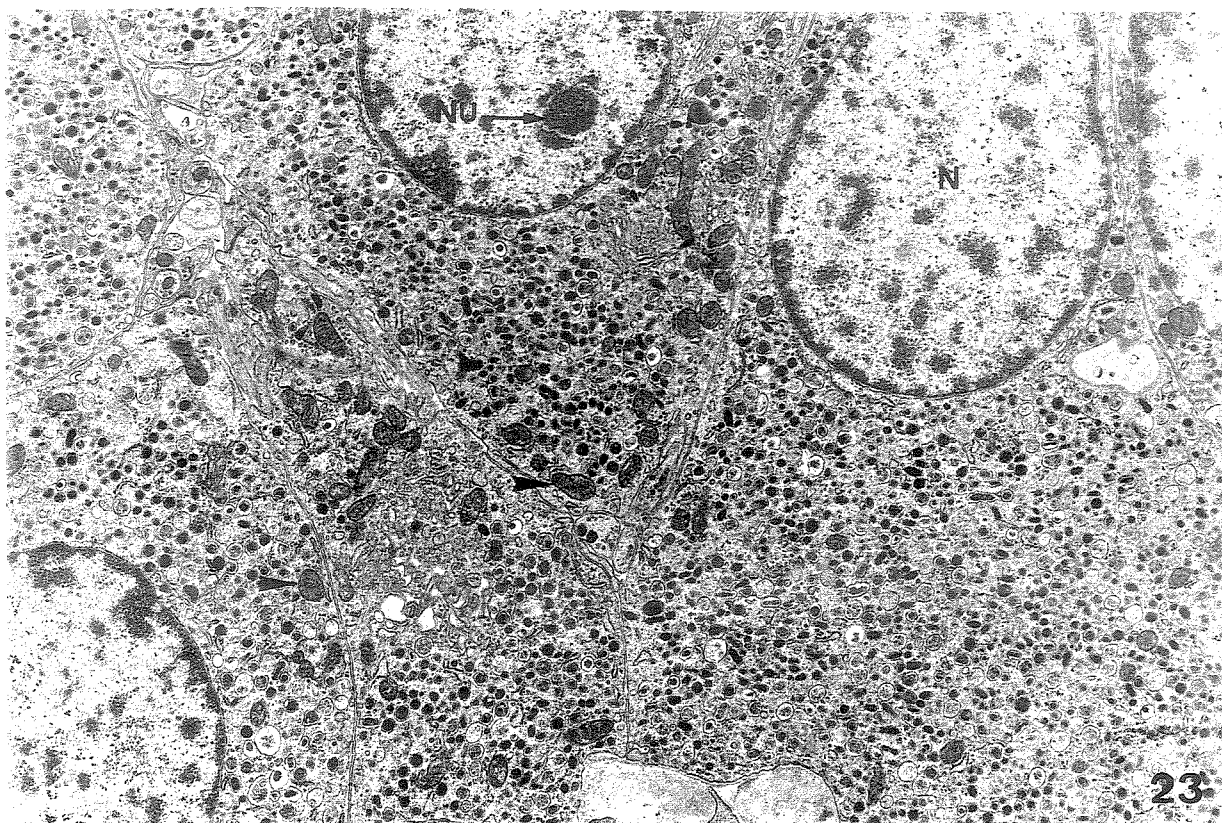


Fig. 25 – GSR de camundongo controle. Maior aumento da Zona Medular. O citoplasma apresenta muitos grânulos (seta fina). Mitocôndrias (cabeça de seta). Aparelho de Golgi (G) próximo ao núcleo. Perfis de retículo endoplasmático liso (REL) espalhados pelo citoplasma. Núcleo (N) arredondado com nucléolo (Nu) proeminente. 13.800X Em destaque, mitocôndrias com crista tubulares aparentes e membrana externa preservada. 55.200X

Fig. 26 – GSR de camundongo tratado com STZ. Maior aumento da Zona Medular. Citoplasma com numerosos grânulos (seta fina). Presença de mitocôndrias (cabeça de seta). Perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) e liso (REL). Núcleo (N) e nucléolo (Nu) proeminente. 13.800X Em destaque, mitocôndrias com crista tubulares aparentes e membrana externa preservada. 55.200X

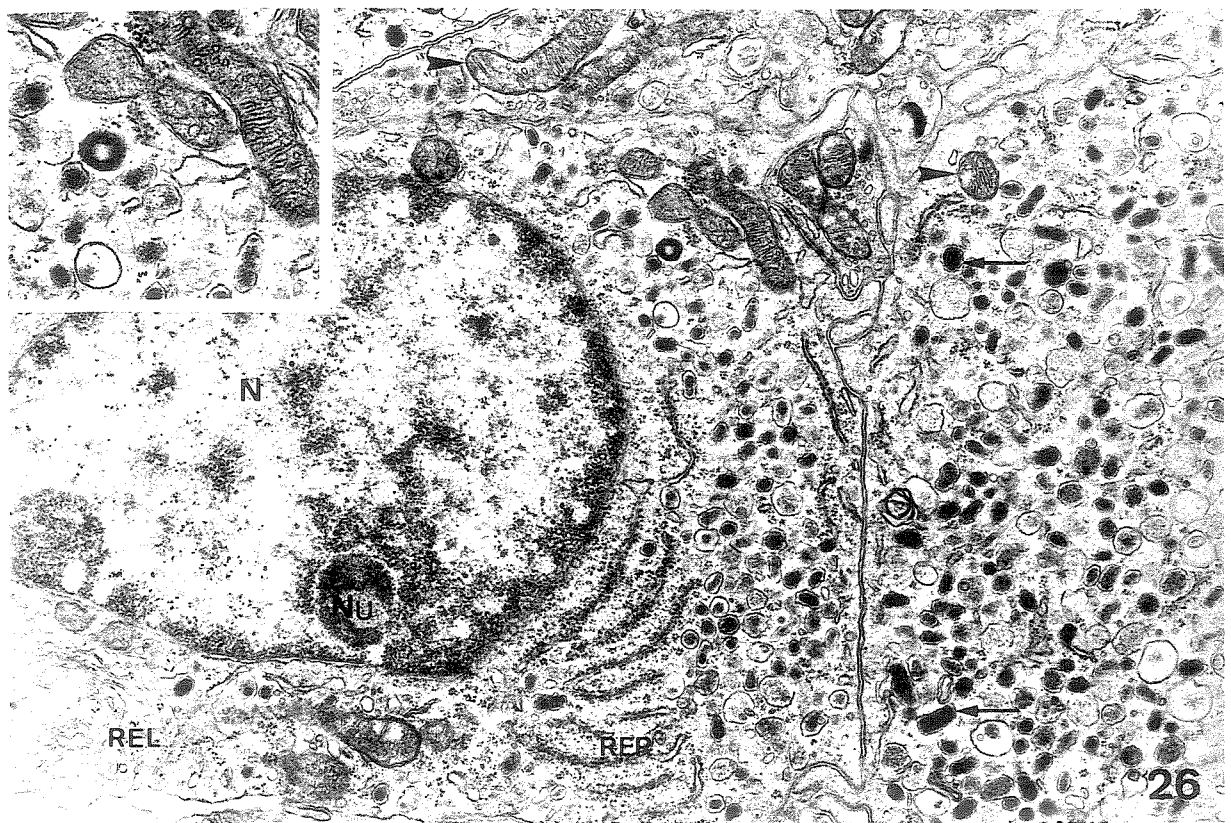
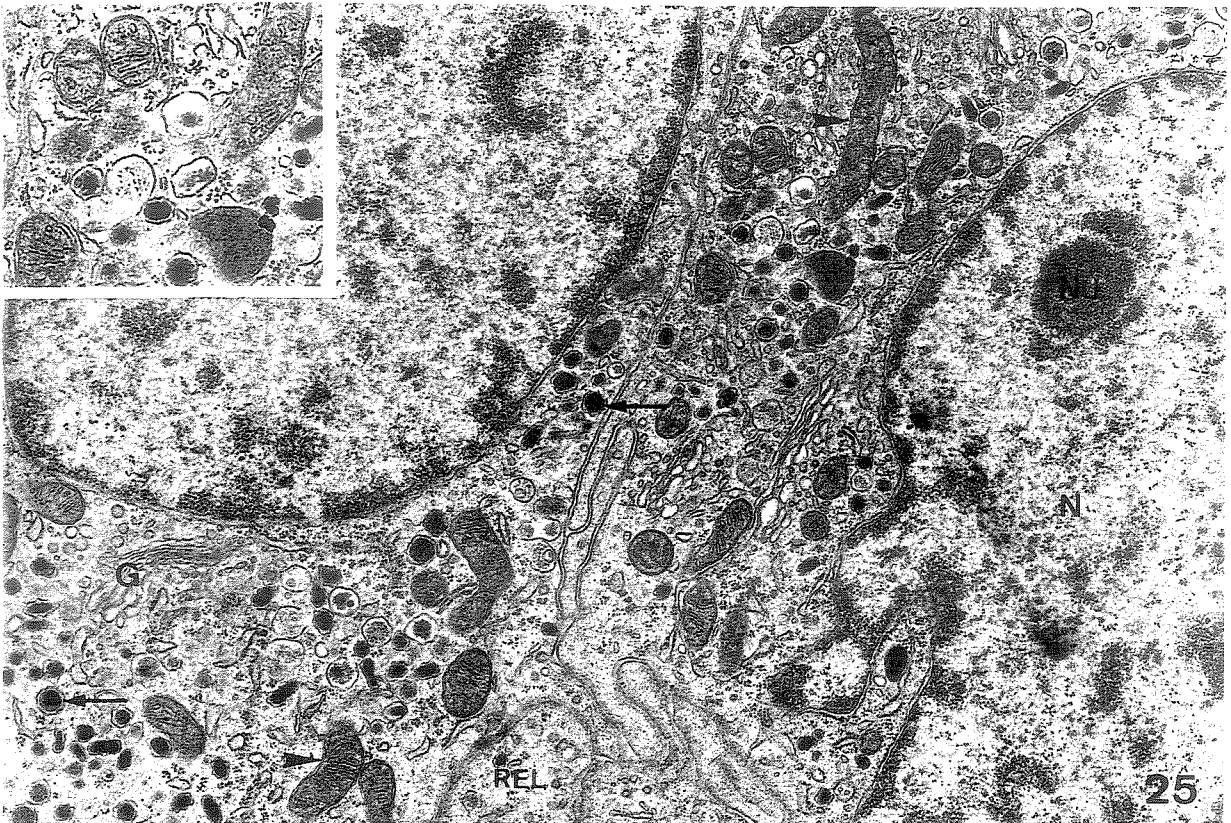


Fig. 27 – Testículo de camundongo controle. Túbulo seminífero ativo em corte transversal. Espermatogônias (S) adjacentes à membrana da região basal. Células Mióide (Mi) apresentando-se de forma delgada. Observam-se espermátocitos primários (S1) e espermátides (S3) com vesículas acrossômicas (AV) em desenvolvimento produzidas pelo aparelho de Golgi (G). Presença de espermatozóides (S4). 2.300X

Em destaque, espermátide com aparelho de Golgi formando a vesícula acrossômica. 9.200X

Fig. 28 – Testículo de camundongo tratado com STZ. Túbulo seminífero ativo em corte transversal. As espermatogônias (S) estão em contato com a membrana da região basal. Espermátocitos primários (S1), espermátides (S3) e espermatozóides (S4). Nas espermátides observam-se o aparelho de Golgi (G) e a vesícula acrossômica (AV). 2.300X

Em destaque, espermátide com vesícula acrossômica e aparelho de Golgi. 9.200X

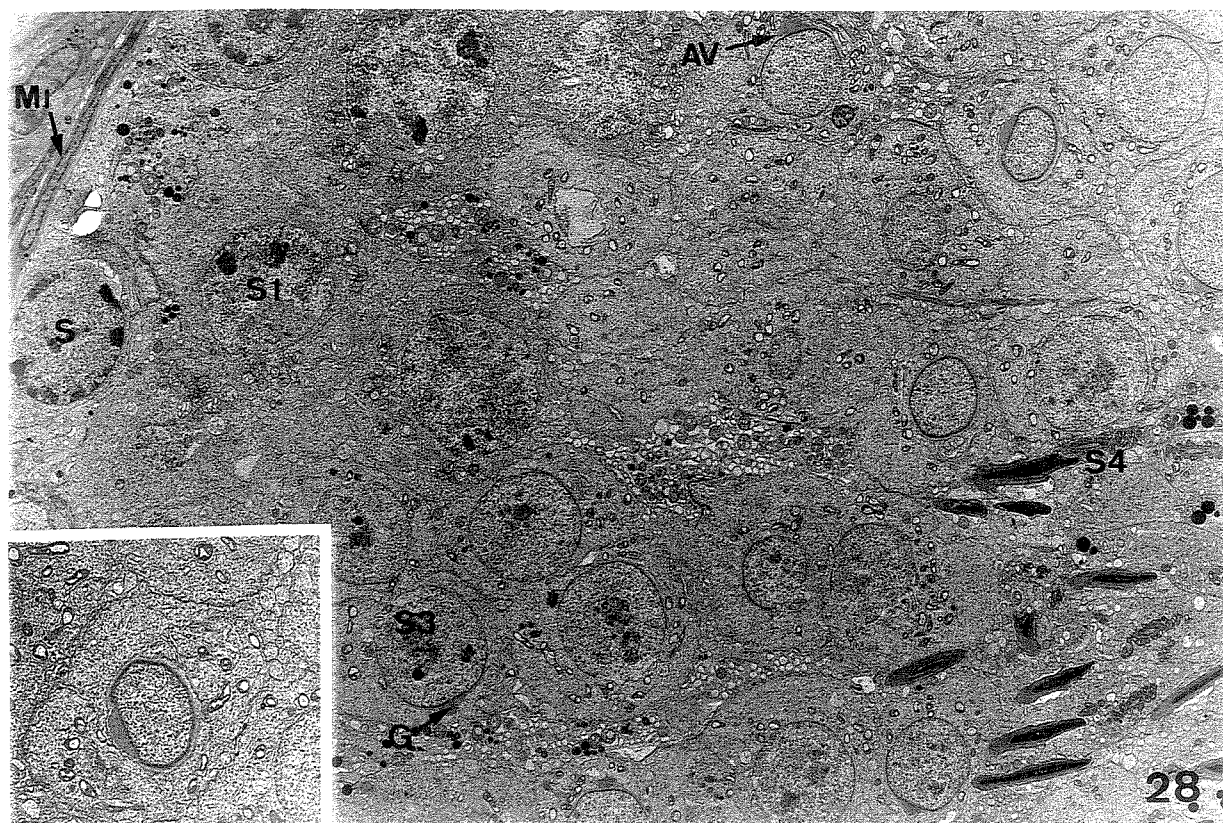
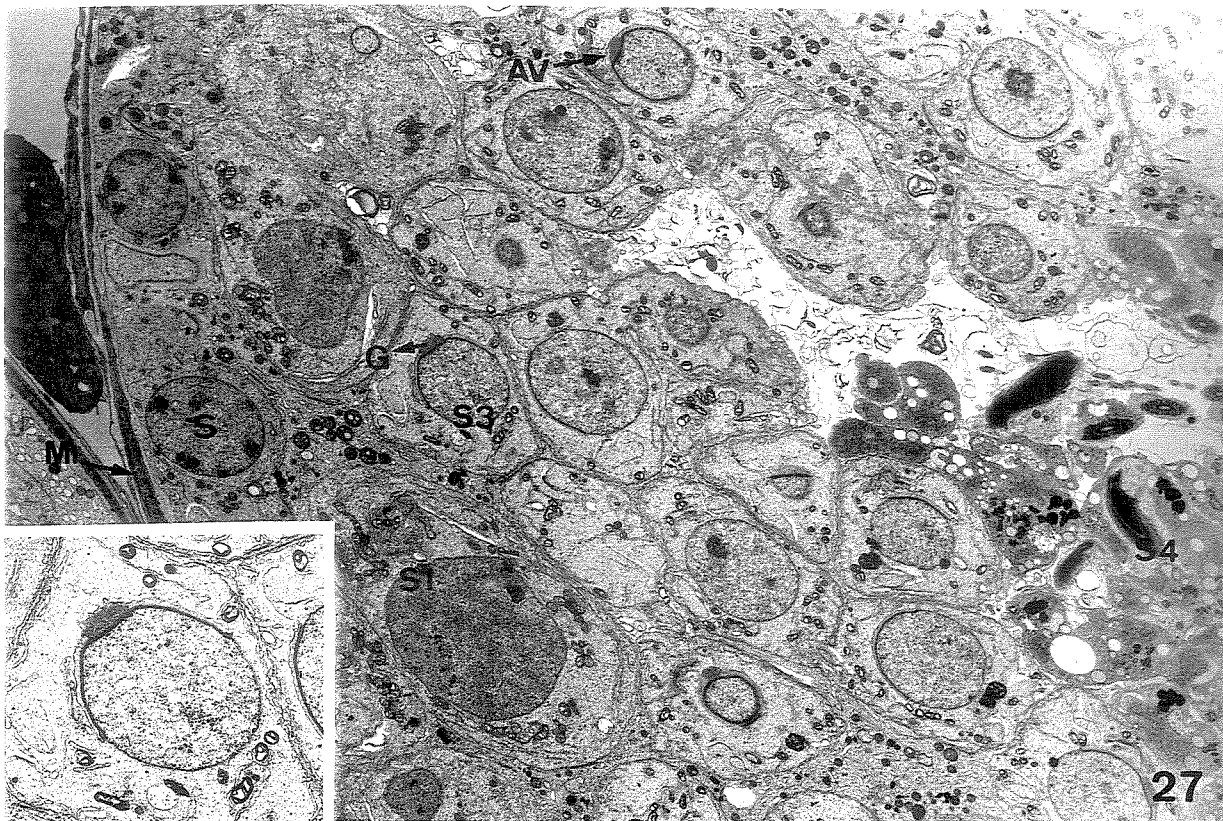


Fig. 29 – Testículo de camundongo controle. Corte transversal do túbulo seminífero em maior aumento. A célula de Sertoli (ST) encontra-se adjacente à membrana da região basal e em contato com as células da série espermatogênica. O citoplasma é abundante e de forma irregular. O núcleo (N) é caracteristicamente orientado em ângulo reto com a membrana da região basal. Um nucléolo (Nu) proeminente e corpos de cromatina (C). Invaginações da membrana nuclear (seta). Número moderado de mitocôndrias (cabeça de seta). 4.900X

Fig. 30 – Testículo de camundongo tratado com STZ. Corte transversal do túbulo seminífero em maior aumento. Células de Sertoli (ST) encontram-se adjacentes à membrana da região basal. Núcleo (N) com nucléolo (Nu) proeminente e corpos de cromatina (C). Citoplasma abundante com moderado número de mitocôndrias (cabeça de seta). 4.900X

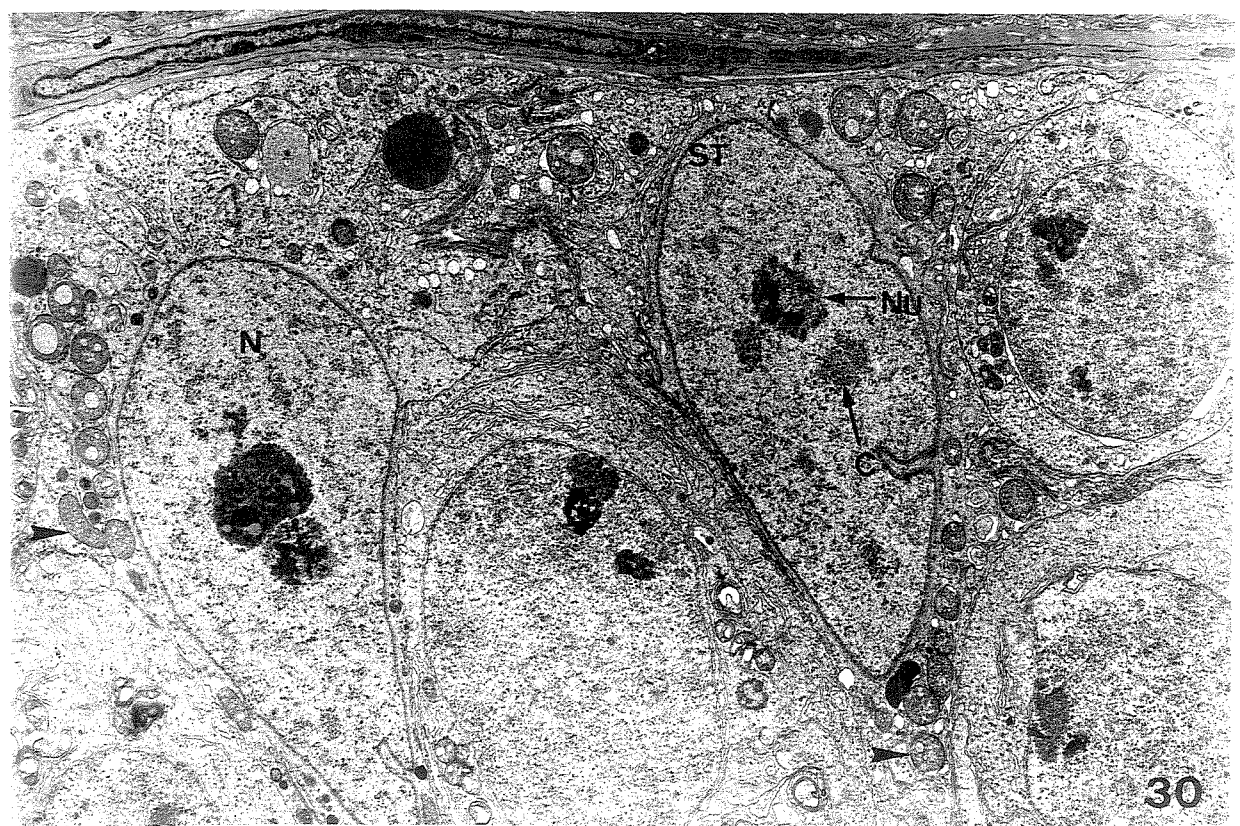
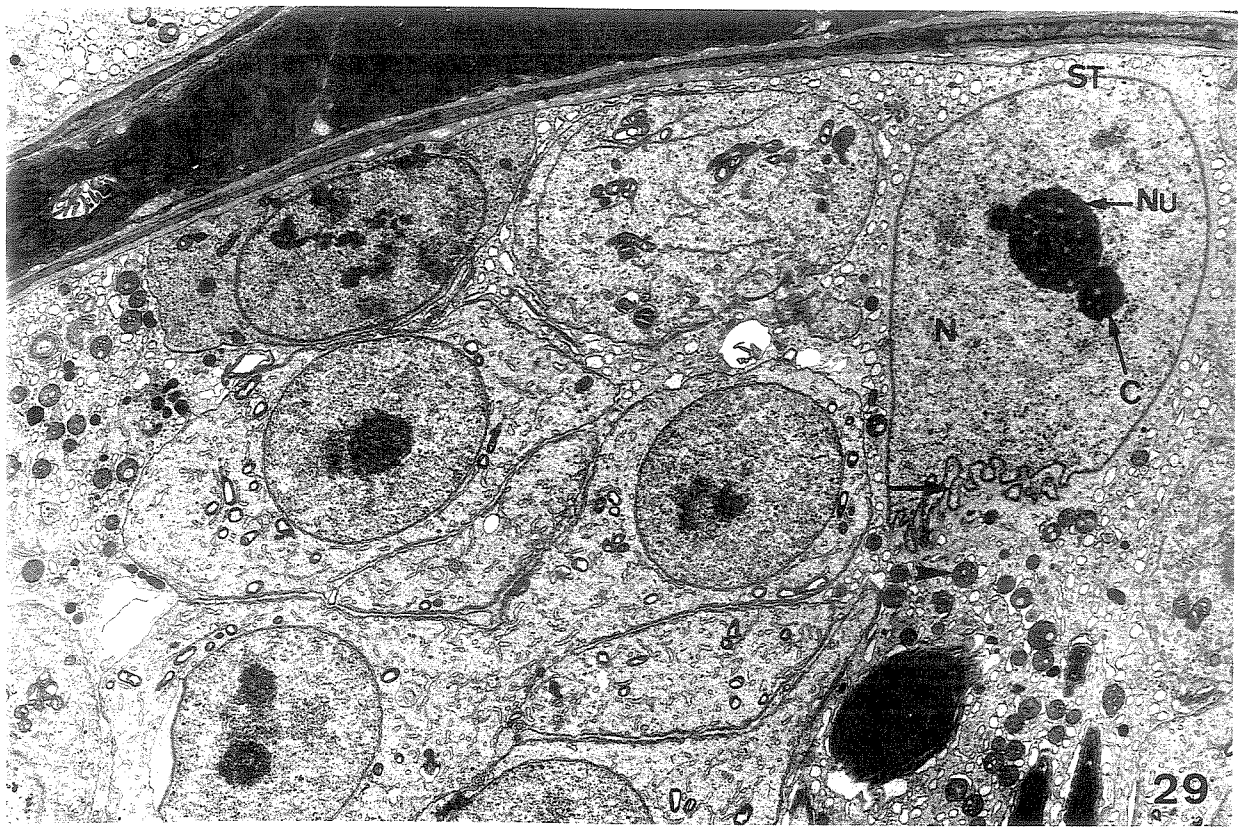


Fig. 31 – Testículo de camundongo controle. Célula de Leydig. Núcleo (N) com forma irregular e nucléolo (Nu) situado na periferia. Extenso citoplasma com gotículas de lipídios (T). Capilar sanguíneo (Cap). 8.500X

Fig. 32 – Testículo de camundongo tratado com STZ. Célula de Leydig. Núcleo (N) apresentando-se irregularmente. Presença de gotículas de lipídios (seta fina) e grânulos elétron-densos (cabeça de seta). Capilar sanguíneo (Cap). 5.000X

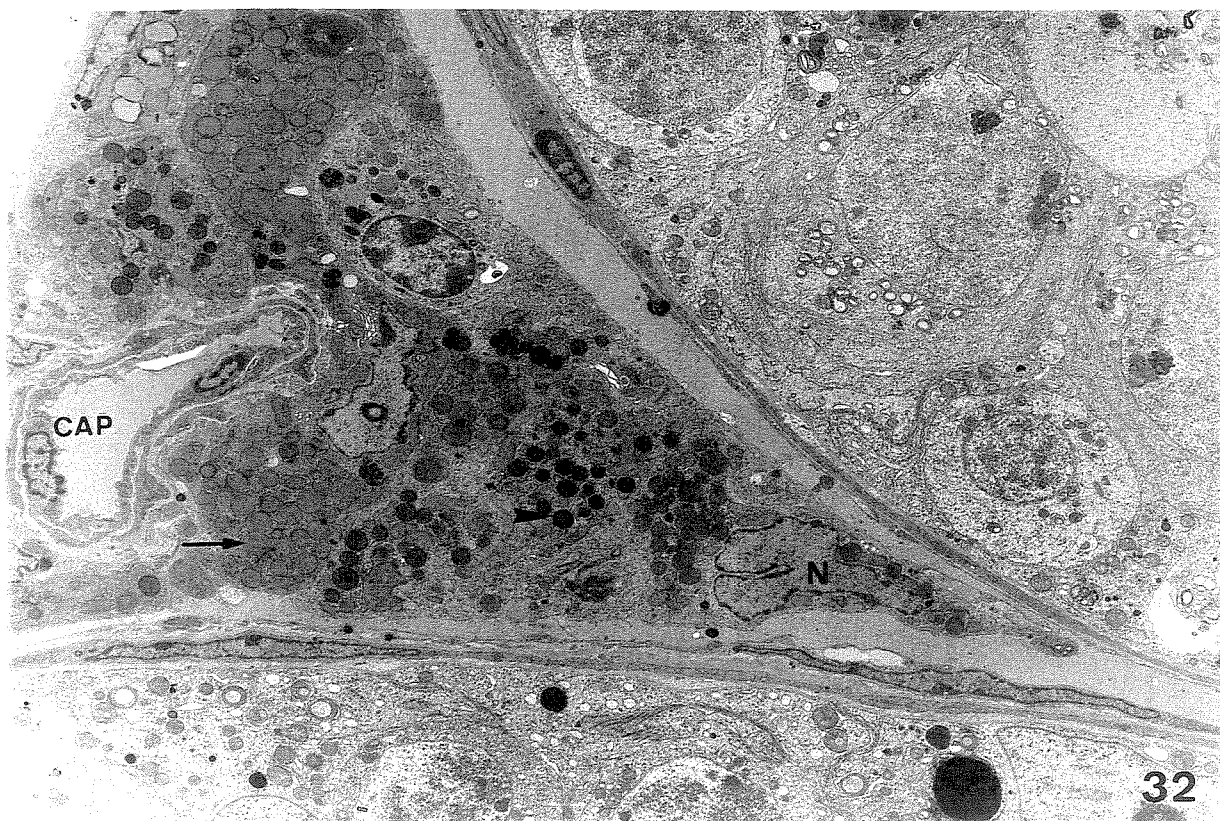
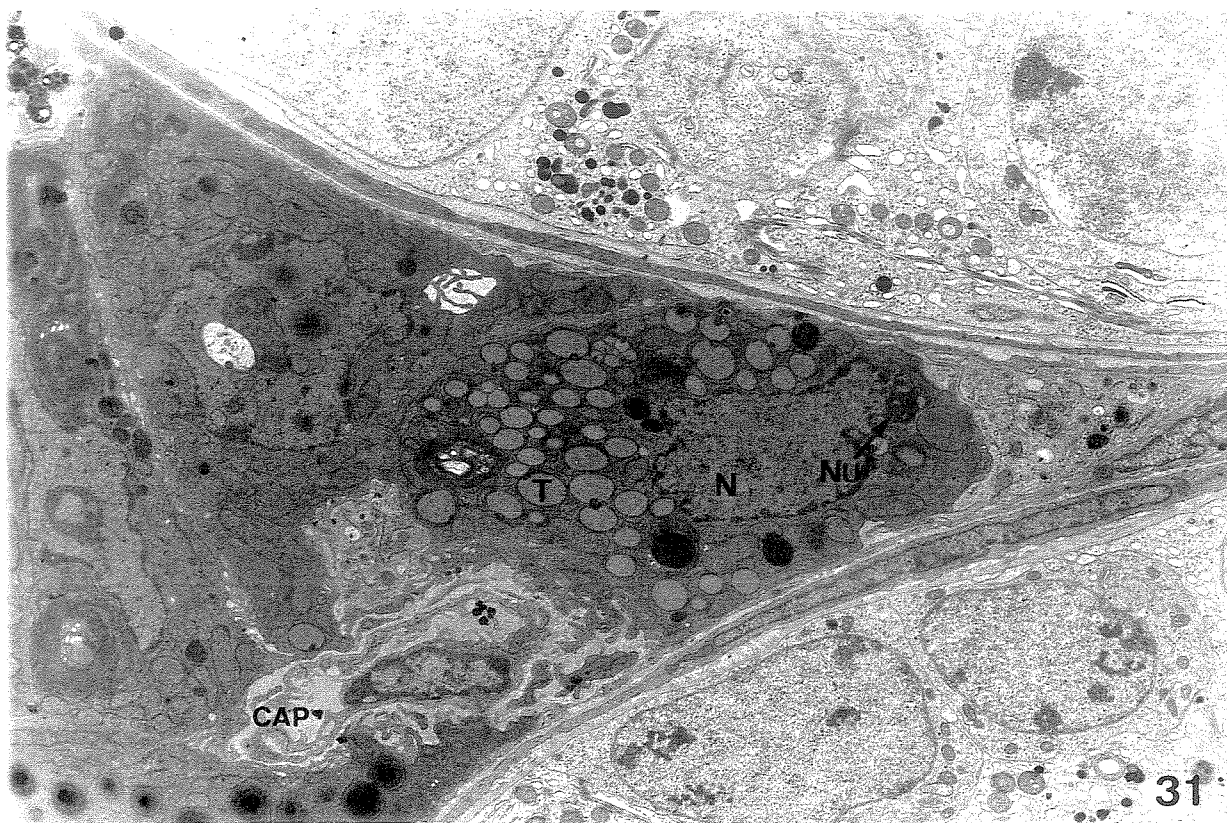
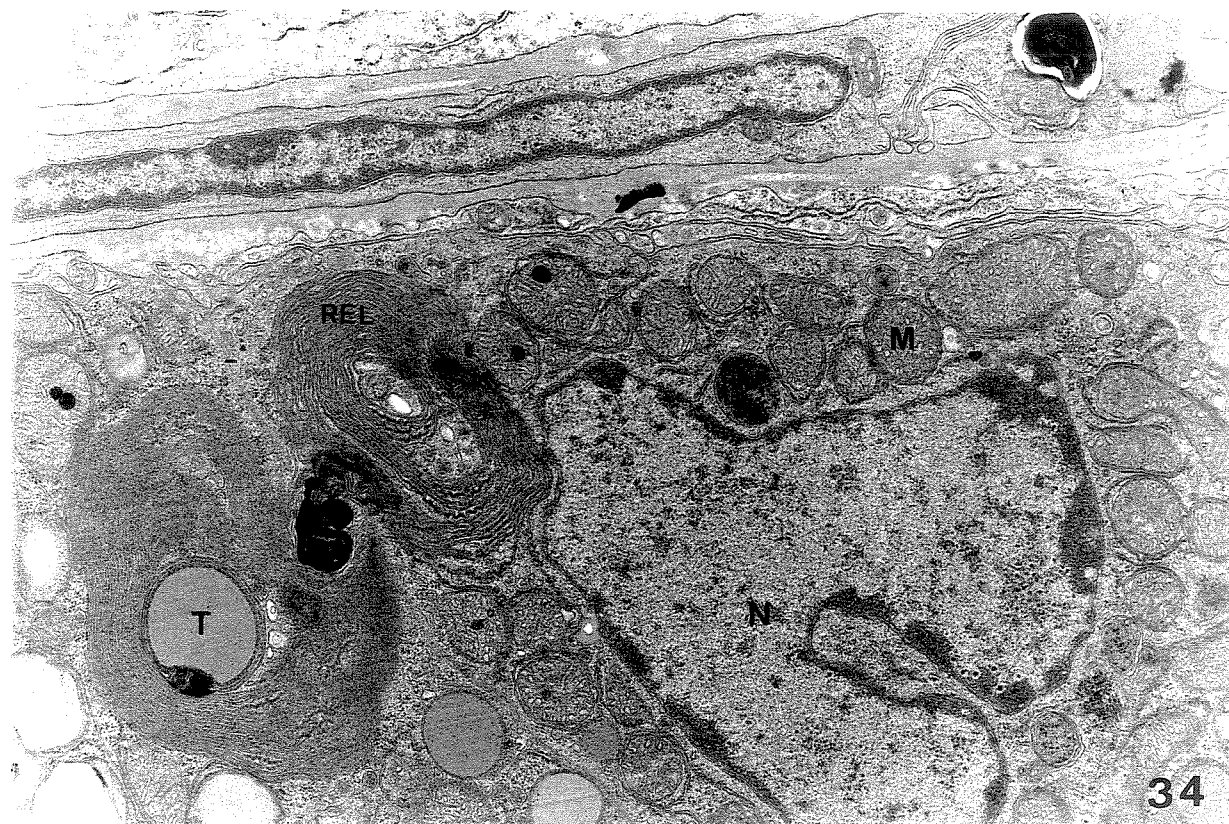
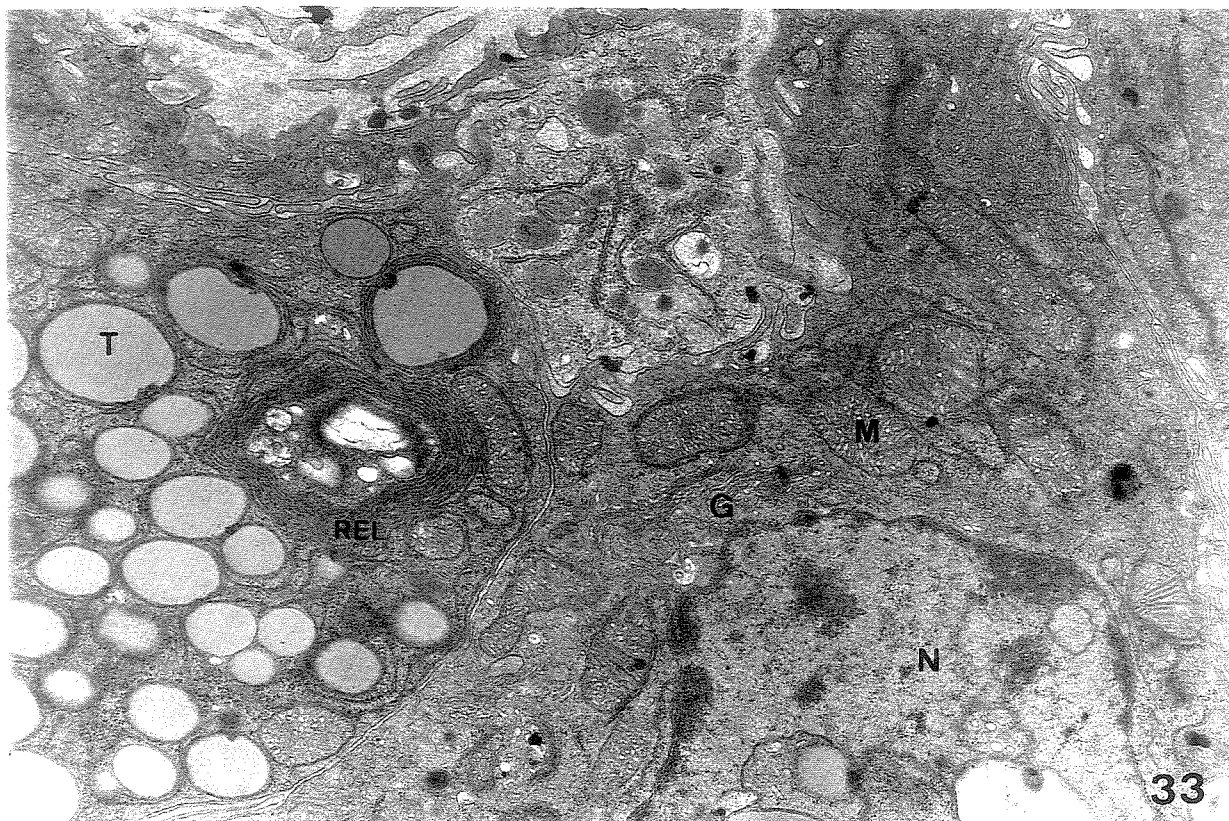


Fig. 33 – Testículo de camundongo controle. Célula de Leydig. Núcleo (N).
No citoplasma apresentam-se mitocôndrias (M) e gotículas de lipídios (T) espalhadas, as quais mostram-se circundadas por perfís de retículo endoplasmático liso (REL). Aparelho de Golgi (G) próximo ao núcleo. Corpos de cromatina densos (seta). 13.800X

Fig. 34 – Testículo de camundongo tratado com STZ. Célula de Leydig.
Núcleo (N) irregular. Presença de mitocôndrias (M) e gotículas de lipídios (T) envolvidas por perfís de retículo endoplasmático liso (REL). Corpos de cromatina densos (seta). 13.800X



5 - Discussão

A escolha do animal modelo utilizado em nosso trabalho, baseou-se no fato de que, o camundongo apresenta uma síndrome semelhante ao diabetes mellitus desenvolvido no humano. Estudos experimentais do diabetes descritos na literatura, mostram que esses animais apresentam hiperglicemia, hipoinsulinemia (relativa ou absoluta) e obesidade, com características metabólicas comuns (Herberg & Coleman, 1977). A síndrome do diabetes, nos camundongos modelos, caracteriza-se pela resistência à insulina e pela presença da hiperglicemia, sendo esta uma das mais severas síndromes (Rossini et al., 1977, 1978; Carson, 1979 e Shafrir, 1996).

Conforme a literatura, tanto a aloxana e como a STZ são amplamente utilizadas pois, sendo agentes antineoplásticos, atuam toxicamente nas células β do pâncreas. Doses diabetogênicas dessas substâncias provocam uma deficiência de insulina nos animais, a qual assemelha-se ao diabetes do tipo I. Considerando a espécie, a idade e o estado metabólico do animal, determina-se as doses necessárias para a indução do diabetes experimental (Carson, 1979; Mordes & Rossini, 1981; Mordes et al., 1981 e Grodsky et al., 1982).

A dosagem do agente diabetogênico (STZ), adotada para o experimento proposto, esteve dentro dos limites mais utilizados, conforme mostra a literatura (Rossini et al., 1977, Carson, 1979; Mordes & Rossini, 1981; Mordes et al., 1981; Gold et al., 1981; Grodsky et al., 1982; Gaulton, 1985).

O diabetes mellitus induzido pela STZ nos camundongos machos, através das 05 (cinco) doses de baixa concentração da droga, apresentou em nossos estudos, alto grau de severidade - acima de 800 mg/dl, o que está de acordo com os relatos de Leiter (1982) e Paik et al. (1982).

Conforme Camargo (1984), “o fato de ter administrado cinco doses, num período de trinta dias, assegura um estado diabético irreversível dos animais”, fato esses que obteve consonância com os resultados apresentados neste trabalho.

A escolha da STZ, como agente diabetogênico para a indução do diabetes experimental, baseou-se em relatos que ressaltaram sua eficiência, como a sua atuação nas células das ilhotas pancreáticas, quando comparado à aloxana (Mordes & Rossini, 1981 e Robbins et al., 1989).

O grupo de camundongos diabéticos estudado, apresentou redução significativa do peso corpóreo de cada animal, reação provavelmente causada pelo estado diabético dos animais. (Camargo, 1984 e Ford & Hamilton, 1984).

O aumento do peso das glândulas supra-renais dos camundongos machos diabéticos, bem como as alterações apresentadas em suas camadas foi significativa ($p < 0,01$), o que está de acordo com os resultados obtidos por Devercerski et al. (1963), Ratsimamanga et al. (1969), Kraus (1973), De Nicola et al. (1976,1977), Camargo (1984) e Rebuffat et al. (1988).

A redução significativa ($p < 0,01$) do tamanho e peso dos testículos, dos animais diabéticos por STZ, foi comprovada com os resultados descritos na literatura (Oksanen, 1975; Howland & Zebrowski, 1976; Camargo, 1984 e Ford & Hamilton, 1984).

Notoriamente, a elevação significativa do nível de proteína na urina faz parte da sintomatologia de doenças renais (Sodeman & Sodeman, 1983) sendo entretanto, várias as causas de tais lesões renais. O estado diabético dos camundongos, ou mesmo a toxicidade da STZ, poderiam ser apontados como causadores de lesões desta natureza, visto que, a referida proteinúria foi observada, mais uma vez, em nossos resultados. Por outro lado, os trabalhos de Stolinsky et al. (1972), Schein et al. (1974), Dupriest Jr et

al. (1975), Oberg et al. (1981), relataram uma proteinúria transitória ocorrida por ocasião do tratamento do câncer, através da administração da STZ. Tais autores atribuíram a proteinúria transitória à ação tóxica deste agente antineoplástico sobre os rins. Outras eliminações anormais na urina, foram relatadas sendo que, apenas uma pequena porcentagem de pacientes apresentaram glicosúria, sem tampouco desenvolverem diabetes clínico, cujo restabelecimento do metabolismo foi total, assim que cessou a administração da droga. Caracterizando as alterações como decorrente do estado diabético e não da droga utilizada para obtenção da patologia.

Observou-se, à microscopia de luz, as três zonas da região cortical das glândulas supra-renais de camundongos, de modo bem definido sendo: glomerulosa, a zona mais próxima da periferia da glândula; reticular, aquela próxima a região medular; e fasciculada, a zona intermediária. Tais regiões foram descritas por Deane (1962), a qual difundiu-se mundialmente. Mais recentemente, Motta et al. (1979, 1984) e Nussdorffer (1986) apresentaram descrições da ultra-estrutura dessas regiões com o auxílio da microscopia eletrônica de transmissão.

Utilizando as microscopias de luz e eletrônica, nossos estudos não apontaram alterações histológicas significativas nas células das glândulas supra-renais, dos animais diabéticos pela STZ, resultados semelhantes aos descritos por Arimura et al. (1967). Em contraste, diversas glândulas e órgãos, tais como: cérebro, pâncreas, rins e glândulas submandibulares, apresentaram alterações ultra-estruturais significativas, conforme relatos de pesquisadores, considerando o diabetes espontâneo e experimental, induzido por STZ e aloxana (Rossini et al., 1977; Carson, 1979; Bestetti & Rossi, 1980; Hanker et al., 1980; Hilton et al., 1981; Mordes & Rossini, 1981; Camargo, 1984 e Ziv & Shafrir, 1997)

Conforme Kataoka et al. (1996), a renovação total das células do córtex das glândulas supra-renais ocorre em aproximadamente 240 dias, este fato pode ser em parte, responsável pela não alteração observada, sendo que estes aspectos merecem estudos adicionais.

Steger & Rabe (1997) sugeriram que houve intensificação, por causa do estado diabético, do funcionamento do córtex da supra-renal, sendo isto devido às alterações das respostas de realimentação de glicocorticoides, na presença de exercícios e de estresse.

Contudo, é importante ressaltar em nossos estudos, um hiperadrenocorticalismo (aumento do córtex da supra-renal) também relatado por Devercerski et al. (1963), Ratsimamanga et al. (1969), Kraus (1973), De Nicola et al. (1976,1977), Appel et al. (1979) e Rebuffat et al. (1988). Essa reação provavelmente foi causada pelo aumento significativo da zona fasciculada ($p < 0,05$). Os resultados obtidos na morfometria sugeriram um possível acréscimo no número de células dessa zona. O aumento das glândulas supra-renais foram também descritos em estudos com ratos obesos (ob/ob) (Hausberger & Hausberger, 1960 e Shimomura et al., 1987).

Nas zonas glomerulosa e reticular, os resultados morfométricos sugeriram alterações, mas não significativas ($p > 0,05$), nas dimensões e no número das células.

Um ligeiro aumento da região medular foi observado, porém os dados morfométricos mostraram que tal acréscimo não era significativo. Também não se observou alterações nos níveis histológicos e ultra-estruturais desta região. Esses resultados corroboram os relatos de Jean et al. (1994), tendo em vista que tal acréscimo possivelmente esteja relacionado a uma super atividade dessa região da supra-renal.

Com relação aos testículos, à microscopia de luz, observou-se uma possível diminuição das células germinativas de alguns túbulos seminíferos em animais diabéticos por STZ, o que está de acordo com Oksanen (1975) e Rossi & Aeschlimann (1982). Contudo na microscopia eletrônica de transmissão, não foi observado alterações relevantes na estrutura das células.

As células de Sertoli, através das microscopia de luz e eletrônica, apresentaram-se adjacentes à membrana da região basal dos túbulos seminíferos, com núcleos predominantemente piramidais e nucléolo proeminente, sem alterações evidentes, tanto

nos animais diabéticos como nos controles. Esses resultados foram também observados, em outros roedores, por Steinberger (1960).

As células de Leydig dos camundongos diabéticos, observadas através da microscopia de luz e eletrônica de transmissão, apresentaram núcleos com formas irregulares, cromatina dispersa e nucléolo na periferia, e citoplasmas com muitas mitocôndrias e gotículas de lipídios, sendo que alterações ultra estruturais, não foram observadas, quando comparados aos animais controles, aspectos também observados por Küln-Velten et al. (1982) e Thliveris et al. (1984). Em contra partida, Orth et al. (1979) observaram alterações significativas nas células de Leydig

Os testículos, ao contrário, sofreram uma redução significativa ($p < 0,01$) em suas dimensões, o que está de acordo com os resultados relatados por Oksanen (1975) e Camargo (1984). A análise através de testes morfométricos sugeriram que esta alteração, provavelmente provocada pelo estado diabético, está intimamente relacionada com a diminuição dos diâmetros médios dos túbulos seminíferos, visto que, as células de Leydig não foram quantificadas, relatos semelhantes aos encontrados por Oksanen (1975), Perez et al. (1982) e Zanato et al. (1994).

Na análise estatística dos resultados obtidos na morfometria, utilizou-se o teste denominado “t-student”, para médias de variáveis de duas amostras independentes, considerando uma probabilidade de erro em nível de 5% (Guedes & Guedes, 1978).

Em resumo, podemos ressaltar que o diabetes induzido por STZ em camundongos provocou uma diminuição significativa no peso corpóreo e um aumento da proteinúria, fato estes já relatados na literatura. A diminuição dos testículos foi significativa, sendo que houve uma redução no diâmetro dos túbulos seminíferos, enquanto que a glândula supra-renal apresentou-se aumentada significativamente, sendo confirmada através da morfometria, o aumento da zona fasciculada. Morfologicamente não observou-se alterações significativas nas glândulas estudadas. Podendo portanto inferir que o aumento do córtex das glândulas supra-renais está de acordo com a quantidade de esteróides sintetizados, devido a proximidade das origens

embriológicas entre essas glândulas e as gônadas. Pequenas quantidades de hormônios sexuais secretados pela glândula supra-renal suplementam os hormônios sexuais gonadais.

Este trabalho poderá ter continuidade, através de estudos considerando um maior tempo de manutenção do animal no estado diabético, tendo em vista os resultados de Kataoka et al. (1996) e os nossos resultados; e ainda o fato da literatura mostrar que em outros órgãos de camundongos, ocorreram severas alterações morfológicas.

Novos estudos sobre as glândulas supra-renais, testículos e ovários, podem ser realizados considerando o diabetes experimental e espontâneo, para camundongos machos e fêmeas, observando-se, um tempo maior do animal sob o estado diabético e as dosagens hormonais; além de estudos histoquímicos sobre as terminações nervosas das referidas glândulas.

6 - Conclusões

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. Houve uma significativa diminuição no peso corpóreo médio dos animais diabéticos, quando comparados aos animais que serviram de controle.
2. O aumento da proteinúria na urina dos animais diabéticos (STZ), foi significativo.
3. As glândulas supra-renais dos camundongos diabéticos apresentaram aumento médio em seu peso e tamanho, ao serem comparadas com aquelas dos animais controle.
4. Não houve alterações morfológicas relevantes nas 3 zonas do córtex e na medula das glândulas supra-renais, em nível de microscopia de luz e eletrônica de transmissão.
5. Morfologicamente o córtex total das glândulas supra-renais, revelou um aumento significativo, mas somente na zona fasciculada é que esse aumento foi significativo.
6. A análise morfométrica e estatística sugeriu um aumento significativo do número das células da zona fasciculada.
7. Os testículos dos animais diabéticos pela STZ apresentaram uma diminuição significativa em seus tamanhos e pesos, reação oposta àquela observada nas glândulas supra-renais.

8. Morfologicamente não houve alterações relevantes nos túbulos seminíferos e nas células de Leydig, em nível histológico e ultra-estrutural.
9. Os estudos morfométricos nos testículos mostraram que houve uma redução significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos.

7 - Bibliografia

- ANDERSON, T.; SCHEIN, P.S.; McMENAMIN, M.G. and COONEY, D.A. Streptozotocin diabetes: correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Clin. Invest.*, v. 54, p.672-677, 1974.
- APPEL, M.C.; SCHIBLY, B.A.; KAMARA, J.A. and SORENSON R.L.. Adrenal gland involvement in mice with hereditary obesity and Diabetes Mellitus. *Diabetologia*, v. 16, p. 391-398, 1979.
- ARDUÍNO, F. *Diabetes Mellitus e suas complicações*. Livraria Atheneu S/A, p. 01-78, 1980.
- ARIMURA, A.; SAITO, T.; BOWERS, C.Y. and SCHALLY, A.V. Pituitary – Adrenal activation in rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus. *Acta Endocrinologica*, v. 54, p. 155-165, 1967.
- BADDELEY, A.J.; GUNDERSEN, H.J.G. and CRUZ-ORIVE, L.M. Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of Microscopy*, v. 142, n. 3, p. 259-276, 1986.
- BERQUIST, N. The gonadal function in male diabetic. *Acta Endocrinologica* (Suppl.), v. 18, n. 3, p. 29, 1954.
- BESTETTI, G. and ROSSI, G.L. Hypothalamic lesions in rats with long-term streptozotocin-induced Diabetes Mellitus. *Acta Neuropathologica (Berl)*, v. 52, p. 119-127, 1980.
- BRAND, C.L.; ; ROLIN, B.; JORGENSEN, P.N.; SVENDSEN, I.; KRISTENSEN, J.S., AND HOLST, J.J. Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, v. 37, p. 985-993, 1994.

- CAMARGO, A.M. Estudo Histológico, Histoquímico e Ultra-estrutural dos efeitos da Diabetes espontânea e induzida pela alloxana ou estreptozotocina sobre as glândulas submandibulares de camundongo. (Tese de Livre-Docência – Unicamp) Campinas, 1984.
- CARSON, K.A. Citochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in na hereditary mouse model for diabetes mellitus. A dissertation submitted to the faculty oh the University of North Carolina at Chapel Hill. Doctor of Philosophy. Chapel Hill, N.C. USA, 1979.
- CREUTZFELDT, W.; KOBBERLING, J. and NEEL, J. *The Genetics of Diabetes Mellitus*. New York, Springer Verlag, 1976.
- DEANE, H.W. In *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*.(O.Eichler and A. Farah, eds), Vol. 14, part 1, Springer-Verlag, Berlin and New York, p.1-185, 1962.
- DE NICOLA, A.F.; FRIDMAN, O.; DEL CASTILHO, E.J. and FOGLIA, V.G. The influence of streptozotocin diabetes on adrenal function in male rats. *Horm. Metab. Res.*, v.8, p. 388-392, 1976.
- DE NICOLA, A.F.; FRIDMAN, O.; DEL CASTILHO, E.J. and FOGLIA, V.G. Abnormal regulation of adrenal function in rats with streptozotocin diabetes. *Horm. Metab. Res.*, v. 9, p. 469-473, 1977.
- DEVERCERSKI, M. and FRAWLEY, T.T. Adrenal steroid production in rats with alloxan diabetes. *Endocrinology*, v. 73, p. 386-391, 1963.
- DUBOC, P.; MOBLEY, P.W.M. and MAHLER, R.J. Elevated glucocorticoids in obese-hyperglycemic mice. *Horm. Metab. Res.*, v. 7, p. 102, 1975.
- DUPRIEST Jr., R.W.; HUNTINGTON, M.C.; MASSEY, W.H.; WEISS, A.J.; WILSON, W.L. and FLETCHER, W.S. Streptozotocin therapy in 22 cancer patients. *Cancer*, v. 35, p. 358-367, 1975.
- ELLENBERG and RIFKIN, 1962. Appud CARSON, K.A. Citochemical and cytopathological studies of nerve, vascular and salivary gland tissues in na hereditary mouse model for diabetes mellitus. A dissertation submitted to the faculty oh the University of North Carolina at Chapel Hill. Doctor of Philosophy. Chapel Hill, N.C. USA, 1979.

- FAERMAN, I.; VILAR, O.; RIVAROLA, A.; ROSNER, J.M.; JADZINSKY, M.N.; FOX, D.; PEREZ-LLORET, A.; BERNSTEIN-HAHAN, L. and SARACINI, D. Impotence and diabetes: Studies on androgenic function in diabetic impotent males. *Diabetes*, v. 21, p. 23-30, 1972.
- FICHER, M.; ZUCKERMAN, M.; FISHKIN, R.E.; GOLDMAN, A.; NEEB, M.; FINK, P.J.; COHEN, S.N.; JACOBS, J.A. and WEISBERG, M. Do endocrines play an etiological role in diabetic and nondiabetic sexual dysfunctions. *J. Androl.*, v. 5, p. 8-16, 1984.
- FOGLIA, V. G.; ROSNER, J.H.; CATTANEO DE PERALTA ROMAS, M. and LEMA, B.C. Sexual disturbances in male diabetic rats. *Horm. Metab. Res.*, v. 1, p. 72-77, 1969.
- FORD, W.C.L. and HAMILTON, D.W. The effect of experimentally induced diabetes on the metabolism of glucose by seminiferous tubules and epididymal spermatozoa from the rat. *Endocrinology*, v. 115, p. 716-722, 1984.
- GAULTON, G.N.; SCHWARTZ, J.L. and EARDLEY, D.D. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. *Diabetologia*, v. 28, p. 769-775, 1985.
- GLAUERT, A.M. *Practical Methods in Electron Microscopy*, North-Holland Publication Company, Amsterdam, 1975.
- GOLD, G.; MANNING, M.; HELDT, A.; NOWLAIN, R.; PETTIT, J.R. and GRODSKY, G.M. Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin: lack of protection by exogenous superoxide dismutase. *Diabetes*, v. 30, p. 634-638, 1981.
- GRODSKY, G.M. et al. Metabolic and underlying causes of Diabetes Mellitus. *Diabetes*, v. 31, (Suppl 1), p. 45-53, 1982.
- GUEDES, M.L.S. e GUEDES, J.S. *Bioestatística: para profissionais de saúde*. Ao Livro Técnico, Brasília: CNPq, 1988.
- HANKER, J.S.; CARSON, K.A. et al. Cytochemical correlates of structural sexual dimorphism in glandular tissues of the mouse. *Histochemistry*, v. 68, p. 99-118, 1980.
- HAUSBERGER, F.X. and HAUSBERGER, B.C. The etiologic mechanism of some forms of hormonally induced obesity. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 8, p. 671-679, 1960.

- HELLMAN, B.; JACOBSSON, L. and TÄLJEDAL, I.B. Endocrine activity of the testis in obese-hyperglycaemic mice. *Acta Endocrinologica*, v. 44, p. 20-26, 1963.
- HERBERG, L. and COLEMAN, D. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism*, v. 26, p. 59-99, 1977.
- HILTON, F.; GIAMMARA, B.; WRIGHT, B.; CAMARGO, A.M. and HANKER, J.S. Effects of spontaneous and alloxan diabetes on mouse submandibular glands. *J. Dent. Res.*, v. 60, p. 357, 1981.
- HO, S. Prostatic androgen receptor and plasma testosterone levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, v. 38, n. 1, p. 67-72, 1991.
- HOWLAND, B.E. and ZEBROWSKI, E.J.. Some effects of experimentally-induced Diabetes on Pituitary-Testicular relationships in rats. *Horm. Metab. Res.*, v.8, p.465-469, 1976.
- HUNT, E. and BAILEY, D.W. The effects of alloxan diabetes on the reproductive system of young male rats. *Acta Endocrinologica*, v. 38, p. 432-440, 1961.
- JEAN, C.; ROY, D. and NADEAU, A. Diminished diabetogenic effect of streptozotocin in adrenalectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 72, p.992-998, 1994.
- KANETY, H.; MOSHE, S.; SHAFRIR, E. and KARASIK, A. Hyperinsulinemia INDUCES a reversible impairment in receptor function leading to diabetes in the some rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 1853-1857, 1994.
- KATAOKA, Y.; IKEHARA, Y. and HATTORF, T. Cell proliferation and renewal of mouse adrenal cortex. *J. Anat.*, v. 188, p. 375-381, 1996.
- KOLODNY, R.C.; KAHN, C.G.; GOLDSTEIN, H.H. and BARNETT, D.M. Sexual dysfunction in diabetic men. *Diabetes*, v. 23, p. 306-309, 1974.
- KRAUS, S.D. Adrenal and plasma corticosterone and pituitary and plasma ACTH in alloxan diabetic rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 143, p. 460-464, 1973.
- KÜHN-VELTEN, N.; WALDENBURGER, D. and STAIB, W. Evaluation of steroid biosynthetic lesions in isolated Leydig cells from the testes of streptozotocin-Diabetic rats. *Diabetologia*, v. 23, p. 529-533, 1982.

- LEITER, E.H. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: Influence of inbred background, Sex, and thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 630-634, 1982.
- LISATO, G.; CUSIN, I.; TIENGO, A., et al. The contribution of hyperglycaemia and hypoinsulinaemia to the insulin resistance of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, v. 35, p. 310-315, 1992.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. *Metodos Quantitativos em Morfologia*, EdUERJ. Rio de Janeiro, 1995.
- MORDES, J.P. and ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. *Am. J. Med.*, v. 70, p. 353-60, 1981.
- NAEYE, R.L. Organ abnormalities in a diabetic mice. *Am. J. Path.*, v. 52, p. 41-42, 1968.
- MOTTA, P.; MASAKI, M. and TSUNEO, F. Three Dimensional Organization of Mammalian Adrenal cortex. *Cell Tissue Res.*, v. 196, p. 23-28, 1979.
- NUSSDORFFER, G.G. The adrenal cortex of normal adult vertebrates. *International Review of Cytology*, v. 98, p. 1-233, 1986.
- OBERG, K.; LUNDQVIST, G. and BOSTROM, H. The effects of streptozotocin in the treatment of endocrine pancreatic tumours and carcinoids. In: AGARWAL, M.K. ed. *Streptozotocin: Fundamentals and Therapy*. Amsterdam, Elsevier and North-Holland Biomedical, 1981, cap. 19.
- OKSANEN, A. Testicular lesions of Streptozotocin Diabetic rats. *Hormone Res.*, v. 6, p. 138-144, 1975.
- ORTH, J.M.; MURRAY, F.T. and BARDIN, W. Ultrastructural changes in Leydig cells of streptozotocin diabetic rats. *Anat. Rec.*, v. 195, p. 415-430, 1979.
- PAIK, S.G.; MICHELIS, M.A.; KIM, Y.T. and SHIN, S. Induction of insulin-dependent Diabetes by streptozotocin. *Diabetes*, v. 31, p. 724-729, 1982.
- PAZ(FRENKEL), G.; HOMONNAI, Z.T.; DRASNIN, N., et al. Fertility of the Streptozotocin-Diabetic Male rat. *Andrologia*, v. 10, n. 2, p. 127-136, 1978.
- PEREZ DIAZ, J.; BENITEZ, A. and FERNANDEZ GALAZ, C. Effect of streptozotocin Diabetes on the Pituitary-Testicular axis in the rat. *Horm. Metabol. Res.*, v. 14, p. 479-482, 1982.

- RATSIMAMANGA, A.R. Variations de l'activité de la surrénale dans différentes formes de diabète chez la souris. *C.R. Acad. Sc.*, v. 269, n. 3, p. 1781-1784, 1969.
- REBUFFAT, P.; BELLONI, A.S. et al. Effects of streptozotocin-induced experimental diabetes on the morphology and function of the zona fasciculata of rat adrenal cortex. *Virchows Archiv B*, v. 56, p. 13-19, 1988.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, v. 17, p. 208, 1963.
- RICHARDSON, K.C.; JARRET, L. and FINKE, E.H. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, v. 35, p. 313-323, 1960.
- ROBBINS, S.; KUMAR, V. e COTRAN, R. *Pathologic Basis of Disease*, 4ª edição. W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 992-1010, 1989.
- ROSSI, G.L. and AESCHLIMANN, M. Morphometric Studies of Pituitary gland and Testes in rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Andrologia* v. 14, n. 6, p.523-542, 1982.
- ROSSINI, A.A.; APPEL, M.C.; WILLIAMS, R.M. and LIKE, A.A. Genetic influence of the streptozotocin-induced insulitis and hyperglycemia. *Diabetes*, v. 26, p. 916-20, 1977.
- ROSSINI, A.A.; WILLIAMS, R.M.; APPEL, M.C. and LIKE, A.A. Sex differences in the multiple-dose streptozotocin model of Diabetes. *Endocrinology*, v. 103, n. 4, p. 1518-1520, 1978.
- SCHEIN, P.S.; CONNELL, M.J.O.; BLOM, J.; HUBBARD, S.; MAGRATH, I.T.; BERGEVIN, P.; WIERNIK, P.H.; ZIEGLER, J.L. and DEVITA, V.T. Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin. *Cancer*, v. 34, p. 993-1000, 1974.
- SCHÖFFLING, K.; FEDERLIN, K.; DITSCHUNEIT, H. and PFEIFFER, E.F. Disorders of sexual function in male Diabetics. *Diabetes*, v. 12, n. 6, p. 519-527, 1963.
- SCHÖFFLING, K.; FEDERLIN, K.; SCHMITT, W. and PFEIFFER, E.F. Histometric investigations on the testicular tissue of rats with alloxan-diabetes and Chinese hamsters with spontaneous diabetes. *Acta Endocrinologica* (Kbh.), v. 54, p. 335-346, 1967.

- SCRIBNER, K.A.; WALKER, C.D.; CASIO, C.S. and DALLMAN, M.F. Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology*, v. 129, n. 1, p. 99-108, 1991.
- SHAFRIR, E. Development and consequences of insulin resistance: lessons from animals with hyperinsulinaemia. *Diabetes & Metabolism*, v. 22, p. 122-131, 1996.
- SHIMOMURA, Y.; BRAY, G.A. and MARGIE L.. Adrenalectomy and Steroid Treatment in Obese (ob/ob) and Diabetic (db/db) mice. *Horm. Metabol. Res.*, v.19, p. 295-299, 1987.
- SODEMAN Jr., W.A. and SODEMAN, T.M. *Fisiologia Patológica de Sdeman*. Trad. De Ana Maria de Andrade e outros. Rio de Janeiro, Interamericana, p.392-393, 1983
- STEGER, R.W. and RABE, M.B. The effect of Diabetes Mellitus on endocrine and reproductive function. *P.S.E.B.M.*, v. 214, p. 1-11, 1997.
- STEINBERGER, A. G. Response to cortisone in prediabetes: glucose, steroid-glucose tolerance in subjects whose parents are both diabetic. *Diabetes*, v. 9, n. 5, p. 379, 1960.
- STOLINSKY, D.C.; SADOFF, L.; BRAUNWALD, J. and BATEMAN, J. Streptozotocin in the treatment of cancer: Phase II study. *Cancer*, v. 30, p. 61-67, 1972.
- THLIVERIS, J.A.; PAZ, G.F.; REMPEL, E. and FAIMAN, C. An extra-Pancreatic effect of streptozotocin on the hypothalamo-hypophyseal-testicular axis in the rat. *Anat. Anz, endocrinology*, v. 157, p. 213-219, 1984.
- WHISH, W.J.D. DAVIES, M.I. and SHALL, S. Estimulation of poly (ADP-ribose) polymerase activity by the anti-tumor antibiotic, streptozotocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 65, p. 722-730, 1975.
- WILKE, R.A.; RILEY, D.A.; LELKES, P.I. and HILLARD, C.J. Decreased catecholamine secretion from the adrenal medullae of chronically diabetic BB-Wistar rats. *Diabetes*, v. 42, p. 862-868, 1993.
- ZANATO, V.F.; MARTINS, M.P.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; PETENUSCI, S.O. and LAMANO-CARVALHO, T.L. Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v. 27, n. 5, p. 1273-1280, 1994.

ZIV, E.; SHAFRIR, E. From sand rats to diabetic patients: is non-insulin-dependent diabetes mellitus a disease of the β cell. *Diabetes & Metabolism*, v. 23, p. 331-332, 1997.