

FERNANDA PICULO

**EFEITO DO DIABETE MODERADO NA MATRIZ
EXTRACELULAR E NO MÚSCULO ESTRIADO
URETRAL EM RATAS PRENHES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia. Área de concentração: Tocoginecologia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge

Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Piculo, Fernanda.

Efeito do diabete moderado na matriz extracelular e no músculo estriado uretral em ratas prenhes / Fernanda Piculo. – Botucatu : [s.n], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marilza Vieira Cunha Rudge

Coorientador: Débora Cristina Damasceno

Capes: 40101150

1. Diabetes – Complicações e consequências. 2. Matriz extracelular.
3. Músculos. 4. Aparelho geniturinário - Doenças. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Diabete; Matriz extracelular; Músculo estriado uretral; Prenhez; Ratas.

“A coisa mais feliz a se fazer é ser útil aos demais, tentando ultrapassar o maior obstáculo que é o medo, ocupando-se da distração mais bela que é o trabalho, seguindo pelo caminho mais rápido que é o correto, para no final ter a maior satisfação de dever cumprido.”

(Madre Teresa de Calcutá)



Dedicatória

À **Deus**, grande inspirador e fortalecedor desta obra.

Por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar que tudo é possível, por me manter fiel e não me deixar desistir nunca. Não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada. Os mais sinceros agradecimentos a Ti que me confiaste à vida.

Aos meus pais, **Ivonildo e Genilde**.

Que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a oportunidade de realizar meus sonhos e conquistas. Agradeço por toda educação, amor, incentivo, dedicação e paciência. A vida toda dedicarei minhas vitórias à vocês.

À minha irmã **Ana Paula**.

Pela presença, convívio, amizade e compreensão. Sempre estive ao meu lado, me apoiando e sendo a minha companheira em tudo. Você sabe como é difícil quando tenho que ficar longe de você. Obrigada por estar sempre comigo, me socorrer em tantos momentos e ser o meu porto seguro. Admiro muito o seu exemplo de responsabilidade, segurança, coragem e determinação.

À minha amiga-irmã **Gabi**.

Exemplo de amizade, companheirismo, afeto, força, generosidade, competência, incentivo e dedicação. Fica difícil expressar o meu agradecimento, a minha gratidão, o tamanho da minha admiração e tudo o que representa na minha vida. Sou profundamente grata pela indescritível solidariedade, continuado estímulo e grande parceria que contribuíram além da vivência científica. Aprendi muito com você. Obrigada por estar ao meu lado sempre e pelas inúmeras orientações, respostas, paciência e simples soluções quando os meus problemas pareciam ser gigantes. Obrigada por me incentivar e fazer acreditar que daria certo. Realmente deu, e você é parte essencial desse trabalho.



Agradecimentos

À **Profa. Dra. Marilza V.C. Rudge**, um agradecimento especial pela competência, clareza, objetividade e companheirismo com que conduziu este estudo. Obrigada por lapidar meu crescimento não só profissional, mas também pessoal. Pela excelente experiência, valiosos ensinamentos, paciência, dedicação e determinação, e, principalmente por acreditar em mim e por me fazer acreditar. Estendo o meu agradecimento ao carinho do seu esposo Dr. Aristides;

À **Profa. Dra. Débora C. Damasceno**, minha eterna admiração pela maneira como transmite seu conhecimento e suas experiências profissionais e de vida com dedicação, carinho e muita paciência. Muito obrigada pela co-orientação, dedicação e pelas valiosas contribuições para o meu crescimento científico, profissional e pessoal. Agradeço também seu marido Carlos e sua filha Dani, por momentos agradáveis de convivência;

À **Profa. Dra. Angélica M.P. Barbosa**, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, investimento e carinho nos anos de graduação e pela abertura das portas do mestrado. Obrigada pela sua amizade, por contribuir na minha formação pessoal e profissional e por ter acreditado em mim para que eu estivesse aqui hoje;

À **Profa. Dra. Selma M.M. Matheus**, pelo incrível carisma e exemplo pessoal e profissional. Muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receber de portas abertas e sempre estar à disposição, me apoiando e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Agradeço também a valiosa parceria estabelecida e por disponibilizar o Laboratório de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu para desenvolvimento parcial da metodologia;

Ao **Prof. Dr. Sérgio Luis Felsibino**, por toda atenção, paciência, disponibilidade e todos seus ensinamentos científicos e profissionais. Obrigada pela proveitosa parceria e por ter colocado a disposição seu Laboratório de Matriz Extracelular;

À **Profa. Dra. Iracema de Mattos P. Calderon e Prof. Dr. Adriano Dias**, por todos seus ensinamentos e atenção;

Aos **amigos** do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia que foram indispensáveis para esta conquista: Aline Bueno, Aline de Oliveira Netto, Bruna Dallaqua, Daniele Santos, Danny Laura Gomes Fagundes, Edlaine Cristina de Lego, Felipe Hiroshi Saito, Franciane Quintanilha Galego, Gabriela Marini, Glilciane Morceli, Isabela Lovizutto Iessi, Joice Vernini, Jusciele Brogin Moreli, Lessandra de Rosa Santos, Mariana Alvarez Arantes, Mikaela Corrêa, Rafael Bottaro Gelaleti, Rebeca Serrano, Silvana Barroso Corvino, Taís Tiemi Sato e Yuri Karen Sinzato, não apenas pela vivência científica, mas pelos momentos de descontração e pela certeza de poder contar com vocês;

Aos **amigos** do Laboratório de Matriz Extracelular, pela disponibilidade, atenção e importantes contribuições e ensinamentos, principalmente com a imunoistoquímica;

À **minha família**. Meus pais, Ivonildo e Genilde, pelo amor, dedicação e respeito com que me educaram e pelo maravilhoso exemplo de vida; Aos meus irmãos, Ana Paula e Júlio César, que compartilharam tantos momentos comigo e pelo estímulo constante. À minha avó Alice, exemplo de generosidade e amor verdadeiro. Aos meus tios e tias, em especial à tia Luiza, que sempre esteve muito presente em minha vida, acompanhando cada passo. Aos meus primos e primas, por estarem sempre presentes em todas as etapas e conquistas de minha vida. Pelas palavras de conforto, perseverança, por todo amor, apoio, confiança e motivação incondicional que sempre me impulsionam em direção às vitórias dos meus desafios. Agradeço pela paciência nos momentos em que estive ausente e por apostarem no meu potencial e me incentivar sempre;

A todos os meus amigos, especialmente às **amigas** Gabi, Aline, Bianca, Luana, Sueli, Juliana, Shelly, Marina, Taís, Bruna, Sueni e Michele e aos **amigos**

Marcelo, Rafael, Felipe, Juan, Evandro, Marcel e Thiago. Agradeço por todo apoio, momentos de alegria, companheirismo e afeto, mas, principalmente, por serem bons amigos, sempre;

Ao meu namorado **Renan**, por ter aparecido em minha vida e por todo amor, carinho, cumplicidade, apoio, paciência e compreensão dos inúmeros momentos dedicados a este trabalho;

Ao técnico da Anatomia, **Gelson**, pelo apoio, disponibilidade e atenção dedicados ao processamento do material de histologia, além do bom-humor diário e agradáveis momentos de descontração;

Aos integrantes do **Centro de Microscopia Eletrônica** do Instituto de Biociências de Botucatu, pela valiosa contribuição na preparação do material;

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia** (LAPGO) pela acolhida e concessão das dependências durante a realização deste trabalho;

Ao Instituto de Biociências de Botucatu- UNESP, em especial ao **Departamento de Anatomia e Morfologia** e ao **Centro de Microscopia Eletrônica** pela acolhida e concessão das dependências durante a realização deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Firouz Daneshgari** e à equipe do Departamento de Urologia da **Case Western Reserve University**, pela valiosa contribuição na análise do material e apoio científico durante o período de estágio de pesquisa no exterior;

Ao **Prof. Dr. Steven Sol Witkin** (Cornell University, USA), pela constante disponibilidade e pela revisão do inglês.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu**, pela simpatia e solicitude durante o período de pós-graduação;

À todos os **funcionários da Experimental** em especial à **Assistente de Suporte Acadêmico** do LAPGO: Talísia Moretto;

Ao serviço da **Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação** da Unesp, Campus de Botucatu pelo auxílio na elaboração da ficha catalográfica;

Aos docentes e funcionários do **Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP)**;

Aos **animais de laboratório** que involuntariamente cederam suas vidas para o estudo da ciência;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão das bolsas (Processo n°. 2010/13303-3) e estágio de pesquisa no exterior - BEPE (Processo n°. 2012/00099-4); e ao **Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro (Processo n°. 473673/2011-8).

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



Índice

Capítulo 1- Pesquisa translacional em *Diabetes mellitus* gestacional e hiperglicemia gestacional leve: conhecimento atual e nossa experiência..... 14

Capítulo 2- Urethral striated muscle and extracellular matrix morphologic characteristics among mild diabetic pregnant rats: translational approach 45

Abstract 46

Introduction 47

Materials and Methods 49

Results 54

Discussion 58

Conclusion..... 63

Acknowledgments..... 64

References 65

Capítulo 3- Atlas histológico da uretra de ratas..... 78

ANEXOS 101

ANEXO 1- Aprovação do Comitê de Ética 101

ANEXO 2- Ofício do envio para publicação do Capítulo 1 102



Capítulo 1

**PESQUISA TRANSLACIONAL EM *DIABETE MELLITUS* GESTACIONAL E
HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE: CONHECIMENTO ATUAL E NOSSA
EXPERIÊNCIA**

Marilza Vieira Cunha Rudge^{1*}, Fernanda Piculo¹, Gabriela Marini¹, Débora Cristina
Damasceno¹, Iracema Mattos Paranhos Calderon¹, Angélica Pascon Barbosa¹ e
Grupo de pesquisa “Diabete Clínico e Experimental”¹

¹ **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu -
Unesp**

*** Endereço para correspondência:**

Marilza Vieira Cunha Rudge

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP_Universidade Estadual Paulista

Distrito de Rubião Jr s/n 18.618-000, Botucatu, SP, Brasil

Telefone/Fax: (55-14)3880-1631

E-mail: marilzarudge@gmail.com

Este capítulo foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia** para a qual foi submetido.

RESUMO

O diabetes materno constitui um ambiente desfavorável para o desenvolvimento embrionário e feto-placentário. É uma repercussão de importância na obstetrícia moderna, visto que está associado a um risco aumentado de morbidade materna e neonatal e continua a ser um desafio médico significativo. O aumento mundial na incidência do diabetes, o aumento do diabetes tipo 2 em mulheres em idade reprodutiva e a geração cruzada da programação intra-uterina do diabetes tipo 2 são as bases para o interesse crescente na utilização de modelos experimentais diabéticos, a fim de obter conhecimento sobre os mecanismos que induzem as alterações de desenvolvimento no diabetes gestacional. Vários estudos têm demonstrado os benefícios da prevenção do diabetes com intervenções no estilo de vida, melhora metabólica e controle de fator de risco cardiovascular para evitar substancialmente as complicações devastadoras da doença. Apesar desses achados e a revolução recente no conhecimento científico e infinidade de novas terapias do diabetes, continua a haver uma grande lacuna entre o que foi aprendido através da pesquisa e o que é feito na prática da saúde pública, clínica e comunitária. O iminente impacto econômico negativo desta complacência nos indivíduos, nas famílias e nas economias nacionais é alarmante. Espera-se que a pesquisa translacional no binômio diabetes-gravidez seja implementada em centros de excelência tanto de pesquisa básica como aplicada e complementada por estudos clínicos multicêntricos, conduzidos de forma pragmática para aumentar o nível de evidência científica com recursos diagnósticos e propedêuticos mais confiáveis.

Palavras-chave: Diabetes, gestação, modelos animais, pesquisa translacional, incontinência urinária.

ABSTRACT

The maternal diabetes constitutes an unfavorable environment for the fetal-placental and embryonic development. It is an important repercussion in modern obstetrics, since it's associated to an increased risk of neonatal and maternal morbidity and it still is a significant medical challenge. The worldwide diabetes increased level, the increase of diabetes type 2 in reproductive age women and the crossed generation of the intrauterine programming from diabetes type 2 are the bases for the growing interest in the utilization of diabetics experimental samples, with the aim to acquire knowledge about the mechanisms that induce the development alterations at the gestational diabetes. Several studies have showed the benefits of the diabetes prevention, with interventions in the life style, metabolic improvement and control of the cardiovascular risk factor to substantially avoid this disease devastating complications. Despite these findings, the recent revolution in the scientific knowledge and the infinites new therapies for diabetes, there is still a large gap between what was learned through the researches and what is really done in the public, clinical and communitary health. The negative economic impact of this complacency in the people, families and national economies is alarming. It is expected that translational research in diabetes and pregnancy binomial are implemented in centers of excellence, in both basic and applied research, and complemented by multicenter clinical studies, conducted in a pragmatic way to increase the level of scientific evidence with more reliable diagnostic and propaedeutic resources.

Keywords: Diabetes, pregnancy, animal models, translational research, urinary incontinence.

1. INTRODUÇÃO

No século XXI, as pesquisas em obstetrícia estão voltadas para a solução de diversos problemas entre os quais se destaca a epidemia de diabete e obesidade no mundo, que tem repercutido no aumento das gestações complicadas por diabete (1). *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) é uma doença frequente na gestação, presente em cerca de 7% de todas as gestações e varia entre 1 a 14% de acordo com a população estudada e com os critérios diagnósticos utilizados. No Brasil, estima-se que 2,4 a 7,2% de todas as gestantes desenvolvem DMG, o que significa mais de 200.000 casos novos por ano (2). Vários autores mostraram a necessidade de se identificar as mulheres com potencial para desenvolver DMG devido ao maior risco de complicações maternas e fetais (3, 4). Existe clara evidência de que a exposição fetal ao ambiente intrauterino adverso aumenta a susceptibilidade de desenvolvimento de doenças crônicas futuramente. Mulheres com DMG e seus descendentes são mais propensos a desenvolver síndrome metabólica ou *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) na vida futura (5). O DMG está também associado com altos níveis de incontinência urinária (IU) e disfunção muscular do assoalho pélvico, entretanto, ainda não estão bem definidos os mecanismos pelos quais o DMG contribui para a IU.

Apesar da revolução recente no conhecimento científico e infinidade de novas terapias do DMG, há grande lacuna entre o que foi encontrado nas pesquisas e o que é feito na prática da saúde pública, clínica e comunitária (6, 7). Os modelos experimentais, que tem por objetivo aumentar o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças que afetam seres humanos, podem levar ao desenvolvimento de estratégias de tratamento para manter o metabolismo desse ambiente intra-uterino o mais próximo possível do normal e melhorar o desenvolvimento perinatal a curto e longo prazo (8). Esses modelos experimentais permitem também o aprofundamento do conhecimento da repercussões do DMG no organismo materno.

O DMG é um bom exemplo para se analisar a pesquisa translacional visto que é uma das principais causas de morbidade e mortalidade perinatal, bem como da repercussão a longo prazo na vida da mulher (9, 10). A intrincada relação entre o que se observa na prática da atividade clínica e o que se obtém de resultados em pesquisa clínica e de investigação em ciência básica devem ser organizados e analisados dentro de um contexto único que, nos dias de hoje, é denominado “Pesquisa Translacional”.

2. PESQUISA TRANSLACIONAL

Nas últimas décadas, as iniciativas para o desenvolvimento da pesquisa em saúde têm se multiplicado em todo o mundo com o objetivo de melhorar a qualidade da assistência prestada, a segurança dos pacientes e influenciar políticas de saúde mais efetivas. Pesquisas baseadas em evidências, pesquisas clínicas, revisões sistemáticas têm o mesmo objetivo: responder questões da prática profissional trazendo a ciência para a prática clínica. Porém, a despeito de todo o conhecimento produzido, do financiamento e do envolvimento dos pesquisadores, existe uma distância entre estes e a implementação dos resultados das pesquisas realizadas (11). A pesquisa translacional ou, no seu original em inglês, *translational research*, surge para tentar romper esta distância e aproximar o pesquisador dos campos da prática (11).

Pesquisa translacional é um termo utilizado para descrever o espectro de investigação científica destinada a: 1) transferência de descobertas laboratoriais sobre os mecanismos da doença em novos métodos para diagnosticar, prevenir e tratar doenças e testar esses métodos em seres humanos - é a fase descrita como “*bench to bedside*” (12), 2) trazer os resultados dos estudos para a prática clínica e compreender a eficácia e a disseminação de intervenções nos cuidados à saúde - é a fase descrita como “*clinical research to real-world practice*” (13) e 3)

utilizar o conhecimento adquirido para melhorar a política de saúde (14). Um outro espectro deveria ser incorporado, destinado a investigar achados clínicos novos ou doenças emergentes com a criação de novos modelos experimentais - é a fase que seria descrita como “*bedside to bench*”. Assim teremos na pesquisa translacional: do “*bench to bedside*” (12), do “*clinical research to real-world practice*” (13) e do “*bedside to bench*”. Assim, a pesquisa translacional pode ser considerada um mecanismo para transformar o conhecimento disponível em medidas úteis para a prática da saúde clínica e pública diárias (15).

A mudança é determinada de acordo com a forma como são transmitidos os novos conhecimentos: desde o ideal até o sub-ótimo possível que permite que o sistema de saúde incorpore e que os médicos recebam os *guidelines* que os auxiliarão no atendimento ao doente (16). As organizações governamentais e não-governamentais têm a responsabilidade de comunicar estratégias comprovadas e avaliá-las nas comunidades do mundo real através da pesquisa translacional. Esta permite avaliar os padrões de atendimento, entender as barreiras da sua implementação e intervir em todos os níveis de prestação de cuidados de saúde para melhorar a qualidade dos serviços, bem como a qualidade de vida. Existem pelo menos três aspectos necessários para o sucesso na implementação clínica da pesquisa translacional: o paciente, o provedor e o sistema de saúde atuando em conjunto de modo flexível para os ajustes necessários (17).

Embora o termo Pesquisa Translacional seja recente, a noção de “transferência de resultados de pesquisa” vem sendo discutida desde as décadas de 1970 e 1980 nos Estados Unidos e também no Brasil, nos Seminários Nacionais de Pesquisa (18). A primeira publicação sobre pesquisa translacional foi veiculada no editorial do *Journal of the American Medical Association* (JAMA) em 2002, quando foi declarada essencial para melhorar a saúde humana - “necessidade de tradução de novos conhecimentos, mecanismos e técnicas geradas pelo avanço nas pesquisas básicas de modo a oferecer novas possibilidades de prevenção,

diagnóstico e tratamento das doenças”. A partir desta publicação, as demais áreas da saúde passaram a se questionar mais acuradamente sobre formas de conduzir esta “tradução” para a prática assistencial (19).

Em 2005, foi criado o *The Translational Research Working Group* (TRWG) (Grupo de Trabalho em Pesquisa Translacional), ligado ao Instituto Nacional de Câncer dos EUA, com o objetivo de incentivar e financiar pesquisas translacionais nesta área específica. A Universidade de Washington criou, em 2007, o *Institute of Translational Health Sciences* (ITHS) (Instituto de Ciências Translacionais) para o fortalecimento da medicina genética. Também foram criados dois periódicos em 2009, o *Translational Research – The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* e o *The American Journal of Translational Research* (20, 21).

3. PROBLEMÁTICA DA PESQUISA TRANSLACIONAL NA PRÁTICA CLÍNICA

A importância da política de saúde e práticas de assistência à saúde na melhor evidência internacional disponível ("assistência à saúde baseada em evidências") e a tradução do conhecimento ou evidências em ação ("ciência translacional" ou "pesquisa translacional") estão sendo enfatizadas em todos os setores de saúde interna dos países. Saúde baseada em evidências é um processo que identifica questões políticas ou clínicas e aborda estas questões na geração de conhecimento e evidências eficazes e adequadas para fornecer cuidados à saúde de maneira eficaz, viável e significativa para populações e culturas específicas. Esta evidência é avaliada, sintetizada e transferida para os ajustes de prestação de serviço aos profissionais de saúde que, em seguida, utilizam e avaliam seu impacto sobre os resultados da saúde, sistemas de saúde e a prática profissional (22). Há sete anos o Ministério da Saúde (MS) no Brasil financia, a partir de contratações diretas ou chamadas públicas com o CNPq, a produção de

revisões sistemáticas de temas priorizados pelos gestores de saúde para subsidiar a tomada de decisão. Segundo Elias (2012), ainda é baixa a utilização das revisões sistemáticas como informação para decisão no comitê de incorporação de tecnologias do MS no Brasil (23).

Os desafios para facilitar o ciclo de descoberta científica via inovação nos cuidados à saúde tornaram-se uma preocupação central para os indivíduos e comunidades que procuram ou precisam de saúde, profissionais de saúde, decisores políticos e financiadores dos serviços de saúde. Na verdade, a interface entre as necessidades de conhecimento para identificar a melhoria da saúde, pesquisa científica pura, pesquisa baseada em estudo clínico e, finalmente, a implementação dos resultados da investigação em alguma forma de resultado pragmático é fonte crescente de angústia permanente em pesquisa clínica e comunitária. É uma empresa vital que, se bem sucedida, tem o potencial para resultar em melhorias dramáticas nos resultados globais de saúde (22).

Apesar dos avanços importantes na biologia fundamental, existe preocupação generalizada com a lentidão que essas descobertas são traduzidas em intervenções clínicas seguras e eficazes. O *National Institutes of Health* (NIH) estima que 80 a 90% dos potenciais terapêuticos em testes pré-clínicos detectam problemas que os impedem de avançar para a fase de ensaio clínico. Numerosas iniciativas para acelerar esta fase estão em andamento para fornecer aos pesquisadores clínicos o conhecimento e ferramentas necessárias na tradução das descobertas da pesquisa em melhor atendimento ao paciente (14). A criação da Rede Nacional de Pesquisa Clínica no Brasil é um exemplo das iniciativas do MS para acelerar a implementação de novos fármacos e novos métodos diagnóstico no SUS.

No entanto, uma série de obstáculos - científico, institucional, cultural e político - limitam as oportunidades para os investigadores básicos conduzirem a ciência translacional. Este trabalho é melhor realizado com as colaborações multi e interdisciplinares, que podem ser difíceis de estabelecer e de se manter no ambiente de pesquisa atual.

Para tratar dessas questões, a Federação das Sociedades Americanas de Biologia Experimental (FASEB) realizou um simpósio em março de 2011, que reuniu os pesquisadores e estagiários de pesquisa básica, chefes de departamento e líderes de diversas instituições de pesquisa acadêmica, líder das organizações de financiamento de pesquisas públicas e privadas, organizações de investigação farmacêutica, sociedades científicas e editores científicos. Os participantes exploraram os benefícios de se engajar cientistas básicos na pesquisa translacional, os obstáculos que se interpõem em seu caminho e os papéis que as instituições de pesquisa, financiadores, sociedades profissionais e os editores científicos podem desempenhar para ajudar os cientistas básicos a superar esses obstáculos. Em conclusão, o treinamento adicional, os recursos e apoio permitirão aos cientistas básicos mover as suas descobertas para a frente de forma eficaz e eficiente. A comunidade de pesquisa deve ampliar as oportunidades de pesquisa translacional para pesquisadores básicos, que atuam na pesquisa de bancada e estagiários; facilitar o seu acesso ao financiamento, equipamentos, infra-estrutura e outros recursos necessários para a tradução; incentivar e apoiar a colaboração entre investigadores básicos e clínicos através das disciplinas de pesquisa e setores, reconhecer e premiar cientistas básicos para as contribuições que fazem para este campo em expansão (14).

A pesquisa translacional está se dirigindo a um dos principais desafios do mundo médico e educacional de hoje: reduzir as lacunas entre o conhecimento científico e as estratégias efetivas nos cuidados à saúde que melhorem os resultados dos pacientes (15).

4. DMG, HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE E PESQUISA TRANSLACIONAL

Os riscos associados com o DMG são bem reconhecidos, no entanto o impacto na saúde materna e neonatal precisa ser melhor esclarecido. Mulheres com diabetes gestacional são classificadas como grávidas de risco, pois apresentam altos índices de morbidade e maior potencial para intolerância à glicose, identificando população de mulheres com alto risco de desenvolver DM2 após a gravidez (24).

A pergunta que levou nosso Grupo de Pesquisa Acadêmico “Diabete e Gravidez - Clínico e Experimental” a iniciar pesquisa translacional foi a identificação de grupo de gestantes que não atingiam os critérios de diagnóstico de DMG, mas apresentavam hiperglicemia ao longo do dia após ingestão de dieta constituída por carboidratos, lipídios e proteínas. Os recém-nascidos dessas gestantes tinham as mesmas repercussões perinatais dos nascidos de mães com DMG, com ênfase especial à macrossomia e mortalidade perinatal. Ao longo dos anos também foram identificadas três outras características dessas gestantes: 1- risco de desenvolver DM2 após 10 a 12 anos da gestação-índice era similar ao das DMG; 2- hiperinsulinemia persistente após o parto nas gestantes com Hiperglicemia Gestacional Leve (HGL); 3- características clínicas ao nascimento e ao longo da vida dessas mulheres sugerindo que ambos os grupos (DMG e HGL) eram similares e apresentavam características da Síndrome Metabólica (25, 26).

Estudos em seres humanos que exploram os mecanismos responsáveis por alterações causadas pelo diabete na gravidez são limitados por razões éticas e também pela multiplicidade de variáveis não controladas que podem modificar o ambiente intra-uterino (27). Restrições éticas não permitem que aspectos invasivos fundamentais sejam explorados,

assim, há necessidade de modelos animais apropriados para melhor compreensão do diagnóstico, fisiopatologia e novos fármacos para o tratamento do diabetes.

4.1. DMG e as repercussões maternas, neonatais e placentárias nos modelos experimentais

Macrossomia e mortalidade perinatal: A experiência inicial em Pesquisa Translacional foi relacionada com a montagem de modelo experimental para reproduzir a macrossomia fetal encontrada nas gestantes com DMG e nas portadoras de HGL.

A primeira dificuldade foi a obtenção de animais prenhes diabéticos, pois as ratas com diabetes grave não ciclam e, portanto, a obtenção de prenhez é difícil sendo necessário utilizar grande número de animais nos experimentos (28). Após o domínio inicial das técnicas de indução do modelo de diabetes e prenhez, diversos projetos foram realizados em nosso laboratório de pesquisa experimental para avaliar os resultados maternos, placentários e fetais do diabetes na prenhez de ratas. O pioneiro foi a tese de mestrado de Calderon em 1983, utilizando os dois modelos de diabetes (grave e moderado), que avaliou as repercussões maternas, fetais e placentárias, diferentes nos dois níveis de hiperglicemia (28).

As dificuldades apareceram quando as ratas com diabetes grave mostraram-se modelos de restrição de crescimento intra-uterino e apenas as ratas com diabetes moderado apresentaram macrossomia fetal após indução do diabetes com aloxana (dose de 42mg/kg). Para a identificação dessa macrossomia fetal foi necessário classificar os pesos dos RN, de acordo com a média $\pm 1,0$ x desvio-padrão (DP) dos pesos corporais obtidos do grupo controle, que determinou três classes diferentes de RN dentro dos grupos estudados: pequeno para idade de prenhez (PIP), cujo peso foi inferior a média $-1,0$ x DP; adequado para idade de prenhez (AIP), cujo peso foi compreendido entre a média $\pm 1,0$ x DP e grande para a idade de prenhez (GIP), cujo o peso foi maior que a média $+1,0$ x DP) (29).

O grupo diabetes grave apresentou menor número de fetos vivos, aumento do número de mortes embrionárias e alta taxa de perda pós-implantação. Portanto, o modelo de diabetes grave na prenhez, caracterizado pela restrição do crescimento intra-uterino, reproduziu os resultados maternos e fetais de gestantes com diabetes clínico não controlado (30, 31).

O grupo diabetes moderado apresentou maior peso fetal e recém-nascidos grandes para a idade de prenhez simulando o DMG e a HGL. O modelo de diabetes moderado causou hiperglicemia leve durante a prenhez similar ao das gestantes com DM2 ou DMG e embora seja modelo de macrossomia fetal, os percentuais de fetos macrossômicos não ultrapassaram 50% (8). O comportamento desses níveis de hiperglicemia evidencia a intolerância à glicose no terço final da prenhez, época do aparecimento do DMG (32).

Muito interessantes também foram os resultados dos pâncreas fetais. Os provenientes de ratas com diabetes moderado tinham ilhotas pancreáticas maiores, com grande quantidade de insulina. Os pâncreas de filhotes de ratas com diabetes grave, embora com ilhotas grandes, não apresentavam insulina, ou seja, a ilhota entrou em falência total liberando toda a insulina produzida. Esse achado explica que o modelo do diabetes moderado está relacionado à hipoglicemia neonatal, enquanto nos casos de diabetes grave há o aparecimento de hiperglicemia fetal no berçário que precisa ser tratado com insulina (33).

Na tentativa de melhorar o resultado nos modelos experimentais em relação à macrossomia fetal, outros modelos experimentais foram realizados em nosso laboratório para esclarecer os efeitos do diabetes moderado na prenhez de ratas e, conseqüentemente, possibilitar melhor entendimento clínico. Devido aos efeitos adversos da aloxana e a pouca margem de segurança entre a dose letal e a dose eficaz para obtenção do quadro diabético, foi utilizada a droga beta-citotóxica *streptozotocin* (STZ), que é capaz de inibir a síntese de pró-insulina nas células β -pancreáticas, não causa dano em outros tecidos do organismo e mostra ser mais eficaz para indução do modelo de diabetes experimental. Iessi *et al.* (2010)

observaram que a indução do diabetes moderado no período neonatal alterou o desenvolvimento fetal, caracterizado por restrição de crescimento intra-uterino e níveis glicêmicos que não levaram aos principais defeitos congênitos nos fetos de ratas diabéticas (34). Saito *et al.* (2010), com outro modelo de indução de diabetes moderado (administração de STZ no período neonatal e na prenhez), constataram impacto negativo sobre o desempenho reprodutivo materno, restrição de crescimento intra-uterino e desenvolvimento fetal prejudicado (35). Damasceno *et al.* (2011) confirmaram que o ambiente hiperglicêmico materno causou alterações metabólicas, incluindo aumento de triglicerídeos e colesterol total e elevação do estresse oxidativo, contribuindo para aumentar anomalias viscerais fetais (36).

Vários grupos de pesquisa evidenciam estudos experimentais com incidência de 60% a 75% de macrossomia nas ninhadas de animais diabéticos (37, 38). Em nosso laboratório, após várias tentativas usando modelos descritos na literatura e avaliando os resultados obtidos, foi verificado que o modelo que mais se aproxima do DMG é o do diabetes induzido por STZ no período neonatal, na dose de 100 mg/kg no 1º dia de nascimento por via subcutânea (36).

Na pesquisa translacional, os modelos animais fornecem o caminho, mas cabe aos pesquisadores utilizarem modelos mais adequados em experiências construídas e com base em hipóteses que permitam a interpretação correta em torno de problemas clínicos sob investigação. Portanto, as investigações em pesquisa translacional com animais devem ser integradas com perguntas decorrentes das observações em humanos e os achados pré-clínicos validados (39).

Imaturidade pulmonar fetal: É bastante difundida a elevada prevalência de distúrbios respiratórios em filhos de mães diabéticas. Em estudo clínico, De Luca *et al.* (2009), ao avaliar a influência do controle glicêmico sobre a maturidade pulmonar fetal em gestações acometidas por diabetes ou hiperglicemia leve, demonstraram que houve atraso na

maturidade pulmonar fetal quando o controle glicêmico era inadequado, sugerindo que nas gestações a termo, a rotina de amniocentese para a avaliação da maturidade pulmonar fetal deve ser abandonada, mas deve ser recomendada em gestações pré-termo ou quando o controle glicêmico é inadequado (40).

O estudo experimental de Sá et al. (2001) mostrou que os homogenatos de pulmões de filhotes de ratas com diabetes moderado e grave apresentaram as mesmas concentrações de lecitina e esfingomiélinina em relação ao grupo controle. Essas concentrações similares explicam a ocorrência de aceleração da maturidade pulmonar no diabetes grave que é modelo de restrição de crescimento fetal, ou seja, que o menor peso do pulmão fetal com a mesma concentração de fosfolípidos aceleram a maturidade pulmonar fetal. Por outro lado, na macrosomia fetal, o maior peso pulmonar fetal associado à mesma concentração de fosfolípidos explica o atraso da maturidade pulmonar fetal em filhos macrossômicos de diabéticas (41).

Distúrbios metabólicos: A macrosomia, então considerada um dos principais resultados do diabetes materno, está associada a distúrbios metabólicos, como o lipídico e antioxidante (42). Vários estudos clínicos têm mostrado que, quando comparados com os valores normais, as mães DMG assim como as mães controle exibiram hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia durante a gravidez e não houve diferença significativa entre mulheres saudáveis e diabéticas (42, 43). No entanto, os bebês macrossômicos mostraram altos níveis de triglicérides e colesterol sérico total e livre em comparação aos bebês controle (43). O diabetes experimental também tem sido prejudicial ao metabolismo lipídico materno e fetal. A prenhez em ratas diabéticas está associada com o aumento de triglicérides e colesterol total séricos. Filhotes macrossômicos e obesos de ratas diabéticas têm maior quantidade de tecido adiposo e mostram altos níveis de soro e lipídios hepáticos (29, 37, 38). Lopez-Soldado & Herrera (2003) demonstraram que os recém-nascidos de mães diabéticas de intensidade

moderada também apresentaram maior peso corporal, maiores concentrações corporais de insulina plasmática e triglicérides no fígado, assim como maiores concentrações de lipídios totais em comparação às ratas controles (27). Assim, o diabetes materno e a macrosomia induzem alterações no metabolismo lipídico.

Estresse Oxidativo: Uma das primeiras alterações observadas em pacientes com diabetes é o envolvimento do estresse oxidativo. Além disso, os fetos de mães com diabetes gestacional têm maior risco de desenvolver hiperagregabilidade plaquetária e estresse oxidativo. Elevados níveis de glicemia nestes recém-nascidos induzem o estresse oxidativo, que por sua vez, induz a produção de radicais de oxigênio altamente reativos, sendo tóxico para as células, particularmente para as membranas plasmáticas onde estes radicais interagem com a bicamada lipídica (42). Estudos clínicos indicam que o DMG está associado com as atividades da superóxido dismutase (SOD) prejudicada e aumento dos níveis séricos de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARSs), sugerindo um aumento do estresse oxidativo (43). Em modelos experimentais, vários autores também demonstraram atividades antioxidantes enzimáticas e níveis diminuídos de vitamina em ratas diabéticas induzidas por *streptozotocin* (44, 45). No nosso grupo de pesquisa, Dallaqua et al. (2012) avaliaram o estado de estresse oxidativo na prenhez à termo de ratas diabéticas e os resultados mostraram que as concentrações de malondialdeído (MDA) foram maiores no grupo diabético em relação ao grupo controle. No entanto, não foi observada alteração nas atividades enzimáticas da SOD e glutathione peroxidase (GSH-Px) e na concentração dos grupos tiol (46). Outro estudo do nosso grupo de pesquisa, realizado no final da prenhez de ratas diabéticas, demonstrou que a atividade enzimática da SOD foi menos eficaz enquanto que a concentração de MDA (peroxidação dos lípidos) estava ligeiramente aumentada no grupo diabético (47). Sinzato et al. (2009), usando metodologia similar de Damasceno et al. (2011), não detectou alterações na atividade enzimática de TBARS e SOD (48).

Estes estudos mostram que as pesquisas de bancada estão muito próximas dos resultados das pesquisas clínicas e demonstram a importância das pesquisas translacionais.

Os dados do HAPO e as pesquisas do nosso grupo com as gestantes portadoras de HGL mostram que não apenas as DMG mas também as portadoras de HGL precisam ser diagnosticadas e tratadas para que o meio intra-uterino hiperglicêmico se normalize. O gerenciamento do DMG e da HGL é essencial para a saúde materna e para o desenvolvimento fetal. Diante disso, a preocupação da maioria dos pesquisadores durante a última década foi explorar a fisiopatologia da relação entre as condições de saúde dos filhos nascidos de gravidez complicada por diabetes e das estratégias de diagnóstico e de tratamento eficazes (38).

5. AUMENTO DA INCONTINÊNCIA URINÁRIA EM DIABÉTICAS PÓS-PARTO CESÁREA E PESQUISA TRANSLACIONAL

As repercussões do diabetes e da hiperglicemia no trato urinário inferior estão entre as complicações mais comuns, afetando cerca de 80% dos pacientes (49). Distúrbios do assoalho pélvico estão entre as consequências mais comuns e onerosas do diabetes, incluindo incontinência urinária (IU), infecções do trato urinário, perda de sensação da bexiga, retenção urinária e disfunção sexual (50).

Achados clínicos do Grupo Acadêmico “Diabetes e Gravidez – Clínico e Experimental, UNESP” demonstraram que dois anos após parto cesárea houve aumento da prevalência de IU e a diminuição da pressão de contração vaginal em mulheres com DMG prévio (44,4% e 53,9%) comparadas às de controles normoglicêmicas (18,4% e 37,8%) (51). Não há relatos na literatura sobre o significado clínico materno dessa IU na gestação e nem das possíveis correlações entre a sua ocorrência e o desfecho materno e perinatal (52). Esses relatos da

associação do DMG e IU são recentes na literatura, pouco reconhecidos e pouco valorizados pela classe médica, porém são surpreendentes e direcionam para a necessidade de aprofundar o conhecimento da associação DMG e IU com o uso da pesquisa translacional (51).

Apesar dos inúmeros fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da IU, a associação com o diabetes é de grande interesse. Vários estudos epidemiológicos vêm apontando o aumento de risco (50 a 200% mais comum) de IU entre mulheres com DM2 em comparação às mulheres com glicemia normal (53). Entretanto, os mecanismos pelos quais o DM contribui para a IU ainda não estão bem definidos. Sabe-se que o DM induz mudanças funcionais, metabólicas e estruturais no músculo esquelético, reduz a capacidade funcional do músculo levando à fraqueza muscular, causa distúrbios metabólicos caracterizados por redução na captação de glicose e oxidação de ácidos graxos e leva à mudanças estruturais como atrofia, aumento na deposição de lipídios, diminuição do volume de mitocôndrias, bem como transformação nos tipos de fibras musculares (54, 55).

Há relação temporal entre o diagnóstico do DM2 e o subsequente desenvolvimento da fraqueza muscular associada com complicações como a amiotrofia diabética. A hiperglicemia pode, portanto, afetar a função contrátil e a geração de força no músculo (56). Kim *et al.* também verificaram que 49% das diabéticas gestacionais relataram IU durante a gestação e 28% relataram que esta IU afetava sua atividade diária. Concluíram que a IUE é comum entre mulheres com DMG e parece não estar associada com os níveis de atividade física ou índice de massa corpórea (57).

O “*Bladder Research Progress Review Group*” pelo “*National Institutes of Health*” e “*National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*” relata que “pelo fato do diabetes alterar significativamente o trato urinário, uma grande parcela de pessoas que tem esta doença irá desenvolver caras e debilitantes complicações urológicas. Infelizmente, os mecanismos envolvidos são mal compreendidos. A escassez de conhecimento tem sido uma

barreira para o desenvolvimento dos melhores métodos de prevenção e tratamento das complicações urológicas” (58). No entanto, a relação do DMG com IU é pouco explorada e as consequências clínicas tornam-se preocupantes à medida que se tem discutido e comprovado na literatura as implicações negativas na vida da mulher, justificando, portanto, a necessidade de investigação dos fatores de interferência do DMG sobre a IU.

Segundo estudo realizado em 2009, os modelos animais têm potencial para revelar os mecanismos e ajudar no desenvolvimento de estratégias de tratamento (59).

A pesquisa translacional poderá desvendar a influência do diabetes sobre a continência urinária visto que o estudo da natureza da uropatia diabética em humanos é difícil. Em animais, o fácil acesso aos órgãos e tecidos afetados torna a investigação experimental um modelo valioso (59).

Nosso grupo de pesquisa discutiu a importância do estudo de modelos animais para testar hipóteses sobre os mecanismos de continência urinária e fisiopatologia do binômio DMG-IU. Devido à similaridade entre a distribuição normal da musculatura estriada e da neuroanatomia da uretra em mulheres e em ratas, estes modelos animais vêm sendo cada vez mais utilizados nas pesquisas sobre esses distúrbios. Portanto, o uso de ratas como modelo animal é apropriado para estudos experimentais que testam hipóteses sobre os mecanismos de continência e a fisiopatologia do binômio *Diabetes mellitus* e IU, possibilitando assim, soluções de grande valia na prática clínica (60). Vários estudos mostram que, após a indução do DM em roedores por destruição de células β -pancreáticas com STZ, a bexiga e a uretra sofrem alterações morfométricas e funcionais nos componentes miogênico e neurogênico (61-63).

Os resultados de nossos estudos translacionais assim como de outros pesquisadores mostraram que o diabetes induz alterações na capacidade e complacência, na composição do tecido e parede da bexiga, além de atrofia do músculo estriado uretral e mudanças no perfil

das fibras musculares (62, 64, 65). Estudo translacional realizado por Marini et al. (2011) avaliou as alterações morfológicas das fibras musculares estriadas tipos I e II da uretra de ratas prenhes diabéticas submetidas à cesárea. Os resultados mostraram que o grupo diabético prenhe apresentou adelgaçamento, atrofia, desorganização e rompimento associado à perda de localização anatômica normal das fibras rápidas e lentas e diminuição na proporção de fibras rápidas. Os autores concluíram que a associação entre diabetes e prenhez danificou o músculo estriado uretral e alterou a composição e a distribuição das fibras tipo I e II (65). A co-localização das fibras lentas e rápidas no músculo estriado uretral de ratas prenhes diabéticas, cuja descrição é inédita (65), pode explicar a alta prevalência de IU e disfunção do assoalho pélvico em mulheres com DMG. Como o músculo esquelético é o órgão alvo principal do metabolismo de glicose, o entendimento dos mecanismos básicos envolvendo a miopatia diabética tem enorme importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que melhorem a qualidade de vida das gestantes diabéticas e reduzam os custos da assistência à saúde.

Na tentativa de desenvolver modelos de intervenção para prevenção da incontinência urinária, apontada como consequência da perda da função muscular do assoalho pélvico, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo que avaliou a efetividade de exercícios do assoalho pélvico durante a gestação como medida preventiva da incontinência urinária e da disfunção muscular do assoalho pélvico. Os resultados mostraram que exercícios perineais realizados durante a gestação aumentaram significativamente a função muscular do assoalho pélvico e diminuíram a ocorrência de incontinência urinária (66).

Ficou claro que uma das maiores causas de IU de esforço é o mau funcionamento do músculo estriado uretral (esfíncter uretral externo) e que o diabetes leva a graves alterações neste músculo. Ainda há controvérsia nas consequências da gestação neste mecanismo. Nosso grupo de estudo pretende aprofundar o conhecimento nesta área e está realizando outros

estudos translacionais valendo-se da análise da estrutura e ultraestrutura da matriz extracelular e do músculo estriado uretral em ratas prenhes diabéticas. Os resultados da investigação atual ajudam a elucidar os caminhos fisiopatológicos que conduzem ao desenvolvimento de distúrbios do assoalho pélvico feminino, mas há necessidade de mais pesquisa para a plena compreensão dos fenômenos que resultarão no melhor atendimento para as pacientes. A terapia específica com base científica sólida dará os resultados para a prevenção nos níveis primário e secundário do sistema de saúde (67).

6. PESQUISA TRANSLACIONAL EM DMG E HGL PARA ESTUDOS DE INTERVENÇÃO

Várias pesquisas translacionais estão sendo realizadas com foco na intervenção, pois o controle da glicemia é o mecanismo ideal para reduzir as repercussões do diabetes. A associação entre atividade física, dieta e insulina é o recurso terapêutico mais utilizado na clínica para controlar a concentração de glicose no sangue.

O uso terapêutico do exercício físico para o tratamento do diabetes é preconizado desde 600 a.C. Apesar da tendência atual de recomendação de atividade física também para gestantes diabéticas, não existia um consenso definido sobre o seu papel na gravidez complicada por diabetes. Os dados eram insuficientes para atribuir riscos ou benefícios à mãe e ao recém-nascido (68). Este fato seria explicado pela inclusão de gestantes com diferentes tipos de diabetes, constituição corporal, grau de resistência à insulina, fases da gestação e em particular, devido à falta de padronização da intensidade, tipo e duração do exercício (68, 69).

Estudos atuais, demonstrados em revisão de literatura por Nascimento et al. (2012), afirmam que a prática de exercícios físicos durante a gravidez estão associados com maior aptidão cardiorrespiratória, prevenção de incontinência urinária e dor lombar, redução dos

sintomas de depressão, controle de ganho de peso gestacional e para casos de DMG, reduzida quantidade de mulheres que necessitaram de insulina. Não há associação com a redução de peso ao nascer ou a taxa de parto prematuro. O tipo de exercício não mostra nenhuma diferença nos resultados, e sua intensidade deve ser leve ou moderada por mulheres anteriormente sedentárias e moderada a alta para mulheres ativas. As recomendações de exercícios ainda são baseadas nas diretrizes atuais sobre intensidade moderada, de baixo impacto e exercícios aeróbicos pelo menos três vezes por semana. No entanto, as novas diretrizes propõem aumentar as despesas de atividade física semanal, incorporando o exercício vigoroso e adicionando treinamento de força leve para a rotina de exercícios de gestantes saudáveis. Portanto, atualmente o exercício físico é considerado benéfico para as mulheres durante a gravidez e também durante o período pós-parto; não está associado a riscos para o recém-nascido e podem levar a mudanças no estilo de vida que implicam em benefícios a longo prazo (70).

Além disso, o exercício juntamente com as terapias farmacológicas e dieta, são importantes estratégias para controlar a glicemia e melhorar o processo de concepção. As dúvidas anteriores da literatura, sobre o efeito exclusivo de exercício em gestantes diabéticas, levou ao desenvolvimento de estudos experimentais para avaliar o efeito do exercício na prenhez de ratas diabéticas induzida por *streptozotocin* (31).

Estudos experimentais realizados em nosso laboratório verificaram os efeitos da prática do exercício físico (natação) iniciada em diferentes momentos na prenhez de ratas diabéticas. Não foi comprovada a influência do exercício físico sobre os níveis glicêmicos maternos, mas a prática diária de natação após a implantação embrionária (a partir do 7º dia de prenhez) mostrou-se benéfica para o perfil lipídico de ratas diabéticas (controle da dislipidemia). Esse resultado reforça a validade da associação da atividade física regular à dieta e insulina na gestação complicada pelo diabetes (71). O mesmo estudo experimental

também mostrou redução do número de morte embrionária (reabsorções) e inalteração no número de fetos vivos em comparação com os números das ratas diabéticas não exercitadas, explicado pela melhoria no metabolismo lipídico, que contribuiu para a manutenção do embrião implantado no organismo materno. No entanto, com relação às malformações congênitas, foi observado aumento de anomalias esqueléticas e os recém-nascidos apresentaram pesos corpóreos reduzidos (31). Em conclusão, o exercício físico tem relevância para a aplicação clínica como parte integral do tratamento do diabetes e deve ser encorajado, sendo necessário o seguimento médico para a prática do exercício antes e durante a gestação de mulheres diabéticas.

Além do uso do exercício físico, há grande interesse no desenvolvimento de novas drogas para prevenir complicações associadas ao diabetes; o conhecimento tradicional direciona para terapias alternativas à base de plantas medicinais para amenizar seus efeitos. Atualmente, mais de 800 tipos de plantas são utilizados no tratamento do DM (72), a maioria com amplo espectro na clínica. Há necessidade premente de se explorar o campo da fitomedicina para fornecer terapias alternativas no tratamento da síndrome diabética (73). A comunidade científica tem grande interesse em avaliar o estado do produto natural isolado em estudos experimentais, sendo que alguns deles já foram testados em seres humanos (74, 75).

Assim como outros grupos de pesquisa, nosso laboratório apresenta diversos trabalhos experimentais com a utilização de animais diabéticos para comprovar os efeitos hipoglicemiantes e/ou antioxidantes de algumas dessas plantas (76). Foi demonstrado que o extrato aquoso de *Bauhinia forficata* (Pata-de-vaca) reduziu a frequência de anomalias congênitas na prole de ratas diabéticas e este efeito poderia ser devido à ativação no sistema de glutatona, um antioxidante (77). Foi testado também o extrato das folhas de *Morus nigra* (Amora negra), que não controlou a hiperglicemia das ratas diabéticas mas também reduziu a

frequência de anomalias esqueléticas e viscerais nos fetos de ratas diabéticas pelo seu efeito antioxidante (78, 79).

Os efeitos das plantas medicinais e outros recursos co-adjuvantes podem afetar a capacidade antioxidante durante o curso do diabetes experimental na prenhez e serve como abordagem para elaboração de medidas terapêuticas de baixo custo para a gestão dos diversos e variados distúrbios de desenvolvimento embriofetal do diabetes clínico (78).

7. CONCLUSÕES

O DMG é uma condição que pode ser efetivamente controlada, diminuindo os riscos associados e levar ao nascimento de crianças saudáveis. É importante que as mulheres sejam diagnosticadas durante a gravidez e tenham acompanhamento pós-parto regular para a identificação e tratamento de eventuais complicações.

Embora os desafios para a pesquisa translacional eficaz sejam consideráveis, as oportunidades são grandes. Precisamos assegurar que, em décadas futuras, uma falha em desenvolver terapias para as principais complicações da gravidez não sejam responsáveis por graves repercussões para a mãe e para seu concepto.

Espera-se que a pesquisa translacional no binômio diabetes-gravidez sejam implementadas em centros de excelência tanto de pesquisa básica como aplicada e complementada por estudos clínicos multicêntricos, conduzidos de forma pragmática para aumentar o nível de evidência científica com recursos diagnósticos e propedêuticos mais confiáveis. Para tal, é necessário pensar nos objetivos que devem ser atingidos nos próximos anos, de forma a construir um ambiente de pesquisa sólido, forte e adequado ao momento e às oportunidades que nosso país vem vivendo. É necessário cuidar dos recursos humanos, nossos verdadeiros talentos, de forma responsável e planejada, dando a eles incentivos para continuar

investindo em nosso país e em nosso futuro. Transformar o país e seus profissionais de coadjuvantes em protagonistas (80).

Essas lições devem ser aproveitadas para intensificar os estudos e as intervenções e criar uma dinâmica e atingir os esforços sustentáveis na prevenção do diabetes e suas complicações durante a gestação.

8. AGRADECIMENTOS

Este estudo teve suporte financeiro da FAPESP (2010/13303-3) e CNPQ (473673/2011-8).

9. CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse neste estudo.

10. REFERÊNCIAS

1. Rudge MV, Girão MJBC, Experimental GADeG-Ce, Grupo acadêmico Aspectos clínicos megdiuf. Diabete gestacional e incontinência urinária: interação entre a Ginecologia e a Obstetrícia. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2011;33(5):207-10.
2. Gokyildiz S, Beji NK. The effects of pregnancy on sexual life. *Journal of sex & marital therapy*. 2005 May-Jun;31(3):201-15. PubMed PMID: 16020139. Epub 2005/07/16. eng.
3. Biri A, Korucuoglu U, Ozcan P, Aksakal N, Turan O, Himmetoglu O. Effect of different degrees of glucose intolerance on maternal and perinatal outcomes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2009 Jun;22(6):473-8. PubMed PMID: 19479645.
4. Vivet-Lefebure A, Roman H, Robillard PY, Laffitte A, Hulsey TC, Camp G, et al. [Obstetrical and neonatal outcomes of gestational diabetes mellitus at Reunion Island (France)]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*. 2007 Jun;35(6):530-5. PubMed PMID: 17531520. Consequences obstetricales et neonatales du diabete gestationnel dans la population du sud de l'île de la Reunion.
5. Lee H, Jang HC, Park HK, Metzger BE, Cho NH. Prevalence of type 2 diabetes among women with a previous history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*. 2008 Jul;81(1):124-9. PubMed PMID: 18456364.
6. Li G, Zhang P, Wang J, Gregg EW, Yang W, Gong Q, et al. The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. *Lancet*. 2008 May 24;371(9626):1783-9. PubMed PMID: 18502303.
7. Simmons RK, Unwin N, Griffin SJ. International Diabetes Federation: An update of the evidence concerning the prevention of type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2010 Feb;87(2):143-9. PubMed PMID: 19913319.
8. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2009;1(1):21. PubMed PMID: 19840387. Pubmed Central PMCID: 2770456.
9. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2012 Jan;35 Suppl 1:S64-71. PubMed PMID: 22187472. Epub 2012/01/04. eng.
10. Bener A, Saleh NM, Al-Hamaq A. Prevalence of gestational diabetes and associated maternal and neonatal complications in a fast-developing community: global comparisons. *International journal of women's health*. 2011;3:367-73. PubMed PMID: 22140323. Pubmed Central PMCID: 3225465. Epub 2011/12/06. eng.
11. Bakken S, Jones D. Contributions to translational research for quality health outcomes. *Nursing Research*. 2006;55(2):S1-2.
12. Sung NS, Crowley WF, Jr., Genel M, Salber P, Sandy L, Sherwood LM, et al. Central challenges facing the national clinical research enterprise. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003 Mar 12;289(10):1278-87. PubMed PMID: 12633190.
13. Narayan KM, Gregg EW, Engelgau MM, Moore B, Thompson TJ, Williamson DF, et al. Translation research for chronic disease: the case of diabetes. *Diabetes care*. 2000 Dec;23(12):1794-8. PubMed PMID: 11128355.
14. Hobin JA, Deschamps AM, Bockman R, Cohen S, Dechow P, Eng C, et al. Engaging basic scientists in translational research: identifying opportunities, overcoming obstacles. *Journal of translational medicine*. 2012 Apr 13;10(1):72. PubMed PMID: 22500917. Epub 2012/04/17. Eng.

15. Siminerio L, Mbanya JC. Translating diabetes research into global communities. *Diabetes research and clinical practice*. 2011 Sep;93(3):443-5. PubMed PMID: 21820195. Epub 2011/08/09. eng.
16. Garfield SA, Malozowski S, Chin MH, Narayan KM, Glasgow RE, Green LW, et al. Considerations for diabetes translational research in real-world settings. *Diabetes care*. 2003 Sep;26(9):2670-4. PubMed PMID: 12941736.
17. Garcia de Quevedo I, Siminerio L, L'Heveder R, Narayan KM. Challenges in real-life diabetes translation research: early lessons from BRIDGES projects. *Diabetes research and clinical practice*. 2012 Mar;95(3):317-25. PubMed PMID: 22115503.
18. Castro I, Miranda C, Rodrigues A, Silva M. Dificuldades na incorporação dos resultados de pesquisa na prática da enfermagem. In: *Anais do 4º Seminário Nacional de Pesquisa em Enfermagem*; São Paulo, Brasil São Paulo: ABEn; 1985 p193-242. 1985.
19. Fontanarosa PB, DeAngelis CD. Basic science and translational research in JAMA. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002 Apr 3;287(13):1728. PubMed PMID: 11926900. Epub 2002/04/03. eng.
20. Woods NF, Magyary DL. Translational research: why nursing's interdisciplinary collaboration is essential. *Research and theory for nursing practice*. 2010;24(1):9-24. PubMed PMID: 20333909. Epub 2010/03/26. eng.
21. Grady PA. Translational research and nursing science. *Nursing outlook*. 2010 May-Jun;58(3):164-6. PubMed PMID: 20494692. Epub 2010/05/25. eng.
22. Pearson A, Jordan Z, Munn Z. Translational science and evidence-based healthcare: a clarification and reconceptualization of how knowledge is generated and used in healthcare. *Nursing research and practice*. 2012;2012:792519. PubMed PMID: 22474583. Pubmed Central PMCID: 3306933. Epub 2012/04/05. eng.
23. Elias FTS. Revisões sistemáticas da literatura e o potencial ganho em eficiência no Sistema Único de Saúde: Universidade Federal de São Paulo; 2012.
24. Ferrara A. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. *Diabetes care*. 2007 Jul;30 Suppl 2:S141-6. PubMed PMID: 17596462. Epub 2007/07/13. eng.
25. Rudge MV, Gomes CM, Calderon Ide M, Ramos MD, Abbade JF, de Oliveira MG, et al. Study of the evolution of the placenta and fetal pancreas in the pathophysiology of growth retardation intrauterine due to restricted maternal diet. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 1999 Mar 4;117(2):49-56. PubMed PMID: 10488601.
26. Rudge MV, Calderon Ide M, Ramos MD, Brasil MAM, Rugolo LMSS, Bossolan G, et al. Hiperglicemia materna diária diagnosticada pelo perfil glicêmico: um problema de saúde pública materno e perinatal. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2005;27(11):691-97.
27. Lopez-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Experimental diabetes research*. 2003 Apr-Jun;4(2):107-18. PubMed PMID: 14630572. Pubmed Central PMCID: 2478596.
28. Calderon IMP, Rudge MVC, Brasil MAM, Henry MACA. Diabete e gravidez experimental em ratas: 1. Indução do diabete, obtenção e evolução da prenhez. . *Acta Cirúrgica Brasileira*. 1992.
29. Soulimane-Mokhtari NA, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A, et al. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clinical science*. 2005 Sep;109(3):287-95. PubMed PMID: 15898958.

30. Yang J, Cummings EA, O'Connell C, Jangaard K. Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies. *Obstetrics and gynecology*. 2006 Sep;108(3 Pt 1):644-50. PubMed PMID: 16946226. Epub 2006/09/02. eng.
31. Volpato GT, Damasceno DC, Kempinas WG, Rudge MV, Calderon IM. Effect of exercise on the reproductive outcome and fetal development of diabetic rats. *Reproductive biomedicine online*. 2009 Dec;19(6):852-8. PubMed PMID: 20031028. Epub 2009/12/25. eng.
32. Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(5-6):894-903. PubMed PMID: 16118061. Epub 2005/08/25. eng.
33. Calderon IM, Damasceno DC, Amorin RL, Costa RA, Brasil MA, Rudge MV. Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2007 Oct;78(1):65-71. PubMed PMID: 17360067.
34. Iessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2010;2(1):37. PubMed PMID: 20529353. Pubmed Central PMCID: 2904722. Epub 2010/06/10. eng.
35. Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli G, Sinzato YK, Taylor KN, et al. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2010;2(1):26. PubMed PMID: 20416073. Pubmed Central PMCID: 2874517. Epub 2010/04/27. eng.
36. Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MM, Oshiiwa M, Taylor KN, et al. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2011 Mar;44(3):206-11. PubMed PMID: 21344139.
37. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A. N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. *Journal of autoimmunity*. 2006 Jun;26(4):268-77. PubMed PMID: 16713180. Epub 2006/05/23. eng.
38. Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, et al. N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *International journal of obesity*. 2006 May;30(5):739-50. PubMed PMID: 16418759. Epub 2006/01/19. eng.
39. Fry CH, Daneshgari F, Thor K, Drake M, Eccles R, Kanai AJ, et al. Animal models and their use in understanding lower urinary tract dysfunction. *Neurourology and urodynamics*. 2010 Apr;29(4):603-8. PubMed PMID: 20432320. Epub 2010/05/01. eng.
40. De Luca AK, Nakazawa CY, Azevedo BC, Rudge MV, De Araujo Costa RA, Calderon IM. Influence of glycemic control on fetal lung maturity in gestations affected by diabetes or mild hyperglycemia. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2009;88(9):1036-40. PubMed PMID: 19636976.
41. Sá ACJ. Effects of maternal diabetes on lung phospholipid profile of the offspring of diabetic rats. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2001;76(167):71.
42. Yessoufou A, Moutairou K. Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of "metabolic memory". *Experimental diabetes research*. 2011;2011:218598. PubMed PMID: 22144985. Pubmed Central PMCID: 3226356.
43. Grissa O, Ategbo JM, Yessoufou A, Tabka Z, Miled A, Jerbi M, et al. Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia.

- Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine. 2007 Sep;150(3):164-71. PubMed PMID: 17761369.
44. Dincer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akcay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. *Clinical biochemistry*. 2002 Jun;35(4):297-301. PubMed PMID: 12135692.
 45. McLennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, et al. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes*. 1991 Mar;40(3):344-8. PubMed PMID: 1671844.
 46. Dallaqua B, Saito FH, Rodrigues T, Calderon IM, Rudge MV, Herrera E, et al. Treatment with *Azadirachta indica* in diabetic pregnant rats: negative effects on maternal outcome. *Journal of ethnopharmacology*. 2012 Oct 11;143(3):805-11. PubMed PMID: 22921950.
 47. Damasceno DC, Kiss AC, Sinzato YK, de Campos KE, Rudge MV, Calderon IM, et al. Maternal-fetal outcome, lipid profile and oxidative stress of diabetic rats neonatally exposed to streptozotocin. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2011 Jul;119(7):408-13. PubMed PMID: 21667442.
 48. Sinzato YK, Lima PH, Campos KE, Kiss AC, Rudge MV, Damasceno DC. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2009 Jul-Aug;55(4):384-8. PubMed PMID: 19750302.
 49. Daneshgari F, Moore C. Diabetic uropathy. *Seminars in nephrology*. 2006 Mar;26(2):182-5. PubMed PMID: 16530610. Epub 2006/03/15. eng.
 50. Goins WF, Yoshimura N, Phelan MW, Yokoyama T, Fraser MO, Ozawa H, et al. Herpes simplex virus mediated nerve growth factor expression in bladder and afferent neurons: potential treatment for diabetic bladder dysfunction. *The Journal of urology*. 2001 May;165(5):1748-54. PubMed PMID: 11342969.
 51. Barbosa AM, Dias A, Marini G, Calderon IM, Witkin S, Rudge MV. Urinary incontinence and vaginal squeeze pressure two years post-cesarean delivery in primiparous women with previous gestational diabetes mellitus. *Clinics*. 2011;66(8):1341-6. PubMed PMID: 21915481. Pubmed Central PMCID: 3161209.
 52. Marini G, Piculo F, Barbosa AMP, Damasceno D, Calderon IM, Matheus SMM, et al. Diabetes na gestação e incontinência urinária: uma associação pouco reconhecida. *Fisioterapia Brasil*. 2012;13(1):65-8.
 53. Brown JS, Vittinghoff E, Lin F, Nyberg LM, Kusek JW, Kanaya AM. Prevalence and risk factors for urinary incontinence in women with type 2 diabetes and impaired fasting glucose: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2002. *Diabetes care*. 2006 Jun;29(6):1307-12. PubMed PMID: 16732013. Pubmed Central PMCID: 1557358. Epub 2006/05/30. eng.
 54. Sun Z, Liu L, Liu N, Liu Y. Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:4765-94. PubMed PMID: 18508544. Epub 2008/05/30. eng.
 55. Ramchurn N, Mashamba C, Leitch E, Arutchelvam V, Narayanan K, Weaver J, et al. Upper limb musculoskeletal abnormalities and poor metabolic control in diabetes. *European journal of internal medicine*. 2009 Nov;20(7):718-21. PubMed PMID: 19818294. Epub 2009/10/13. eng.
 56. Sayer AA, Dennison EM, Syddall HE, Gilbody HJ, Phillips DI, Cooper C. Type 2 diabetes, muscle strength, and impaired physical function: the tip of the iceberg? *Diabetes care*. 2005 Oct;28(10):2541-2. PubMed PMID: 16186295. Epub 2005/09/28. eng.

57. Kim C, McEwen LN, Sarma AV, Piette JD, Herman WH. Stress urinary incontinence in women with a history of gestational diabetes mellitus. *Journal of women's health*. 2008 Jun;17(5):783-92. PubMed PMID: 18537481. Pubmed Central PMCID: 2942747. Epub 2008/06/10. eng.
58. Urologic Complications of Diabetes Mellitus. Bethesda: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bladder Research Progress Review Group; p 133. 2002.
59. Daneshgari F, Leiter EH, Liu G, Reeder J. Animal models of diabetic uropathy. *The Journal of urology*. 2009 Dec;182(6 Suppl):S8-13. PubMed PMID: 19846143. Epub 2009/10/23. eng.
60. Marini G, Piculo F, Barbosa AMP, Damasceno D, Matheus SMM, Rudge MVC. Importância do modelo animal para testar hipóteses sobre a fisiopatologia do binômio diabetes e incontinência urinária feminina. *Scientia Medica*. 2011;21(4):191-5.
61. Daneshgari F, Liu G, Imrey PB. Time dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *The Journal of urology*. 2006 Jul;176(1):380-6. PubMed PMID: 16753447. Epub 2006/06/07. eng.
62. Liu G, Lin YH, Yamada Y, Daneshgari F. External urethral sphincter activity in diabetic rats. *Neurourology and urodynamics*. 2008;27(5):429-34. PubMed PMID: 18351620.
63. Daneshgari F, Liu G, Birder L, Hanna-Mitchell AT, Chacko S. Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *The Journal of urology*. 2009 Dec;182(6 Suppl):S18-26. PubMed PMID: 19846137.
64. Kim JH, Huang X, Liu G, Moore C, Bena J, Damaser MS, et al. Diabetes slows the recovery from urinary incontinence due to simulated childbirth in female rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007 Aug;293(2):R950-5. PubMed PMID: 17491107. Pubmed Central PMCID: 2536602.
65. Marini G, Barbosa AM, Damasceno D, Matheus SMM, Castro RA, Girão MJBC, et al. Morphological changes in the fast vs slow fiber profiles of the urethras of diabetic pregnant rats. *Urogynaecologia*. 2011; 25:e9:31-6.
66. Assis LCd. Efetividade de exercícios do assoalho pélvico durante a gestação como medida preventiva da incontinência urinária e da disfunção muscular do assoalho pélvico: Universidade Estadual Paulista; 2010.
67. Weber AM, Buchsbaum GM, Chen B, Clark AL, Damaser MS, Daneshgari F, et al. Basic science and translational research in female pelvic floor disorders: proceedings of an NIH-sponsored meeting. *Neurourology and urodynamics*. 2004;23(4):288-301. PubMed PMID: 15227643. Epub 2004/07/01. eng.
68. Kramer MS, McDonald SW. Aerobic exercise for women during pregnancy. *Cochrane database of systematic reviews*. 2006 (3):CD000180. PubMed PMID: 16855953. Epub 2006/07/21. eng.
69. Arena B, Maffulli N. Exercise in pregnancy: how safe is it? *Sports Medicine and Arthroscopy Review*. 2002;10:15-22.
70. Nascimento SL, Surita FG, Cecatti JG. Physical exercise during pregnancy: a systematic review. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2012 Dec;24(6):387-94. PubMed PMID: 23014142.
71. Volpato G, Damasceno D, Campos K, Rocha R, Rudge M, Calderon I. Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esporte*. 2006;12(5):229-33.
72. Saxena A, Vikram NK. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. *Journal of alternative and complementary medicine*. 2004 Apr;10(2):369-78. PubMed PMID: 15165418. Epub 2004/05/29. eng.

73. Sabu MC, Kuttan R. Antidiabetic activity of *Aegle marmelos* and its relationship with its antioxidant properties. *Indian journal of physiology and pharmacology*. 2004 Jan;48(1):81-8. PubMed PMID: 15270373. Epub 2004/07/24. eng.
74. Johnson L, Strich H, Taylor A, Timmermann B, Malone D, Teufel-Shone N, et al. Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytotherapy research : PTR*. 2006 Apr;20(4):250-5. PubMed PMID: 16557605. Epub 2006/03/25. eng.
75. Matsui T, Ogunwande IA, Abesundara KJ, Matsumoto K. Anti-hyperglycemic Potential of Natural Products. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2006 Mar;6(3):349-56. PubMed PMID: 16515474. Epub 2006/03/07. eng.
76. Dallaqua B, Damasceno DC. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. *Rev Bras Pl Med*. 2011;13(3):367-37.
77. Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MV, Padovani CR, Calderon IM. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2008 Feb 28;116(1):131-7. PubMed PMID: 18155864. Epub 2007/12/25. eng.
78. Volpato GT, Calderon IM, Sinzato S, Campos KE, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2011 Dec 8;138(3):691-6. PubMed PMID: 21986227.
79. Volpato GT, Damasceno DC, Sinzato S, Cervelin V, Nicolielo H, Serti M, et al. Avaliação do efeito do extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* (Amora) no binômio diabetes e gravidez. *Diabetes Clínica*. 2005;5:340-5.
80. DAINESI SM, GOLDBAUM M. Pesquisa clínica como estratégia de desenvolvimento em saúde. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(1):2-6.



Capítulo 2

**URETHRAL STRIATED MUSCLE AND EXTRACELLULAR MATRIX
MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS AMONG MILD DIABETIC PREGNANT
RATS: TRANSLATIONAL APPROACH**

Fernanda Piculo¹, Gabriela Marini¹, Angélica Mércia Pascon Barbosa¹, Débora Cristina Damasceno¹, Selma Maria Michelin Matheus², Sérgio Luis Felisbino³, Firouz Daneshgari⁴,
Marilza Vieira Cunha Rudge^{1*}

¹Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Univ Estadual Paulista_UNESP, Brazil.

²Department of Anatomy, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista_UNESP, Brazil.

³Department of Morphology, Institute of Biosciences, Univ Estadual Paulista_UNESP, Brazil.

⁴Department of Urology, Case Western Reserve University; Urology Institute University Hospitals Case Medical Center, Cleveland, Ohio USA.

**Correspondence:* Marilza Vieira Cunha Rudge, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, CEP 18618-603.970, Botucatu, São Paulo, Brazil. Phone: 55 xx 38801631. E-mail: marilzarudge@gmail.com

Este capítulo foi redigido de acordo com as normas de publicação da revista **Internacional Urogynecology Journal**, para a qual será submetido.

Abstract

Diabetes mellitus during pregnancy is associated with high levels of urinary incontinence and pelvic floor muscle dysfunction. The aim of this study was to deepen the knowledge of changes in urethral striated muscle and extracellular matrix in diabetic pregnant rats considering both structures as a whole system responsible for urinary continence. Ninety-two female Wistar rats were distributed in four experimental groups: virgin, pregnant, diabetic and diabetic pregnant. The first three groups were considered as controls of the study group, diabetic pregnant. Mild diabetes was induced at the first day of birth by subcutaneous administration of streptozotocin at a dose of 100 mg/kg body weight. In adult life, parental non-diabetic female rats were mated with non-diabetic males to obtain newborns. On day 21 of the pregnancy, the rats were lethally anesthetized and the urethra and vagina were extracted as a unit. Urethral and vaginal sections were cut and analyzed by a) cytochemical staining for extracellular matrix and muscle components; b) immunohistochemistry to identify fast and slow muscle fibers; and c) transmission electron microscopy for ultrastructural analysis of urethral striated muscle. In comparison to the three control groups, variations in the urethral striated muscle and extracellular matrix from diabetic pregnant rats were observed including: thinning, disorganization, atrophy, fibrosis, increased blood vessels, accumulation of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria, lipid droplets and glycogen granules associated with co-localization of fast and slow fibers and a steady decrease in the proportion of fast to slow fibers. Our results indicate that diabetes and pregnancy can lead to time-dependent disorder and tissue remodeling in which the extracellular matrix has a fundamental function.

Keywords: diabetes, pregnancy, rats, urethral striated muscle, extracellular matrix.

INTRODUCTION

Diabetes affects multiple organ systems, including the lower urinary tract, and can lead to functional and anatomical abnormalities of the external urethral sphincter (1) and is associated with increased risk of urinary incontinence (UI) (2). Current theories on the pathophysiology of lower urinary tract complications of diabetes include microvascular, neuropathic, and myopathic dysfunction of pelvic components due to hyperglycemia, but mechanistic details remain to be further determined (3).

In a clinical study, our research team found a statistically significant association among *Gestational Diabetes Mellitus* (GDM), UI, and pelvic floor muscle dysfunction two years after a cesarean section. The overall prevalence of gestational UI two years *post partum* was significantly higher among women with previous GDM (50.8% vs 44.4%, respectively) than among normoglycemic pregnant women (31.6% vs 18.4%, respectively) (4). Kim et al. (2008) found that 49% of women with GDM reported weekly or more frequent incontinence during pregnancy, and 28% reported that incontinence affected their activities during pregnancy (5).

The role of GDM in the pathophysiological development of UI is unclear and is becoming the focus of translational research requests from the National Institutes of Health (6). Translation research occurs in two continuous phases (7). The first is “bench to bedside,” i.e., from laboratory research to clinical research application and the second translational phase is from the clinical research setting to real-world practice (8) with particularly intensive treatment protocols conducted by expert multidisciplinary research teams. In our view there is a third phase of translational research: from bedside to bench and this phase is designing the most relevant experiments to understand the exact mechanism that explains the clinical observation. For example, how diabetes influences the urethral structure.

The International Consultation on Incontinence-Research Society proposes that animal models should be developed to investigate time dependent changes in DM (9). Animal investigations are most useful when they test mechanistic hypotheses, i.e., they involve a limited number of variables in a controlled study. In contrast, clinical studies, by their nature, are multifactorial and are never perfectly controlled. Therefore, strong basic research programs using animal models performed in tandem with human clinical studies are needed to build a powerful bridge of translational work (10).

Our research team initiated the translational research phase called: “from bedside to bench” with an experimental study. Marini et al. (2011) evaluated the effects of severe diabetes on striated muscle fiber composition of the urethras in pregnant rats to understand the influences of diabetes and pregnancy on urethral muscle fibers. The urethral striated muscles were found to be thin, atrophic, disorganized, and disrupted. They were associated with loss of the normal anatomic localization of each fiber type (i.e., the co-localization of fast and slow fibers and the loss of the predominance of the expression of the fast fibers with respect to the slow fibers). The results of this translational study suggested that UI may be attributed, in part, to changes in urethral striated muscles of diabetic pregnant women, providing a model for additional studies related to UI (11). Other animal investigations showed that diabetes induced alterations in bladder mass and tissue composition, capacity and compliance, urethral striated muscle atrophy, and changes in muscle fiber profiles (12-14).

Our and others clinical and experimental results provide confirmation of the multifactorial origin of UI, including malfunctioning of the urethral sphincter (15, 16). Furthermore, diabetes has several effects on skeletal muscle as well. Untreated diabetes is associated with skeletal muscle wasting (17) and altered skeletal muscle function (18, 19).

Tissue function depends not only on cellular but also extracellular integrity. Recently, there has been more research indicating that urethral extracellular matrix (ECM) may also

play a critical role in UI (20, 21). Collagen is the main component of ECM, although other components such as elastic fibrils, proteoglycans, and glycosaminoglycans are responsible for the functional properties of connective tissue (22). The endopelvic fascia and ligaments contiguous with the urethra, bladder, and vagina are comprised predominately of collagen types I and III (23). Histologic studies yielded contradictory results reporting a lower (24, 25) as well as a higher (26, 27) collagen content in women with UI as compared to continent controls. So, there is no well accepted conclusion on this point regarding UI.

According to previous results, there is a need to deepen the knowledge of changes in urethral striated muscle and ECM in diabetic pregnant rats considering both structures as a whole system responsible for urinary continence. We hypothesized that, in the diabetes and pregnancy binomial, the combined analysis of the urethral striated muscle and extracellular matrix clarify the composition changes that lead to tissue remodeling. Moreover, we expect to verify that mild diabetes (blood glucose between 120-300mg/dL) leads to low intensity changes compared to severe diabetes (blood glucose > 300mg/dL). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of mild diabetes on the whole urinary continence system composed by ECM and urethral striated muscle in pregnant rats. Thus, we sought to quantify the structural components of the urethra in diabetic pregnant rats, including muscle fibers, collagen, urothelium and blood vessels, besides the immunohistochemical and ultrastructural analyzes.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

Female and male Wistar (CEMIB – UNICAMP, Campinas – São Paulo State – Brazil) rats, 12-13 weeks of age, were housed in a certified animal care facility and food and water were provided *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the Ethics

Committee on Animal Experiments of the Botucatu Medical School – UNESP (Protocol Number 846). Rats were maintained under controlled conditions (temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humidity $55 \pm 5\%$ and 12h light/dark cycle).

Parental non-diabetic female rats were mated with non-diabetic males to obtain female newborns. For the induction of mild diabetes (glycemia 120-300 mg/dL), female newborns of non-diabetic female rats received streptozotocin (STZ - SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA), a beta (β)-cytotoxic agent, diluted in citrate buffer (0.1 M; pH 4.5) at a dose of 100 mg/kg on the first day of life by subcutaneous administration (28). Newborn rats remained with their mothers until day 21 of life (weaning period). A glucose tolerance test (GTT) was performed at day 75 of life according to Campos et al. (29) to assess the development of altered glucose metabolism and used as an inclusion criterion for maintaining the rats in their respective groups. Rats presenting with glycemia higher than 140 mg/dL at more than two time points were chosen for further analysis. Glucose level responses during the GTT were evaluated by estimation of the total area under the curve, using the trapezoidal method (30). The female newborns that received only citrate buffer and presenting with glycemic levels below 120 mg/dL were considered non-diabetic and included in this study. After these procedures, two initial groups were obtained: diabetic and non-diabetic. Both initial groups were randomly according to pregnancy or not. So, the animals were allocated to four groups: virgin group (n=10), pregnant group (n=10), diabetic group (n=10) and diabetic pregnant group (n=10). The diabetic pregnant group was considered the study group and the other three were control groups.

In adult life, female rats randomly selected for pregnancy (pregnant and diabetic pregnant groups) were mated overnight with non-diabetic male rats. The morning when spermatozoa were found in the vaginal smear was designated gestational day 0. The rats were killed on day 21 of pregnancy by intraperitoneal injection of Thiopentax[®] (80mg/Kg). The

offspring were removed, weighed and lethally anesthetized with sodium thiopental (3% Thiopentax[®]) and the urethrovaginal tissues were harvested (cross-section of the mid-urethra and anterior vagina). A portion of the samples was immersed in neutral buffered formalin containing 4% formaldehyde for a period of 4h and embedded in paraffin. Sections of 4 µm thickness were cut using a rotor microtome. Pathological analysis and morphometric characteristics were evaluated by gross examination of the urethra (hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining). Specimen cross sections were examined by light microscopy and photographed.

Additional samples were frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C for sectioning in a cryostat (6 µm thick) for immunohistochemical analysis of fast and slow fibers. Antibodies WB-MHCf Novocastra (1:120) and WB-MHCs Novocastra (1:180) were used. Other samples were immersed in the fixative solution containing 0.05% ruthenium red for 3h before post fixation in osmium tetroxide. After the staining, the usual procedures for transmission electron microscopy were performed for ultrastructural analysis of urethral striated muscle.

Histological examination, pathological and morphometric analyzes

Hematoxylin-eosin-stained slides were used to observe the general morphology of the urethra and determine urethral tissue cross-sectional area.

For pathological analysis (done at Case Western Reserve University, USA), forty Masson's trichrome stained photo/file slides from the urethra of 4 groups were analyzed for the grade of fibrosis. The fibrosis was considered:

- Minimal if it was present at the muscularis propria.
- Minimal to moderate if it is minimal but had an increased intensity.
- Moderate if it was penetrating through the muscularis propria.
- Severe if it was moderate in grade but had an increased intensity.

Morphometric analysis was performed with Image Pro Plus 7.0 image analysis software (Media Cybernetics, Ins. USA) at Case Western Reserve University (USA). The imaging analysis software can automatically trace the circumference of the urethral wall and calculate the internal area by counting the pixels and converting pixels to area (μm^2). The green outline in Figure 1, A-E is produced by the software automatically. The area was calculated as the difference between the area within the outer circumference and the area within the inner circumference of the wall. Masson's trichrome-stained slides were used to determine the three components (urothelium, collagen, and striated and smooth muscle) of urethral tissues. The software can distinguish regions stained with different colors and accurately measure the areas. This color segmentation method was employed to determine the tissue area that was stained "pink" (urothelium), "blue" (collagen), and "red" (striated and smooth muscle). In all cases, the images were processed by the same investigators, who were unaware of treatment group assignments.

Moreover, the histological examination of urethral striated muscle was analyzed based on the parameter of thickness of muscle fiber layers. Masson's trichrome-stained slides were also used to determine the fiber diameter (*Leica Qwin Plus*- Quantitative Imaging software) and total layers number (semi-quantitative method) in order to obtain a general standard characteristic of fibers in each group. To analyze the fiber diameter, the Leica Qwin Plus software of image quantitative analysis was used, setting as a parameter the measure of 10 fields at 20X magnification. The fiber size distribution was assessed by measuring the maximum width of all fiber profiles.

Immunohistochemical examination and semi-quantitative analysis

A semi-quantitative method was used to analyze immunohistochemical staining of fast and slow type skeletal muscle fibers. For this analysis, fast and slow type fibers were

considered separately. The intensity of immunolocalization was evaluated by two independent readers and averaged. Photomicrographs of each fiber type were analyzed side by side in the same quadrant in a 40X magnification which allowed counting of the number of fast and slow fiber layers. The same measure was repeated in another quadrant and was considered the average.

Ultrastructural analysis

The ultrastructural composition of the urethral muscle fibers was studied with the transmission electron microscope. Electron micrographs were analyzed to determine muscle fibers and connective tissue in the fascicle. Fiber-to-fiber spacing in relation to connective tissue within the fascicle and estimation of mitochondrial volume fraction per fiber were considered.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SD. Comparisons of measurements among the virgin, pregnant, diabetic and diabetic pregnant groups were performed individually by ANOVA followed by Test of Tukey's Multiple Comparison for variables with normal distribution. Dunnett test was applied for comparison of the study group "diabetic pregnant" versus the other three "control" groups (virgin, pregnant and diabetic). Poisson distribution was performed when the data presented no homogeneous distribution such as layers number. $P < 0.05$ was considered significant. All analyzes were performed using the SAS software for Windows v.9.2.

RESULTS

General characteristics

General physical characteristics (body weight and blood glucose levels) observed in this study were compatible with mild diabetes. The diabetic groups presented glycemic values ranging from 120 to 300 mg/dL (data not shown).

Urethral Histology

The transverse sections of the central part of the urethra in the virgin group showed different circular layers from the lumen to the periphery: stratified squamous epithelium, lamina propria, spongy vascular plexus, smooth muscle (longitudinal and circular fibers) and striated muscle (Figure 2).

Pathological analysis

Figure 3 presents the grade of fibrosis in the four groups. The **virgin** group (10 cases), showed 9 cases of minimal fibrosis and only 1 case showed minimal to moderate fibrosis. No cases with moderate or severe fibrosis were seen. In the **pregnant** group (10 cases), 7 cases showed minimal fibrosis, while 3 cases showed minimal to moderate fibrosis. No case with moderate or severe fibrosis was seen. In the **diabetic** group (10 cases), 3 cases showed minimal fibrosis, 3 cases showed minimal to moderate fibrosis, 2 cases showed moderate fibrosis and 2 cases showed severe fibrosis. In the **diabetic pregnant group** (10 cases), 4 cases showed minimal fibrosis, 5 cases showed minimal to moderate fibrosis and 1 case showed moderate fibrosis. No cases with severe fibrosis were seen.

Morphometric analysis

Table 1 presents the results regarding the morphometric analysis. There were no significant differences in total area, striated and smooth muscle areas between diabetic pregnant group and control groups. The diabetic pregnant group presented lower total collagen area compared to the diabetic group and higher collagen area in striated muscle compared to the pregnant rats. There were no significant differences in collagen area in smooth muscle. Regarding the ratios analyzed, the *collagen area in striated muscle/striated muscle area* was significantly higher in the diabetic pregnant group than the pregnant and diabetic group and *total collagen/ total area* was significantly lower in the diabetic pregnant than the diabetic group. There were no significant differences in *striated muscle area/total area*. The urothelium area was significantly smaller in the diabetic pregnant group than in the pregnant group. The blood vessels area was significantly higher in the diabetic pregnant group compared to the virgin, pregnant and diabetic groups. The lumen perimeter was significantly lower in the diabetic pregnant group than in the diabetic group.

Immunohistochemical examination, morphological and semi-quantitative analyses of urethral striated muscle fiber composition

In the **virgin** group, immunohistochemical staining revealed that the striated myofibers predominantly expressed the fast myosin heavy chain isoform. The layer containing fast fibers was thick and the fibers were present throughout the outer circular layer (Figure 4-A). A thin, inner circular layer of slow striated muscle fibers was observed with individual fibers being small and thin (Figure 4-B). The image shows different localization patterns for each type of fibers, with fast fibers being outermost and slow fibers innermost.

The immunohistochemical staining in the **pregnant** group revealed that the distribution of fast and slow fibers and the proportion between them were similar to those of the virgin group (Figure 4-C-D).

In the **diabetic** group, the immunohistochemical staining revealed that the specific localization for each type of fiber was lost, with co-localization of fast and slow fibers and a decrease in the proportion of fast to slow fibers (Figure 4-E-F). The **diabetic pregnant** group also revealed a loss of specific localization for each type of fiber, with co-localization of fast and slow fibers and a decrease in the proportion of fast to slow fibers (Figure 4-G-H).

The analysis of profile and standard fibers in each group performed by measuring fiber diameter (Masson's trichrome) and number of layers (fast and slow fibers) were performed in accordance with Figure 5 and the data are shown in Figure 6. The fiber diameters were significantly lower in diabetic pregnant group than in the virgin and pregnant groups and significantly higher than the diabetic group. The total number of layers was significantly lower in diabetic pregnant group than in the virgin and pregnant groups. The number of layers of fast fibers was significantly lower in diabetic pregnant group than in the virgin group. The number layers of slow fibers was significantly higher in the diabetic pregnant group than in the virgin and pregnant groups.

Ultrastructural analysis

In the ultrastructural analysis, the urethral striated muscle in the virgin group showed well-organized myofibrils forming intact sarcomeres with morphological characteristics related to different muscle types, with no signs of change. Abundant intermyofibrillar mitochondria and rare lipid droplets were observed. There was no detectable increase in the interstitial connective tissue and the collagen was scarce between myofibrils. Glycogen

granules dispersed, subsarcolemmal and intermyofibrillar were observed (Figure 7, A-B). In the pregnant group, there was a considerable increase in the caliber of fibers compared to the virgin group, with an apparent decrease in intermyofibrillar collagen and more mitochondria. Also, many vacuoles containing myelin figures were found, which characterizes degenerated cells. The glycogen granules were dispersed in the usual form and quantity (Figure 7, C-D). In the diabetic group, the muscle fibers showed a reduction in their diameters with increased interfibrillar and intermyofibrillar collagen. Lipid droplets were noted, especially in the band I and between myofibrils where mitochondria accumulate. Furthermore, numerous subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria were apparent in the striated muscle cells. The glycogen granules were dispersed in larger quantities (Figure 7, E-F). In the pregnant diabetic group, as found in the diabetic group, the muscle fibers showed a reduction in their diameters with increased interfibrillar and intermyofibrillar collagen. Lipid droplets and increase vacuoles were noted, especially in band I and between myofibrils where mitochondria accumulate. Numerous subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria were apparent in striated muscle cells. The glycogen granules were dispersed in larger quantities (Figure 7, G-H).

In summary, the **virgin group** presents striated muscle fiber with many layers and compact outer circular layers. The fibers were long, with similar thickness throughout the circumference. The layer containing fast fibers was thick and the fibers were present throughout the outer circular layer. A thin, inner circular layer of slow striated muscle fibers was observed with individual fibers being small and thin. The image suggested different localization patterns for each type of fibers, with fast fibers being outermost and slow fibers innermost. The myofibrils were well-organized and were noted abundant intermyofibrillar mitochondria and rare lipid droplets.

The **pregnant group** had a similar appearance to the striated muscle layer of the virgin group. An increase in connective tissue separated the fibers from one another. The most important finding in this group was the large interstitial spaces found between fibers. The distribution of fast and slow fibers and the proportion between them were similar to those of the control group. The myofibrils were voluminous and the myelin figures were evident.

In the **diabetic group** the circular annulus was lost. There was obvious fiber thinning and atrophy, and the striated muscle was disrupted and disorganized. The specific localization for each type of fiber was lost, with co-localization of fast and slow fibers and there was a decrease in the proportion of fast to slow fibers. There was collagen infiltration between myofibrils characterizing the fibrosis. Mitochondria accumulation, lipid droplets and glycogen granules were noted.

The **diabetic pregnant group** had increases in connective tissue separating the fibers from one another and the great interstitial spaces similar to the pregnant group. The fiber layers, as found in the diabetic group, were thin, atrophic, and disorganized, and the striated muscle was disrupted. There was a loss of specific localization for each type of fiber, with co-localization of fast and slow fibers and a decrease in the proportion of fast to slow fibers. Lipid droplets and increase vacuoles were noted, especially between myofibrils where mitochondria accumulate. The glycogen granules were dispersed in larger quantities.

DISCUSSION

In the present study, it was verified that a mild hyperglycemia state has several effects on the whole system responsible for urinary continence in pregnant rats. This whole system composed by ECM and urethral striated muscle presented many complications in diabetic pregnant rats compared to the three control groups. The urethral layers were thin,

disorganized, atrophic, with increased blood vessels, decreased urothelium area and accumulation of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria, lipid droplets and glycogen granules. One of the most significant findings was the co-localization of fast and slow fibers and a steady decrease in the proportion of fast to slow fibers. In the ECM, fibrosis replacement/collagen fiber deposition associated with muscle atrophy was found.

Furthermore, the present study demonstrated the fibers diameter and total number of layers were significantly lower in the diabetic pregnant group compared with the control groups. Diabetes induced extensive damage, including thinning and atrophy, disorganization, and disruption of the circular annulus of striated muscle has been described in the literature previously (12). Diabetes related accumulation of reactive oxygen species and tissue ischemia which can interactively or independently contribute to the myopathy causes of skeletal muscle dysfunctions (31). The specific loss of skeletal muscle mass is referred to as diabetic myopathy (32).

Chen *et al.* (33) confirmed a higher proportion of type I fibers and the presence of fast-to-slow fiber-type switching, which appears to be dissociated from the expected change in oxidative capacity. It is well established that the muscle fibers are able of altering their physiological properties and biochemical according to stimulus which they are submitted, with the result reflecting the amount or type of muscle proteins. This capability adaptive involving different fiber components with respect to plasticity muscle (34). These changes are often associated with altered glucose metabolism, diabetes and obesity (35). Since muscle is a main site of glucose uptake, reduced muscle mass and changes in fiber type composition may directly impair acute glucose utilization. Skeletal muscle can adapt to functional and metabolic demands by remodeling with fiber type switches to maintain a normal energy balance and utilization of nutrients. High levels of glucose can also contribute to mitochondrial dysfunction in individuals with DM 2. Mitochondrial respiration was

approximately 20% lower in patients with type 2 diabetes, but the reason for this reduction is unknown (36).

These structural, pathological, immunohistochemical and ultrastructural analyses in the present study allowed us to deepen our understanding and confirm our previous findings that diabetic myopathy and pregnancy are involved in the pathogenesis of urinary incontinence (11). Surprisingly, these results in mild diabetes were very similar to results observed in models of severe diabetes. Our previous hypothesis was that mild diabetes leads to low intensity changes compared to severe diabetes (blood glucose > 300mg/dL). The possible explanation for these unexpected results could be dependent not only on the hyperglycemic levels but also from the duration of exposure of mild glycemic levels. Our results suggest that this model of mild diabetes and pregnancy can lead to a time-dependent disorder in urethral muscle.

Pelvic support relies on a functional ECM in the connective tissue. ECM is a complex mixture of long chain proteins, including collagen, elastin and proteoglycans. Consequently ECM metabolism has been the focus of many studies on UI which indicate that an abnormal ECM is associated with UI. However, few in vitro and animal studies support a cause and effect relationship. Our results and other studies can confirm that this progressive, abnormal remodeling ultimately destroys normal tissue architecture and mechanical properties, resulting in a lack of urethral support (20).

A study conducted by Kim et al (2007) found thinning and atrophy urethral-vaginal septum in diabetic animals. There was increased deposition of collagen fibers around the urethral striated muscle of diabetic animals compared with control. These data corroborate our findings: the pathological analysis showed that there was more fibrosis replacement/collagen fiber deposition associated to muscle atrophy in the diabetic and diabetic pregnant groups in relation with the pregnant and virgin groups.

In the diabetic pregnant rats, there was lower total collagen area and lower lumen perimeter compared to the diabetic group, showing the physiological adaptations of pregnant rats to a most unusual endocrine milieu (37). Moreover, the diabetic pregnant group showed higher collagen area in striated muscle compared to the diabetic and pregnant rats, suggesting that there was an increase of collagen in diabetic and diabetic pregnant groups compared to control and pregnant groups. Pitre et al (2002) showed a progressive increase in total bladder tissue and lumen area of diabetic rats compared to control, demonstrating the classic morphological changes characterized by hypertrophy and dilation associated with collagen content decreased. These results confirmed the time-dependent urinary remodeling tissue in streptozotocin-induced diabetic rat model (38).

The diabetic pregnant group also showed lower urothelium area compared to pregnant rats. The urothelium has important roles in the filling and distension phases of the bladder, in the synthesis of several prostaglandins and eicosanoids, and in the contractile response of the bladder in the presence of various stimuli. In 2005 it was demonstrated the possible effects of diabetes on the urothelium during this physiopathological process (39), suggesting that possible changes in the urothelium can play a role in the increased in vitro contractile responses in diabetes. Further studies are required for elucidation of the changes in urothelium affected by factors such as diabetes.

Vascular complications are also associated with the progressive severity of diabetes, resulting in significant morbidity and mortality (40). The present study showed a significant increase in blood vessels in the urethra of diabetic pregnant rats compared to all control groups. A recent study described the diabetic time-dependent alterations in macrovascular structure and cellular function (40). Diabetes significantly altered mitochondrial morphology in the vascular smooth muscle cells. Similar changes have been reported previously in vascular endothelial cells from a mouse model of diabetes (41). It has been suggested that one

of the underlying mechanisms responsible for diabetes-induced vascular disease is uncoupled mitochondria, with increased electron leak and the generation of reactive oxygen species (40). Detrusor smooth muscle cells seem to be modulated directly by hyperglycemia. Data support the theory that hyperglycemia-induced oxidative stress in the detrusor smooth muscle and that micro- and macrovascular events are also responsible for urologic complications of diabetes. Future research should focus on the effects of diabetes as a function of time and development of novel animal models to study defined aspects as well as interaction of different aspects such as oxidative stress in neurogenic, myogenic and urothelial components and the role of inflammation and hypoxia caused by vascular complications (42).

The ultrastructural analysis allowed us to confirm and explain structural changes. The diabetic pregnant rats showed a reduction in diameter of muscle fibers with increased interfibrillar and intermyofibrillar collagen. Glycogen granules, lipid droplets and numerous subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria were apparent in the striated muscle cells. Lipid droplets are not membrane-bound, and their number and size may vary considerably among different muscle types and in the same type of muscle in different areas of the body. They are frequently associated with mitochondria and sometimes completely encircled by a mitochondrion. Experimental enzyme deficiencies in mitochondrial energy metabolism induced the accumulation of giant mitochondria and numerous lipid droplets. This has led to the suggestion that mitochondria may use lipids as a source of energy for muscular contraction. The increased number of lipid droplets in the diabetic pregnant rats indicates that lipids may be an important energy source for striated muscle (43). This could be very important since both are two of the triumvirate pieces in diabetic energy: muscles, adipocyte and liver (44).

The ultrastructural modification on skeletal muscle from diabetic animals showed that the mitochondria were swollen, with disorganization of their cristae and disruption of T

tubules. The myofibers presented more deposition of glycogen granules. These changes revealed early STZ-induced nerve and muscle alterations and were possibly related to alterations in calcium mobilization across muscle membrane. Other mechanisms such as free radical-mediated actions may also be implicated in STZ induced effects on skeletal muscle (45).

In this paper we have been able to document structural and ultrastructural changes in the components of urethral striated muscles and the ECM of diabetic pregnant rats. An underlying abnormality of the ECM associated with the changes in the morphological characteristics of urethral striated muscles in diabetic pregnant rats demonstrated that mild diabetes causes tissue remodeling by fiber type switching in which the whole system has a fundamental function. These diverse structural and ultrastructural changes may be explained by time-dependent tissue remodeling in mild diabetic rats induced by STZ (42, 46), since these animals were exposed to a hyperglycemic environment since birth.

CONCLUSION

This study allowed us to confirm and deepen our previous translational results (11). In addition to the morphological changes in muscle mass and the fast *vs* slow fiber profiles of the urethral striated muscle fibers, diabetic pregnant rats demonstrated several structural and ultrastructural changes in the muscle and ECM. The results of the present study confirm that mild diabetes in pregnant rats is a time-dependent disorder with tissue remodeling characterized by changes in the composition of urethral muscle and ECM.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the staff of the Laboratory for Experimental Research in Gynecology and Obstetrics, Laboratory of Anatomy and Laboratory of Morphology especially to Talísia Moretto and Gelson Rodrigues, for the excellent technical and scientific contribution. They are also thankful to Prof. Dr. Steven Sol Witkin (Cornell University, USA) and to Prof. Dr. Firouz Daneshgari and all staff of the Department of Urology (Case Western Reserve University, USA) by excellent technical and mainly scientific contributions. This study was supported by grants from FAPESP/Brazil (Fellowship Process Number 2010/13303-3 and 2012/00099-4) and CNPQ (Process Number 473673/2011-8) at Fernanda Piculo, as part of her thesis.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Canda AE. Diabetes might adversely affect expression and function of interstitial cells in the urinary bladder and urethra in humans: a new mechanism in the development of diabetic lower urinary dysfunction? *Medical hypotheses*. 2011 May;76(5):632-4. PubMed PMID: 21288651. Epub 2011/02/04. eng.
2. Brown JS, Vittinghoff E, Lin F, Nyberg LM, Kusek JW, Kanaya AM. Prevalence and risk factors for urinary incontinence in women with type 2 diabetes and impaired fasting glucose: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2002. *Diabetes care*. 2006 Jun;29(6):1307-12. PubMed PMID: 16732013. Pubmed Central PMCID: 1557358. Epub 2006/05/30. eng.
3. Pan HQ, Lin DL, Strauch C, Butler RS, Monnier VM, Daneshgari F, et al. Pudendal nerve injury reduces urethral outlet resistance in diabetic rats. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010 Dec;299(6):F1443-50. PubMed PMID: 20881033. Pubmed Central PMCID: 3006305.
4. Barbosa AM, Dias A, Marini G, Calderon IM, Witkin S, Rudge MV. Urinary incontinence and vaginal squeeze pressure two years post-cesarean delivery in primiparous women with previous gestational diabetes mellitus. *Clinics*. 2011;66(8):1341-6. PubMed PMID: 21915481. Pubmed Central PMCID: 3161209.
5. Kim C, McEwen LN, Sarma AV, Piette JD, Herman WH. Stress urinary incontinence in women with a history of gestational diabetes mellitus. *Journal of women's health*. 2008 Jun;17(5):783-92. PubMed PMID: 18537481. Pubmed Central PMCID: 2942747. Epub 2008/06/10. eng.
6. Boncher N, Vricella G, Kavran M, Xiao N, Hijaz A. Setting a new standard: updating the vaginal distention translational model for stress urinary incontinence. *Neurourology and urodynamics*. 2012 Jan;31(1):190-4. PubMed PMID: 22038896. Epub 2011/11/01. eng.
7. Sung NS, Crowley WF, Jr., Genel M, Salber P, Sandy L, Sherwood LM, et al. Central challenges facing the national clinical research enterprise. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003 Mar 12;289(10):1278-87. PubMed PMID: 12633190.
8. Narayan KM, Gregg EW, Engelgau MM, Moore B, Thompson TJ, Williamson DF, et al. Translation research for chronic disease: the case of diabetes. *Diabetes care*. 2000 Dec;23(12):1794-8. PubMed PMID: 11128355.
9. Kirschner-Hermanns R, Daneshgari F, Vahabi B, Birder L, Oelke M, Chacko S. Does diabetes mellitus-induced bladder remodeling affect lower urinary tract function?: ICI-RS 2011. *Neurourol Urodyn*. 2012 Mar;31(3):359-64. PubMed PMID: 22415965. Epub 2012/03/15. eng.
10. Weber AM, Buchsbaum GM, Chen B, Clark AL, Damaser MS, Daneshgari F, et al. Basic science and translational research in female pelvic floor disorders: proceedings of an NIH-sponsored meeting. *Neurourol Urodyn*. 2004;23(4):288-301. PubMed PMID: 15227643. Epub 2004/07/01. eng.
11. Marini G, Barbosa AM, Damasceno D, Matheus SMM, Castro RA, Girão MJBC, et al. Morphological changes in the fast vs slow fiber profiles of the urethras of diabetic pregnant rats. *Urogynaecologia*. 2011;25(9):31-6.
12. Kim JH, Huang X, Liu G, Moore C, Bena J, Damaser MS, et al. Diabetes slows the recovery from urinary incontinence due to simulated childbirth in female rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007 Aug;293(2):R950-5. PubMed PMID: 17491107. Pubmed Central PMCID: 2536602.
13. Liu G, Lin YH, Yamada Y, Daneshgari F. External urethral sphincter activity in diabetic rats. *Neurourology and urodynamics*. 2008;27(5):429-34. PubMed PMID: 18351620.

14. Liu G, Daneshgari F. Temporal diabetes- and diuresis-induced remodeling of the urinary bladder in the rat. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006 Sep;291(3):R837-43. PubMed PMID: 16513765.
15. Heesakkers JP, Gerretsen RR. Urinary incontinence: sphincter functioning from a urological perspective. *Digestion*. 2004;69(2):93-101. PubMed PMID: 15087576. Epub 2004/04/17. eng.
16. Yang JM, Yang SH, Yang SY, Yang E, Huang WC, Tzeng CR. Clinical and pathophysiological correlates of the symptom severity of stress urinary incontinence. *International urogynecology journal*. 2010 Jun;21(6):637-43. PubMed PMID: 20135305. Epub 2010/02/06. eng.
17. Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, et al. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2008 Feb 15;44(4):584-93. PubMed PMID: 18053817. Epub 2007/12/07. eng.
18. Andersen H. Muscular endurance in long-term IDDM patients. *Diabetes Care*. 1998 Apr;21(4):604-9. PubMed PMID: 9571350. Epub 1998/05/08. eng.
19. Andersen H, Poulsen PL, Mogensen CE, Jakobsen J. Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. *Diabetes*. 1996 Apr;45(4):440-5. PubMed PMID: 8603765. Epub 1996/04/01. eng.
20. Chen B, Yeh J. Alterations in connective tissue metabolism in stress incontinence and prolapse. *The Journal of urology*. 2011 Nov;186(5):1768-72. PubMed PMID: 21944102.
21. Li GY, Cui WS, Zhou F, Gao ZZ, Xin H, Liu T, et al. Pathology of urethral fibromuscular system related to parturition-induced stress urinary incontinence and TGF-beta1/Smad pathway. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012 May;364(1-2):329-35. PubMed PMID: 22307744.
22. Feldner PC, Jr., Kati LM, Sartori MG, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Nader HB, et al. Sulfated glycosaminoglycans of the periurethral tissue in women with and without stress urinary incontinence, according to genital prolapse stage. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2006 Jun 1;126(2):250-4. PubMed PMID: 16314024.
23. Chen CC, Hijaz A, Drazba JA, Damaser MS, Daneshgari F. Collagen remodeling and suburethral inflammation might account for preserved anti-incontinence effects of cut polypropylene sling in rat model. *Urology*. 2009 Feb;73(2):415-20. PubMed PMID: 18829083.
24. Liapis A, Bakas P, Pafiti A, Frangos-Plemenos M, Arnoyannaki N, Creatsas G. Changes of collagen type III in female patients with genuine stress incontinence and pelvic floor prolapse. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2001 Jul;97(1):76-9. PubMed PMID: 11435014.
25. Rechberger T, Postawski K, Jakowicki JA, Gunja-Smith Z, Woessner JF, Jr. Role of fascial collagen in stress urinary incontinence. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998 Dec;179(6 Pt 1):1511-4. PubMed PMID: 9855589.
26. Feldner PC, Jr., Sartori MG, Nader HB, Dietrich CP, Rodrigues de Lima G, Baracat EC, et al. Sulfated glycosaminoglycans of periurethral tissue in pre- and postmenopausal women. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2008 Aug;139(2):252-5. PubMed PMID: 18555582.
27. Mitrano P, Nogueira MD, Feldner PC, Jr., Castro RA, Sartori MG, Nader HB, et al. Metabolic profile of glycosaminoglycans in bladder and urethra of female rats during and after pregnancy. *International urogynecology journal*. 2010 Feb;21(2):241-6. PubMed PMID: 19798458.
28. Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MM, Oshiiwa M, Taylor KN, et al. Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha as predictors of alterations in the embryo-fetal organism and the

- placental development of diabetic rats. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]. 2011 Mar;44(3):206-11. PubMed PMID: 21344139.
29. de Campos KE, Sinzato YK, Pimenta Wde P, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. Life sciences. 2007 Oct 27;81(19-20):1473-8. PubMed PMID: 17961602. Epub 2007/10/27. eng.
30. Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. Diabetes care. 1994 Feb;17(2):152-4. PubMed PMID: 8137688. Epub 1994/02/01. eng.
31. Beshay E, Carrier S. Oxidative stress plays a role in diabetes-induced bladder dysfunction in a rat model. Urology. 2004 Nov;64(5):1062-7. PubMed PMID: 15533519.
32. Krause MP, Riddell MC, Gordon CS, Imam SA, Cafarelli E, Hawke TJ. Diabetic myopathy differs between Ins2Akita+/- and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. Journal of applied physiology. 2009 May;106(5):1650-9. PubMed PMID: 19246652.
33. Chen M, Feng HZ, Gupta D, Kelleher J, Dickerson KE, Wang J, et al. G(s)alpha deficiency in skeletal muscle leads to reduced muscle mass, fiber-type switching, and glucose intolerance without insulin resistance or deficiency. American journal of physiology Cell physiology. 2009 Apr;296(4):C930-40. PubMed PMID: 19158402. Pubmed Central PMCID: 2670650.
34. Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. Journal of applied physiology. 2001 Jan;90(1):345-57. PubMed PMID: 11133928.
35. Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, et al. Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes care. 2006 Apr;29(4):895-900. PubMed PMID: 16567834.
36. Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, Glintborg D, Vind BF, Beck-Nielsen H, et al. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes. 2007 Jun;56(6):1592-9. PubMed PMID: 17351150.
37. F. Gary Cunningham, Kenneth J. Leveno, Steven Bloom, John C. Hauth, Dwight J. Rouse, Spong CY. Williams Obstetrics 2009.
38. Pitre DA, Ma T, Wallace LJ, Bauer JA. Time-dependent urinary bladder remodeling in the streptozotocin-induced diabetic rat model. Acta diabetologica. 2002 Apr;39(1):23-7. PubMed PMID: 12043935.
39. Kosan M, Hafez G, Ozturk B, Ozgunes O, Gur S, Cetinkaya M. Effect of urothelium on bladder contractility in diabetic rats. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association. 2005 Jul;12(7):677-82. PubMed PMID: 16045562.
40. Searls Y, Smirnova IV, Vanhooose L, Fegley B, Loganathan R, Stehno-Bittel L. Time-dependent alterations in rat macrovessels with type 1 diabetes. Experimental diabetes research. 2012;2012:278620. PubMed PMID: 22315586. Pubmed Central PMCID: 3270547.
41. Makino A, Scott BT, Dillmann WH. Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. Diabetologia. 2010 Aug;53(8):1783-94. PubMed PMID: 20461356. Pubmed Central PMCID: 2892085.
42. Kirschner-Hermanns R, Daneshgari F, Vahabi B, Birder L, Oelke M, Chacko S. Does diabetes mellitus-induced bladder remodeling affect lower urinary tract function? ICI-RS 2011. Neurourology and urodynamics. 2012 Mar;31(3):359-64. PubMed PMID: 22415965.
43. Bakircioglu ME, Sievert KD, Lau A, Lin CS, Lue TF. The effect of pregnancy and delivery on the function and ultrastructure of the rat bladder and urethra. BJU international. 2000 Feb;85(3):350-61. PubMed PMID: 10671896.

44. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009 Apr;58(4):773-95. PubMed PMID: 19336687. Pubmed Central PMCID: 2661582.
45. Fahim MA, Hasan MY, Alshuaib WB. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. *Journal of applied physiology*. 2000 Dec;89(6):2235-40. PubMed PMID: 11090573.
46. Daneshgari F, Liu G, Birder L, Hanna-Mitchell AT, Chacko S. Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *The Journal of urology*. 2009 Dec;182(6 Suppl):S18-26. PubMed PMID: 19846137.

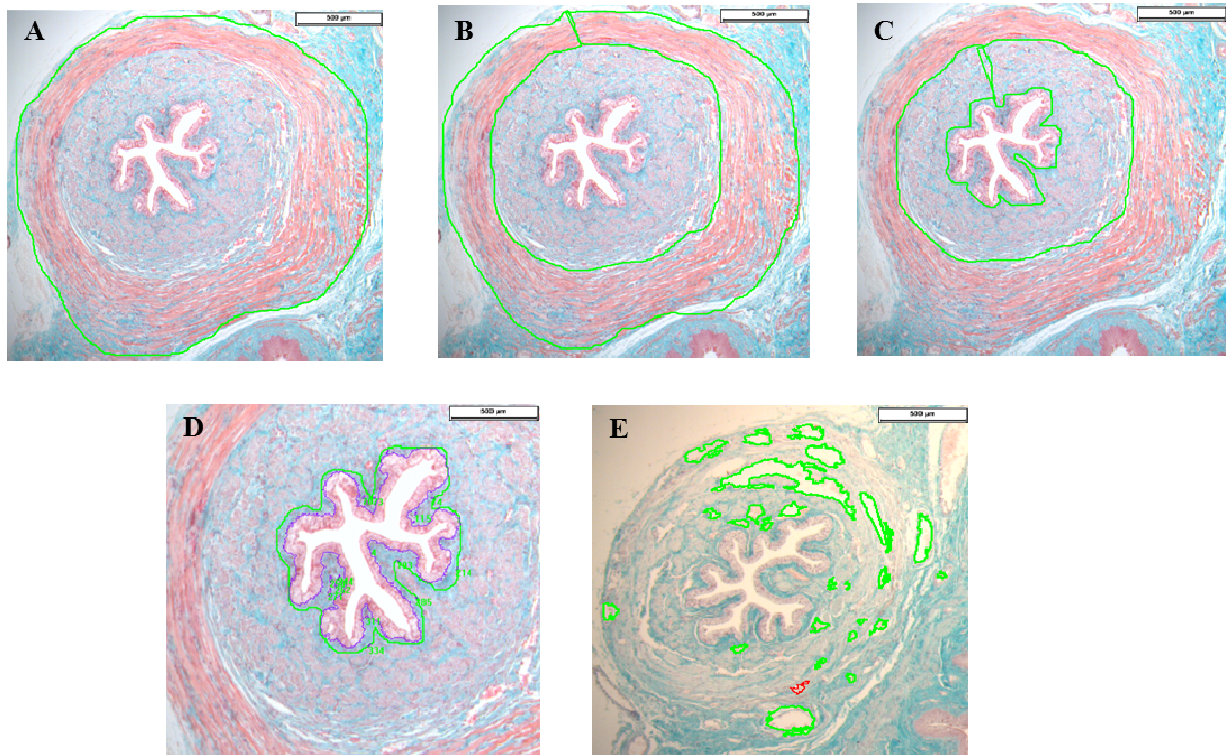


Fig.1. A–E: Image analysis of a Masson’s trichrome-stained equatorial section of a urethra of rat demonstrating measurement of (A) total area (collagen and muscle), (B) striated muscle area, (C) smooth muscle area, (D) urothelium area and (E) blood vessels. Striated and smooth muscle (red), collagen (blue), and urothelium (pink) were recognized and captured by automated digital image analyzer for measurement of total tissue cross-sectional area. Scale bars= 500 µm.

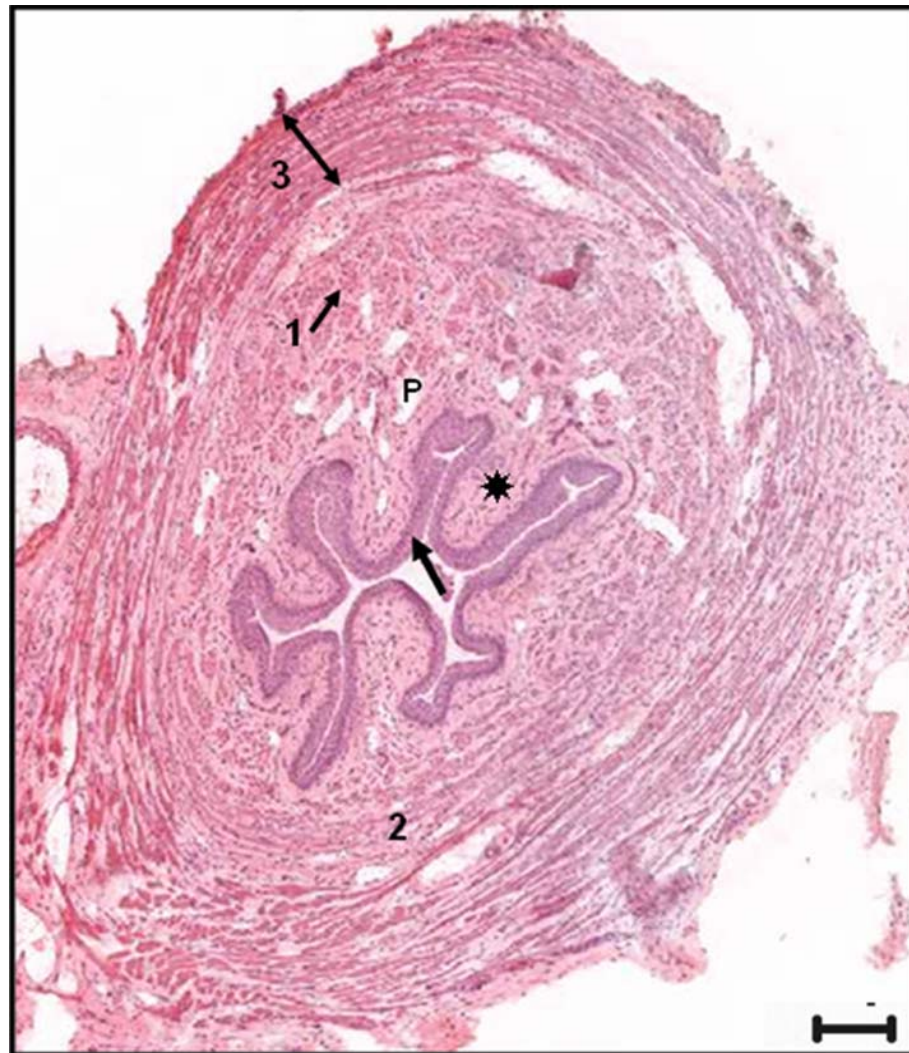


Figure 2. Photomicrograph of transverse section of the central part of the urethra in a control virgin female rat. Different circular layers are evident from the lumen to the periphery: epithelium (arrow), lamina propria (*), spongy vascular plexus (P), smooth muscle [longitudinal (1) and circular (2) oriented fibers, and striated muscle (3). H&E stained. Magnification x 50. Scale bars = 100 μ m.

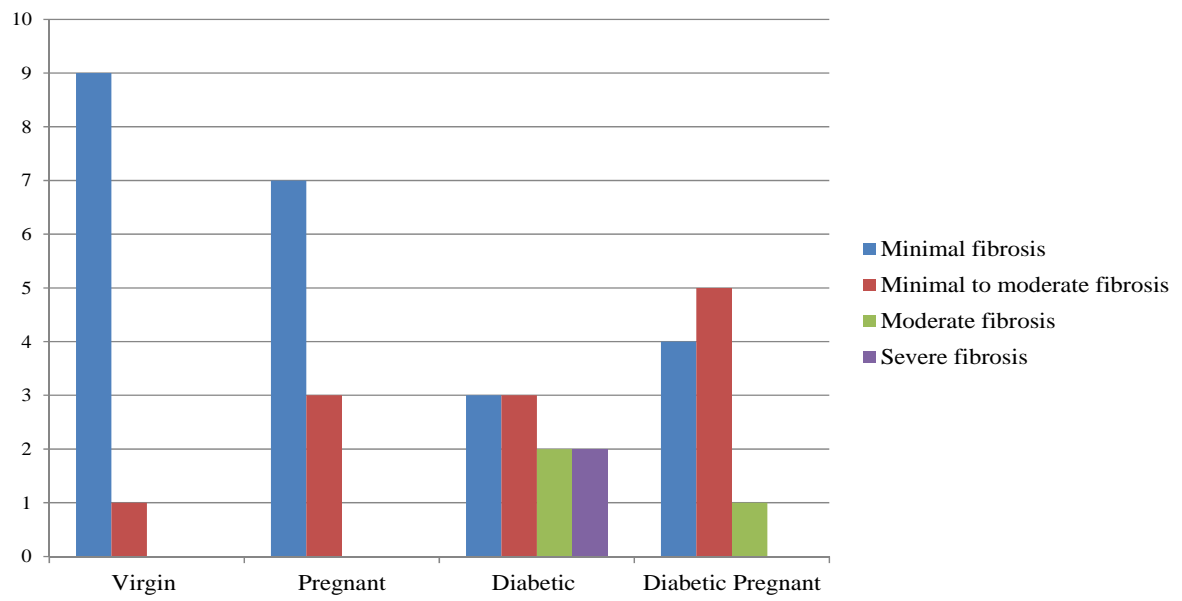


Figure 3. Pathological analysis for the grade of fibrosis in virgin, pregnant, diabetic and diabetic pregnant rats.

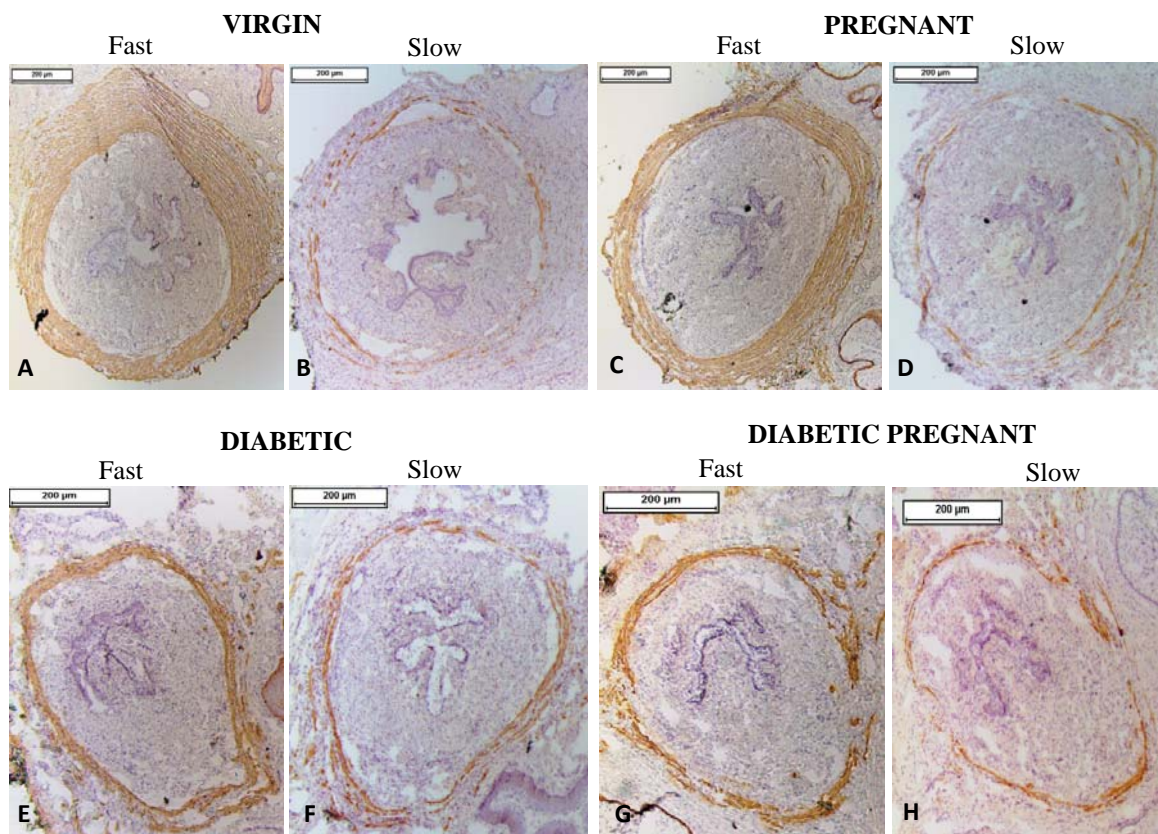


Figure 4. Photomicrographs of urethras of rat after immunohistochemistry for fast (A-C-E-G) and slow (B-D-F-H) fibers. Magnification x4. Scale bars = 200 µm.

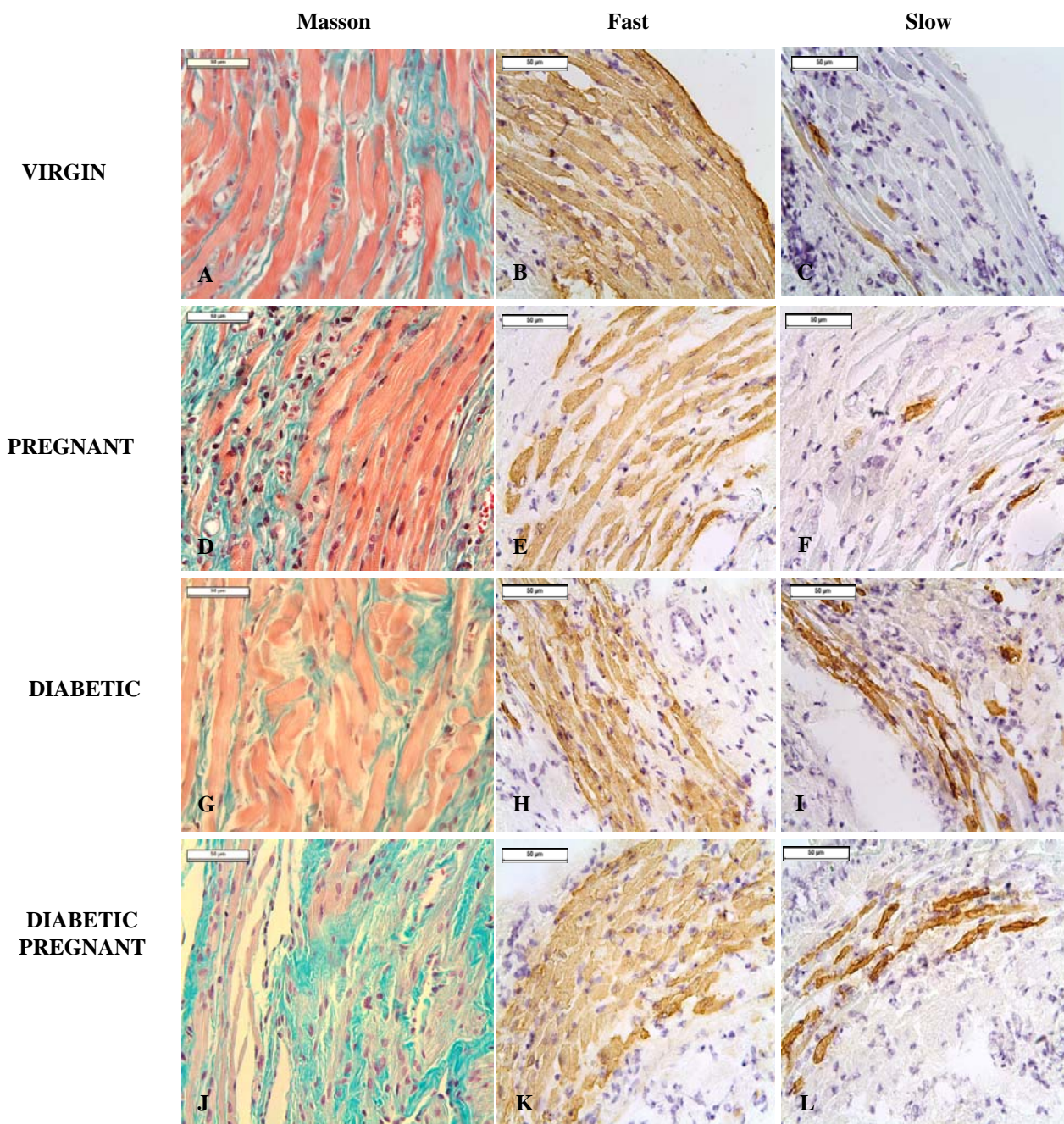


Figure 5. Photomicrographs of urethras of rat after Masson's trichrome-stained (A-D-G-J) and immunohistochemistry for fast (B-E-H-K) and slow (C-F-I-L) fibers. Magnification x40. Scale bars = 50 μ m.

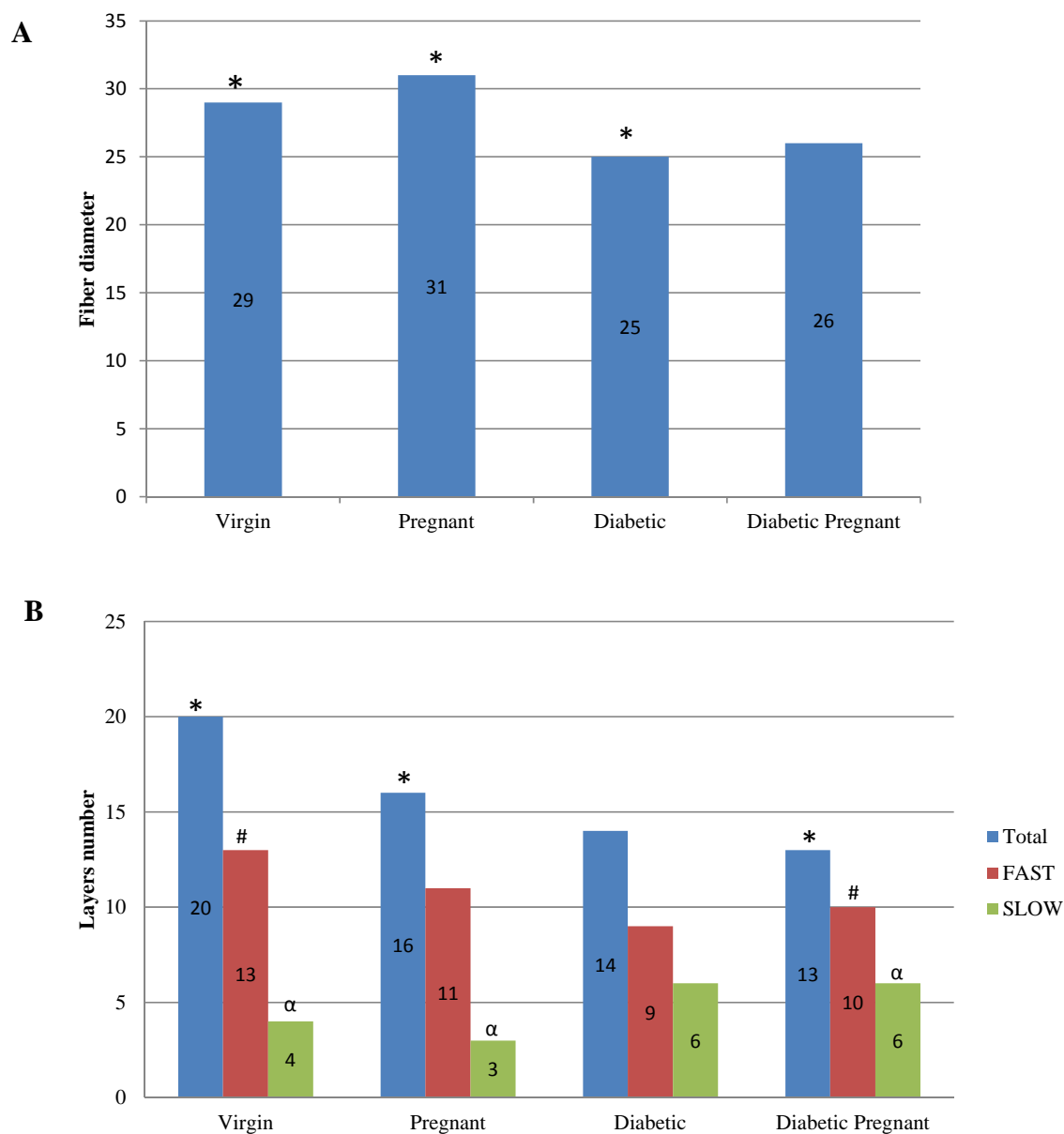


Figure 6. The analysis of (A) fiber diameter and (B) number of layers (total, fast and slow fibers) in virgin, pregnant, diabetic and diabetic pregnant rats.

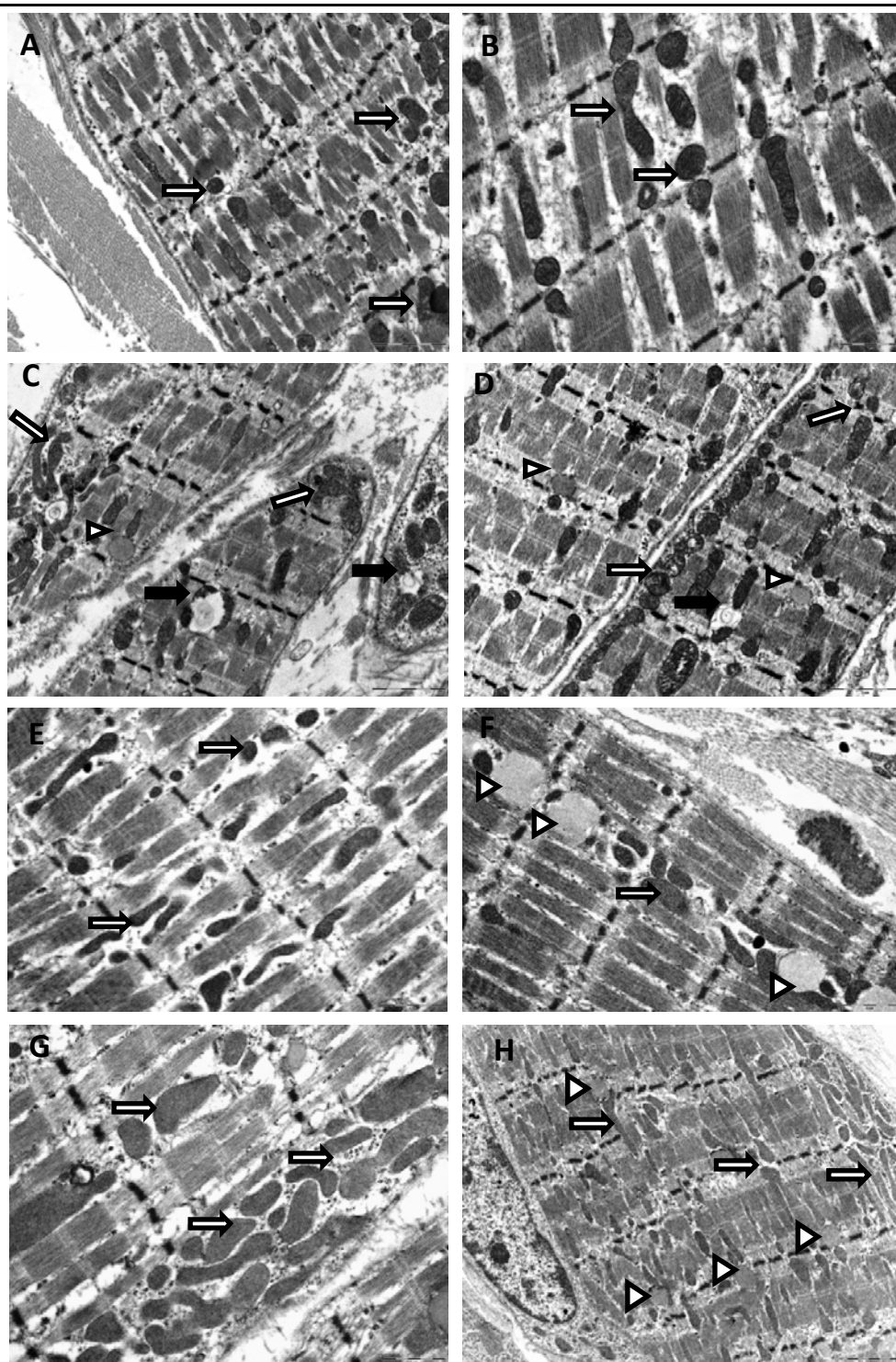


Figure 7. Electron micrographs of urethra striated muscle cells from rat (A-B) virgin, (C-D) pregnant, (E-F) diabetic and (G-H) diabetic pregnant rats. Note the well-organized myofibrils forming intact sarcomeres and abundant intermyofibrillar mitochondria (arrows) in A-B. There were lipid droplets (arrowheads) in C-D, especially between myofibrils where mitochondria accumulate (arrows). In the diabetic and diabetic pregnant group note the apparent reduction in the caliber of fibers with increased interfibrillar and intermyofibrillar collagen. The glycogen granules were dispersed in larger quantities. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial accumulation (arrows) and lipid droplets (arrowheads) were observed in E-F and G-H. Scale bar = 2 μ m.

Table 1. Morphometric variation of striated urethral muscle and extracellular matrix in diabetic pregnant group compared to the virgin, pregnant and diabetic rats.

	Virgin	Pregnant	Diabetic	Diabetic
	a	b	c	Pregnant
Total area	1690533.88± 340065.25	1612309.22 ± 254394.59	1838517.83 ± 252389.47	1598653.33 ± 106787.99
Striated muscle area	607842.63 ± 230082.09	514117.11 ± 124490.27	677349.50 ± 52587.15	511509.67 ± 86250.82
Smooth muscle area	290995.63 ± 98016.92	317570.44 ± 47839.92	364468.50 ± 49771.78	331983.83 ± 60248.45
Total collagen area	538047.88 ± 90007.05	559628.22 ± 83759.77	861287.67 ± 177828.13	602780.33 ± 99298.86 c
Collagen area in striated muscle	288194.50 ± 57607.96	215533.11 ± 46448.25	337200.17 ± 58964.70	387282.67 ± 130095.18 b
Collagen area in smooth muscle	215214.88 ± 65480.32	238536.67 ± 68150.12	350251.17 ± 62317.09	315463.50 ± 111456.81
Striated muscle area/ Total area	0.35 ± 0.08	0.32 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.32 ± 0.05
Collagen area in striated muscle/ Striated muscle area	0.54 ± 0.23	0.43 ± 0.10	0.51 ± 0.13	0.76 ± 0.23 bc
Total collagen/ Total area	0.33 ± 0.08	0.35 ± 0.03	0.47 ± 0.08	0.38 ± 0.06 c
Urothelium	110505.63 ± 24435.21	130772.67 ± 15506.52	104548.17 ± 29859.02	85592.00 ± 10872.79 b
Blood vessels	31286.38 ± 27541.92	18841.44 ± 10901.16	26811.33 ± 7897.24	66337.83 ± 12491.27 abc
Lumen perimeter	2279.75 ± 733.61	2726.44 ± 294.88	3652.50 ± 758.35	2723.83 ± 629.64 c

The results are expressed in μm . Values are means \pm SD.

a $P < 0.05$ - Significantly different from virgin group

b $P < 0.05$ - Significantly different from pregnant group

c $P < 0.05$ - Significantly different from diabetic group



Capítulo 3

ATLAS HISTOLÓGICO DA URETRA DE RATAS**1) Histórico**

A necessidade de elaboração deste atlas surgiu após estudo experimental realizado em nosso laboratório (Marini et al. 2011), que avaliou as alterações morfológicas das fibras musculares da uretra de ratas prenhes diabéticas. Este estudo apresentou diversas dificuldades relacionadas tanto ao conhecimento anatômico e histológico da uretra quanto a metodologia utilizada: 1) a dissecação da uretra de forma isolada levou a grande perda tecidual, indicando a necessidade de retirá-la em conjunto com a vagina, o que possibilita melhor análise; 2) a falta de padronização na forma de congelamento e armazenamento dos materiais resultaram na degradação tecidual e aparecimento de artefatos histológicos que interferem na interpretação dos resultados; 3) o uso de cortes transversais aleatórios seccionados em criostato não permitiram a identificação de um padrão histológico que pudesse ser utilizado para todas as uretras, o que foi possível somente após a análise de cortes seriados que evidenciaram a região média da uretra como o local de maior quantidade e melhor visualização de fibras musculares estriadas; 4) dificuldade na padronização dos tempos utilizados nas etapas das reações imunistoquímicas e da melhor diluição dos anticorpos para fibras rápidas e lentas.

Assim, diante da necessidade de aprofundar o conhecimento das alterações encontradas na uretra de ratas prenhes diabéticas e de melhor direcionamento dos estudos relacionados ao trato urinário inferior, tornou-se primordial a elaboração de um material-base que abordasse as estruturas anatômicas e morfológicas gerais da uretra, bem como o detalhamento das metodologias empregadas para possibilitar o entendimento básico dos mecanismos que levam às alterações nos componentes estruturais da uretra, além de servir como modelo para estudos posteriores.

2) Equipe

Coordenação

Fernanda Piculo

Gabriela Marini

Marilza Vieira Cunha Rudge

Professores Colaboradores

Yuri Karen Sinzato

Débora Cristina Damasceno

Selma Maria Michelin Matheus

Sérgio Luis Felisbino

Angélica Mércia Pascon Barbosa

Colaboração Técnica

Talísia Moreto

Gelson Rodrigues

Sérgio Alexandre Alcântara do Santos

Flávia Karina Delella

Jaqueline Rinaldi

3) Objetivo

O objetivo deste atlas é construir uma fonte compreensível na avaliação das estruturas que compõem a uretra em modelos experimentais. Essa documentação será útil para alunos de graduação e pós-graduação em treinamento na pesquisa experimental, bem como para pesquisadores envolvidos na área de uroginecologia e obstetrícia. Os tópicos incluem as análises morfológicas utilizando diversas colorações no intuito de analisar os componentes estruturais e ultraestruturais da uretra.

4) Metodologia e equipamentos

4.1) Métodos histológicos para avaliação dos componentes uretrais de ratas

4.1.1) Microscopia fotônica convencional

A correta observação do material biológico, em microscopia óptica, implica uma série de procedimentos técnicos prévios, que a seguir se descrevem sumariamente. Estes procedimentos, designam-se genericamente por técnicas histológicas.

A técnica histológica visa à preparação dos tecidos destinados ao estudo à microscopia de luz. O exame ao microscópio é feito geralmente por luz transmitida, o que

significa que a luz deve atravessar o objeto a ser examinado. Assim, é necessária a obtenção de fragmentos dos tecidos que serão coletados em lâminas muito finas e transparentes.

Fixação do tecido

Tem por finalidade conservar os tecidos com o aspecto mais próximo possível daquele do material vivo. O fixador mais frequentemente utilizado é o Formol a 10%. O órgão é submerso em formol e, dependendo da densidade do tecido, do seu tamanho e da temperatura ambiente, a fixação pode ser mais rápida ou mais lenta. Após a fixação, o material é examinado e os fragmentos são retirados para serem processados e analisados microscopicamente. Estes fragmentos são então acondicionados em pequenas caixas perfuradas de plástico (cassetes) com a identificação do material (Figura 1-A).

Processamento em parafina e inclusão

Tem por finalidade retirar a água do tecido e substituí-la por parafina, o que torna o tecido mais firme e, portanto, passível de ser cortado em fatias delgadas (4 a 10 μm). Isto é feito pela imersão dos cassetes em banhos sucessivos de álcool (que retira a água mas não se mistura com parafina), de xilol (que se mistura tanto com o álcool quanto com a parafina) e finalmente em parafina aquecida (entre 55 e 60°C). Desta forma, toda a água do tecido é retirada e substituída por parafina (Figura 1-B). O tecido parafinado é incluído em um pequeno bloco de parafina (Figura 1-C), com a sua identificação e posteriormente submetido à microtomia.

Microtomia e montagem de lâminas

Consiste em cortar o bloco de parafina em fatias muito delgadas. O micrótomo (Figura 1-D) apresenta um componente onde o bloco é mantido firmemente preso e alinhado (braço) e outro mecanismo que movimenta o braço no qual o bloco está preso. Este movimento consiste em um movimento de subida e descida e em outro de avanço. Cada vez que o braço contendo o bloco completa um curso, o bloco é submetido à face afiada de uma navalha de aço e uma fatia delgada de parafina contendo tecido é cortada (Figura 1-E). Estes cortes são então colocados em um banho maria histológico, que contém água aquecida, com a finalidade de distendê-los e, em seguida, os mesmos são colocados em lâminas histológicas (Figura 1-F).

Desparafinização

Antes da coloração das lâminas há necessidade de se retirar a parafina nos quais os cortes acham-se incluídos. Para isto os cortes são submetidos a sucessivos banhos em xilol. Em seguida são submetidos a banhos em álcool em concentração decrescente até serem hidratados. Para observação dos cortes histológicos, há necessidade de corá-los com corantes específicos de acordo com o objetivo do estudo.

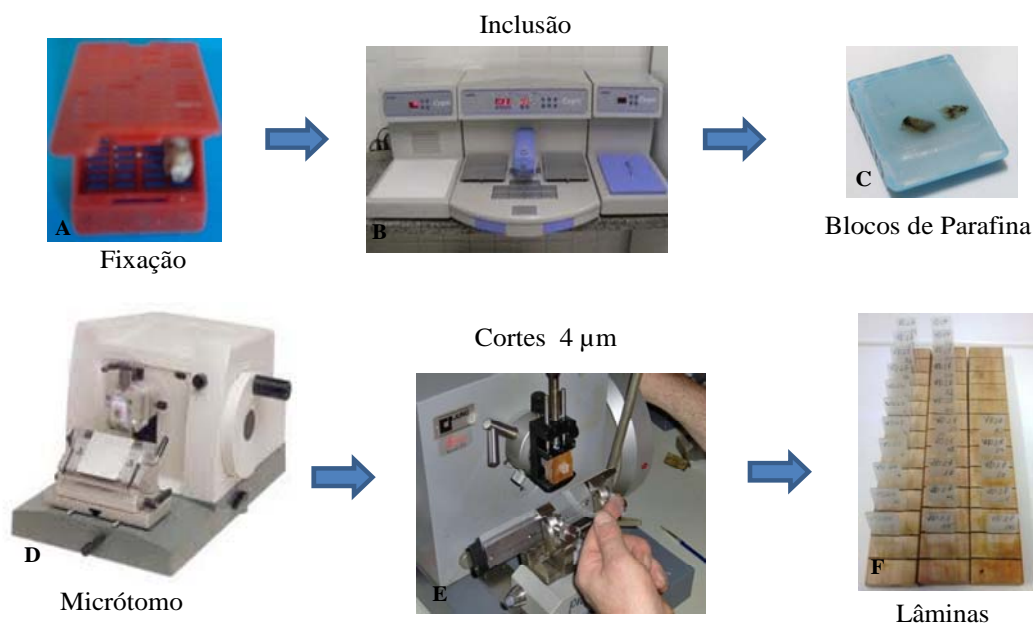


Figura 1. Etapas da microscopia fotônica convencional

Coloração

A coloração consiste em etapa muito importante para a visualização das estruturas do tecido. Normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis, sendo necessário, deste modo, a remoção da parafina da peça que foi preparada nas etapas descritas anteriormente e que permanece na lâmina de vidro.

Existem muitos tipos de corantes, mas de um modo geral podem ser agrupados em três classes distintas:

1. Corantes que diferenciam os componentes ácidos e básicos das células;
2. Corantes especializados que diferenciam os componentes fibrosos da matriz extracelular;
3. Sais metálicos que precipitam nos tecidos.

- **Corantes basófilos** (Hematoxilina, azul de toluidina, azul de metileno e azul de alcian): Comportam-se como cátions e tem caráter básico. De modo geral, as células e tecidos dos

cortes que contêm muitos grupos ácidos tem afinidade por estes corantes e se coram em azul arroxeado. Os núcleos têm grupamentos ácidos nos seus ácidos nucléicos e por isso são basófilos e se coram em roxo pela hematoxilina.

- **Corantes Acidófilos ou Eosinófilos** (Eosina e corantes semelhantes à eosina): Comportam-se como ânions e tem caráter ácido. De modo geral, as células e tecidos dos cortes que contêm muitos grupos básicos tem afinidade por estes corantes e se coram em rosa. As proteínas de modo geral, o citoplasma e as mitocôndrias se coram preferencialmente pelos corantes ácido. A matriz extracelular da maioria dos tecidos, que é muito rica em colágeno, cora-se em rosa pela eosina.

Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a Hematoxilina e a Eosina (HE) (Figura 2).

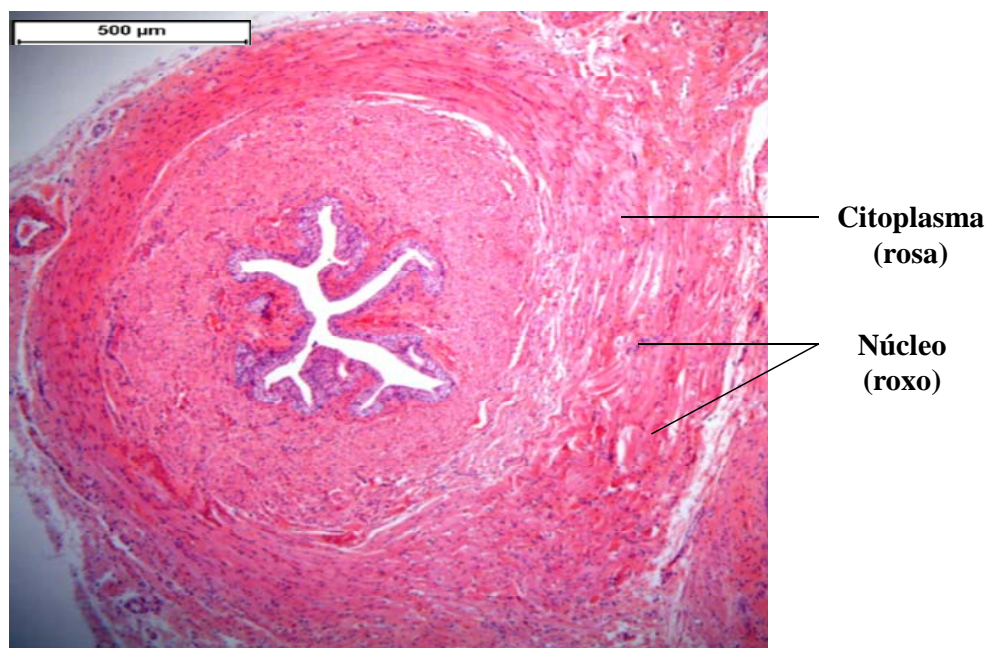


Figura 2. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com HE, evidenciando o citoplasma em rosa e o núcleo em roxo. Aumento de 4x.

Outros corantes são também utilizados em procedimentos de rotina em laboratórios, tais como:

- **Corantes tricrômicos (Tricrômico de Masson):** são utilizados para evidenciar determinadas estruturas celulares, como análise geral simultânea das fibras musculares lisas e estriadas (coradas em vermelho) e das fibras colágenas (coradas em azul).

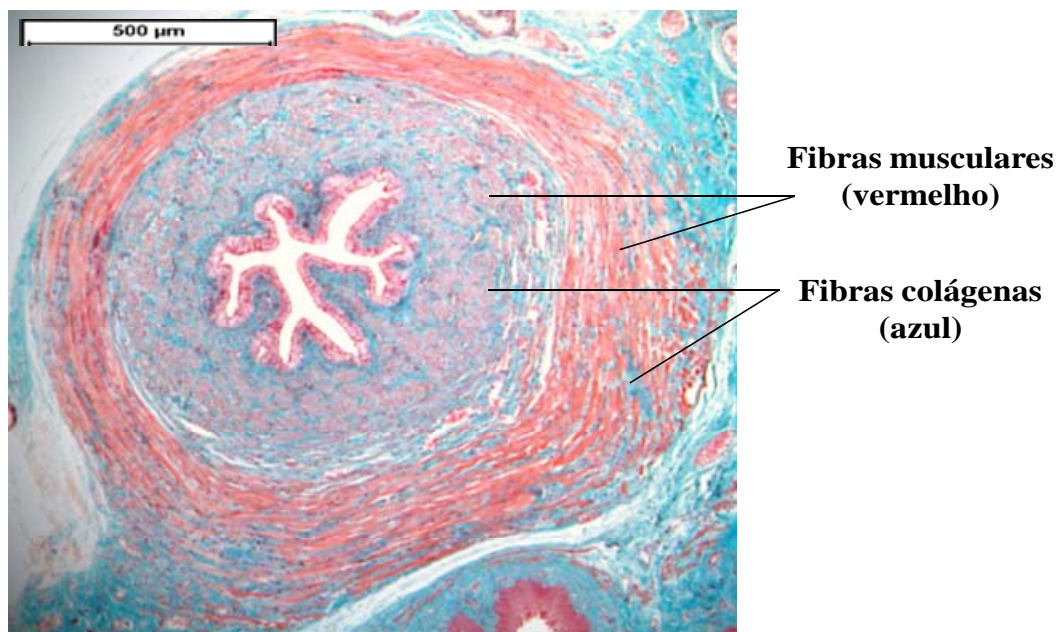


Figura 3. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com Tricômico de Masson, evidenciando as fibras musculares lisas e estriadas (em vermelho) e fibras colágenas (em azul). Aumento de 4x.

- **Picrosirius Red:** constitui uma solução saturada de ácido pícrico para análise das fibras de colágeno tipo I e tipo III simultaneamente.

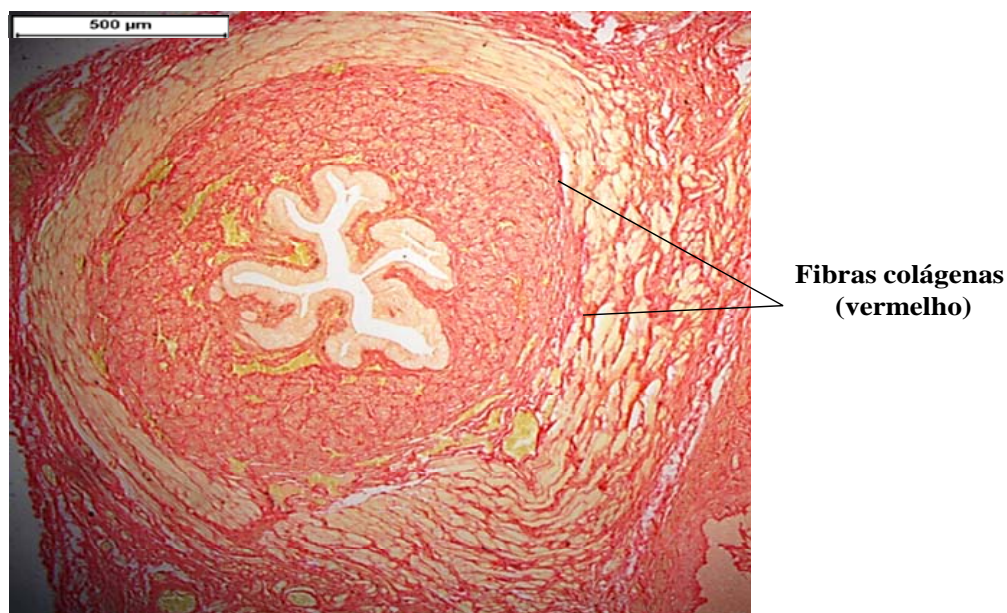


Figura 4. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com Picrosirius red, evidenciando as fibras de colágeno tipo I e III em vermelho. Aumento de 4x.

- **Reticulina de Gomori:** permite análise das fibras de colágeno tipo I (coradas em dourado) e tipo III (impregnadas pela prata e coradas em preto) separadamente.

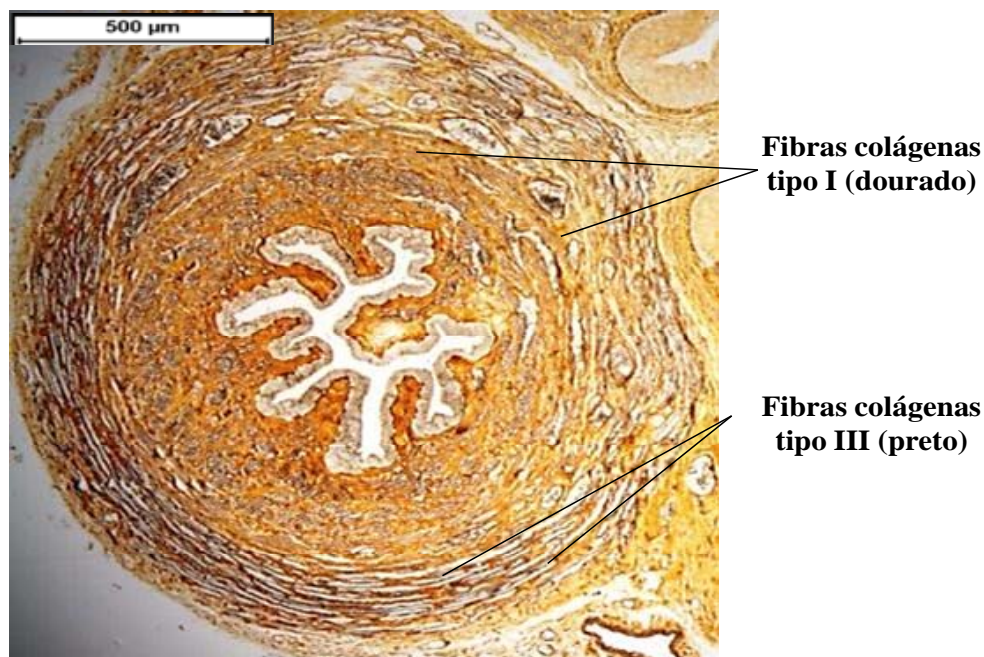


Figura 5. Micrografia do corte transversal da uretra de ratos corada com Reticulina de Gomori, evidenciando as fibras de colágeno tipo I (dourado) e III (preto). Aumento de 4x.

- **Ácido periódico de Schiff (PAS):** estruturas ricas em carboidratos assumem uma coloração magenta (violeta/avermelhada) após serem submetidas ao PAS.



Figura 6. Micrografia do corte transversal da uretra de ratos corada com PAS, evidenciando glicídios (em magenta). Aumento de 4x.

- **Azul de Toluidina:** Corante básico que cora substratos com grupamentos ácidos como carboxila e sulfato presentes nos polissacarídeos ácidos, ácido hialurônico e condroitino sulfato.

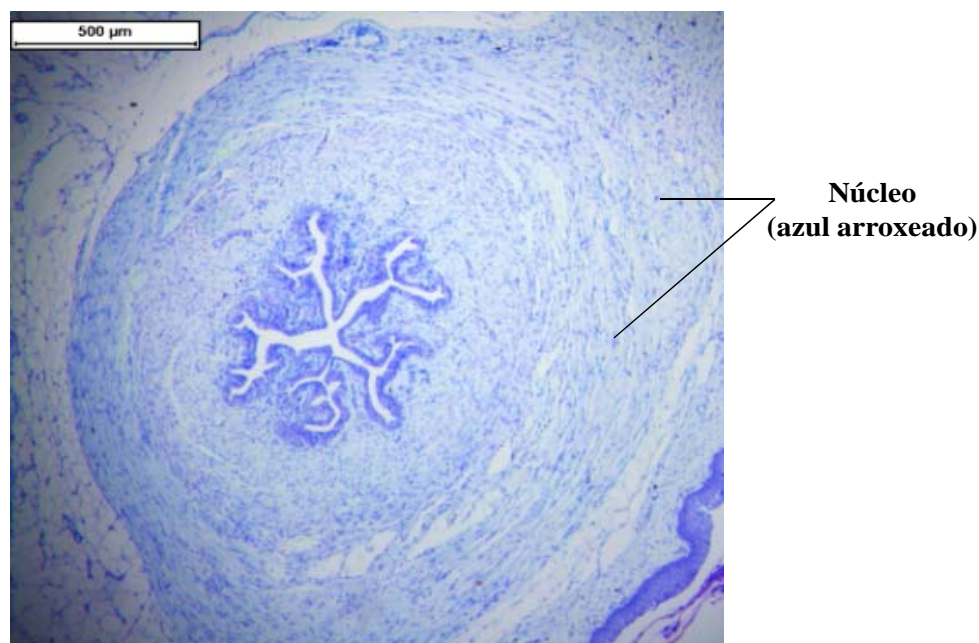


Figura 7. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com Azul de Toluidina, evidenciando os núcleos em azul arroxeado. Aumento de 4x.

Análise em microscópio fotônico convencional

Após a coloração, as lâminas são analisadas em microscópio fotônico comum (Figura 8). O microscópio fotônico comum, também designado por microscópio de câmara clara, é um sistema óptico capaz de fornecer, de um objeto, uma imagem ampliada, permitindo a observação de detalhes invisíveis a olho nu. É constituído basicamente por dois conjuntos de lentes: o conjunto objetiva e o conjunto ocular. A ampliação é uma das características ópticas essenciais da objetiva. A ocular, por sua vez, fornece uma imagem virtual mais afastada, mas que, através do cristalino se projeta na retina do globo ocular. Entre outras, destacam-se, nos microscópios, três características principais: a ampliação, a abertura numérica e o poder de resolução. A ampliação A do microscópio é determinada a partir das ampliações da objetiva e da ocular. Habitualmente, os microscópios são equipados com diversas objetivas montadas sobre um tambor rotativo (ou revolver), o que permite mudar comodamente de ampliação no curso do trabalho. Sendo que as oculares mais comuns possuem uma ampliação de 10x e a objetiva de maior ampliação, é de 100x. A ampliação máxima habitual do microscópio fotônico raramente ultrapassa o limiar útil de 1000x .



Figura 8. Microscópio Fotônico Convencional. (1) Lente ocular; (2) Revólver das objetivas; (3) Objetiva; (4) Parafuso macrométrico para focalização da imagem; (5) Parafuso micrométrico para focalização da imagem; (6) Mesa (onde a lâmina é colocada); (7) Fonte de luz; (8) Diafragma e condensador; (9) Sistema de parafusos para movimentação em dois eixos da mesa com a lâmina.

4.1.2) Microscopia Eletrônica de Transmissão

O desenvolvimento concomitante da microscopia eletrônica e da melhoria nas técnicas de preparação dos tecidos ampliaram consideravelmente o campo de estudo da histologia, pois o microscópio eletrônico é aproximadamente 1000 vezes mais poderoso que o microscópio óptico convencional. O alto poder de resolução do microscópio eletrônico de transmissão, juntamente com o grande aumento, permitem a obtenção de imagens com uma grande riqueza de detalhes.

Fixação do tecido

O tecido é fixado por perfusão e/ou imersão. No caso específico da uretra, esta deve ser removida isoladamente da parede vaginal (Figura 9-A) e em seguida deve ser fixada inicialmente em solução de Karnovsky. Após a fixação inicial, o tecido é dissecado e suas extremidades são reduzidas. Se necessário, utiliza-se reagente específico para intensificar a ultraestrutura a ser analisada de acordo com o objetivo do estudo.

Processamento

O fragmento geralmente é embebido em tetróxido de ósmio, depois passa por processos de lavagens, desidratação em concentrações crescentes de álcool e imerso em resina (Figura 9-B), onde permanece até a polimerização. O excesso de resina polimerizada é retirado para expor o material de estudo (Figura 9-C) e permitir o seu fatiamento no ultramicrotomo (Figura 9-D).

Ultramicrotomia e montagem das telas

Ultramicrotomia é um método para o corte de espécimes em fatias ou seções extremamente finas, que podem ser vistas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET). As seções devem ser finas porque os elétrons de 50 a 125kV dos microscópios eletrônicos padrão não podem passar através de material biológico mais espesso que 150 nm. Para melhores resoluções, as seções devem ser de 30 a 60nm. O equipamento que realiza a ultramicrotomia é chamado de ultramicrotomo, sendo que a própria operação de corte é supervisionada e controlada utilizando-se um microscópio ótico incorporado ao aparelho.

Existem muitos equipamentos envolvidos no processo de ultramicrotomia. Seções ditas "finas", ou seja, seções de 50 a 100 nm de espessura podem ser visualizadas no MET. Uma pequena amostra é retirada do espécime a ser investigado. Uma área é escolhida para ser seccionada para o MET e a face do bloco é re-aparada a um tamanho não maior que 0,7 mm em um lado. As fases do bloco normalmente tem uma forma de quadrado, retângulo, trapézio ou triângulo. Finalmente, cortes finos são cortados com uma lâmina de corte, no ramo chamado de "faca" de vidro ou diamante usando um ultramicrotomo e as seções ficam flutuando na água que é realizada em uma cuba ou calha no equipamento. As seções são então recuperadas da superfície da água e montadas sobre uma tela (Figura 9-E) ou grade de cobre, níquel, ouro ou outro metal e são contracoradas geralmente com uranila e chumbo.

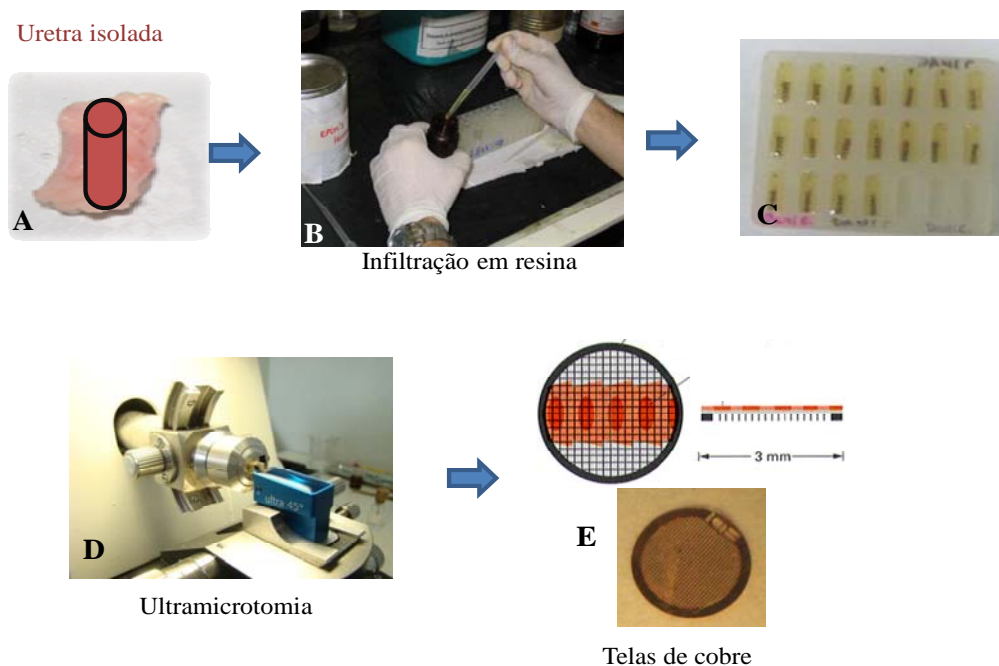


Figura 9. Fases do processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão.

Análise em microscópio eletrônico de transmissão

As imagens no microscópio eletrônico de transmissão (Figuras 10 e 11) são formadas pela excitação de uma tela fluorescente ou um filme fotográfico por elétrons. Esses elétrons são produzidos graças ao aquecimento de um filamento no vácuo. Essas partículas são aceleradas devido a uma diferença de potencial de 60 a 100 Kv existentes entre o cátodo e o ânodo. Esse feixe é defletido por lentes eletromagnéticas, de maneira parecida ao que acontece com a luz no microscópio óptico. O condensador focaliza o feixe de elétrons no plano do objeto, e a objetiva forma sua imagem. Esta imagem é ainda ampliada por uma ou duas lentes que a projetam numa tela fluorescente ou filme fotográfico.

Simplificadamente, o funcionamento do microscópio eletrônico de transmissão se baseia na propriedade que as estruturas têm de desviar ou deixar passar por si os elétrons. As estruturas que desviam os elétrons são chamadas de elétrons densas e aparecem escuras na imagem, já que os elétrons não chegam até a tela fluorescente. Já as estruturas que são atravessadas pelos elétrons (elétrons lúcidas) aparecem claras na imagem, pois os elétrons que incidiram sobre a estrutura conseguem excitar a tela fluorescente ou o filme fotográfico que fica abaixo do corte.

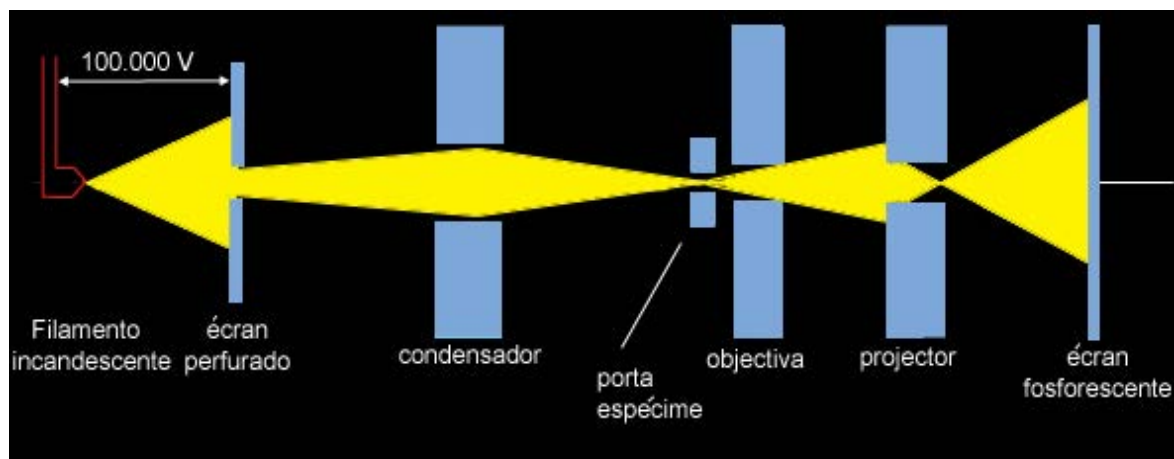


Figura 10. Trajeto dos elétrons (em amarelo) no microscópio eletrônico de transmissão.



Figura 11. Microscópio Eletrônico de Transmissão.

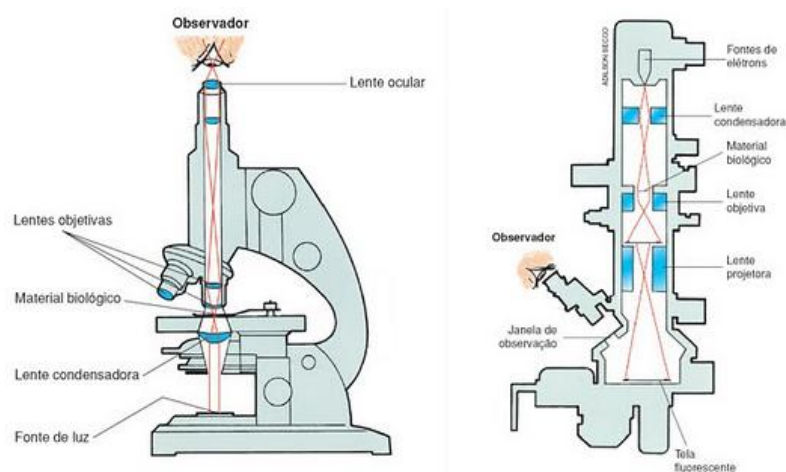


Figura 12. Comparação entre microscópio fotônico convencional e microscópio eletrônico de transmissão.

5) Imunoistoquímica

Nesta técnica um anticorpo é usado para detectar especificamente um antígeno celular através de coloração específica o qual pode ser prontamente visualizado em microscópio. O material pode ser fixado e incluído em parafina de forma similar à microscopia fotônica convencional ou pode ser congelado em nitrogênio líquido (Figura 13-A) e armazenado em freezer a -80°C (Figura 13-B) para posterior obtenção dos cortes histológicos em criostato (Figura 13-C). Neste caso, as lâminas (Figura 13-D) preferencialmente devem ser alocadas em laminário com sílica gel (Figura 13-E) e posteriormente envolvidos em parafilm (Figura 13-F) para evitar hidratação dos cortes.

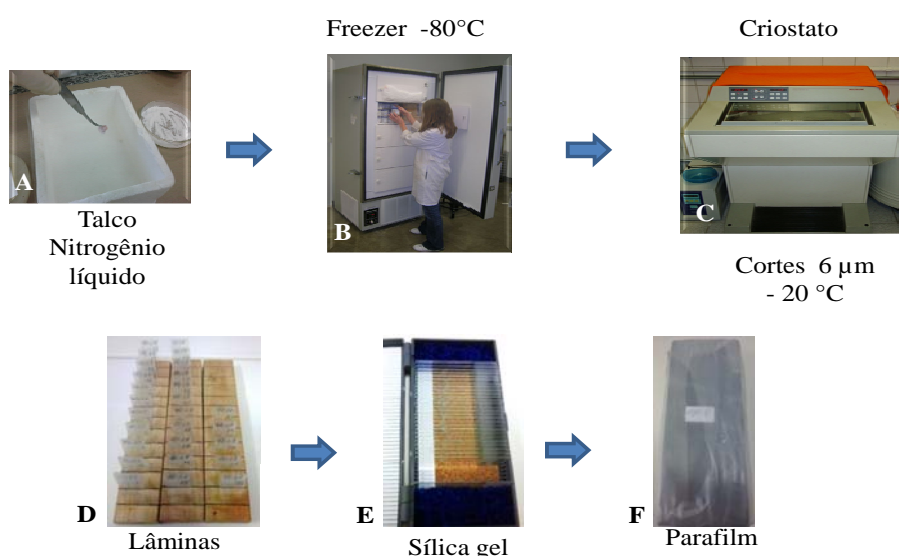


Figura 13. Fases do processamento do material para imunoistoquímica de fibras rápidas e lentas.

5.1) Protocolo específico para imunomarcação de fibras musculares lentas e rápidas

As lâminas obtidas são submetidas ao método de imunoperoxidase StreptABCComplex/HRP através da utilização de anticorpos comerciais primários específicos para cada proteína do estudo, como descrito a seguir:

Anticorpo monoclonal	Clone	Empresa	Diluição
Anti-miosina rápida	WB-MYHCf	Novocastra	1:160
Anti-miosina lenta	WB-MYHCs	Novocastra	1:120

Os cortes são fixados com acetona gelada, lavados e ocorreu o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em metanol. Os cortes são lavados novamente e é feito o bloqueio de interações proteína-proteína não específicos por solução de albumina bovina a 3% em PBS por 1 hora a 37°C; as lâminas então são incubadas com anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em solução de albumina bovina a 1% e ázida sódica a 0,1% em PBS, em câmara úmida: 1 hora a 37°C e 18 horas (overnight) a 4 °C. Após lavagens com tampão PBS, ocorreu incubação com anticorpo secundário (específico para a espécie animal em que será produzido o anticorpo primário), em câmara úmida 30 minutos a 37°C. Na reação com Complexo Avidina-biotina-peroxidase (ABS), o anticorpo secundário é biotinilado. A revelação é com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, USA) 0,6%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetilsulfóxido a 1% em PBS, em banho de 5 minutos em câmara escura e a 37°C. Os cortes são contra-colorados com Hematoxilina de Harris, lavados, desidratados e montados em Entellan (Merck) com lamínulas.

6) Morfologia da Uretra

6.1) Anatomia da uretra de ratas

A uretra feminina localiza-se imediatamente ventral à vagina e abre-se independente desta. Possui aproximadamente 10mm de comprimento (Figura 14). O óstio uretral externo localiza-se dorsalmente ao clitóris em uma protusão na forma de cone sob a pele, que também recebe as aberturas das glândulas clitoriais.



Figura 14. Representação do comprimento da uretra de rata.

Com a rata em decúbito dorsal, através de incisão em “Y” invertido, iniciando-se no 1/3 caudal da linha mediana do abdome e, na altura da sínfise púbica, bifurcando-se para a face interna das coxas é possível observar as estruturas que compõe o trato genito-urinário. A uretra atravessa quase adjacente a sínfise púbica e é separada por uma pequena quantidade de tecido adiposo. A seguir, a pele dos animais é rebatida para expor a porção caudal da parede ventro-anterior do abdome, da região inguinal, das faces internas e posteriores das coxas e da genitália externa para remoção do tecido conjuntivo fibroadiposo da região ventral abdominal, inguinal e perigenital até a face posterior das coxas. É feita a dissecação fina da uretra (ventral) e da vagina (dorsal) em conjunto com a remoção do tecido conjuntivo e exposição da túnica muscular superficial desses órgãos e remoção do óstio vaginal. A uretra e a vagina são retiradas em monobloco por meio de secção na porção mais cranial possível junto à sínfise púbica (Figura 15).

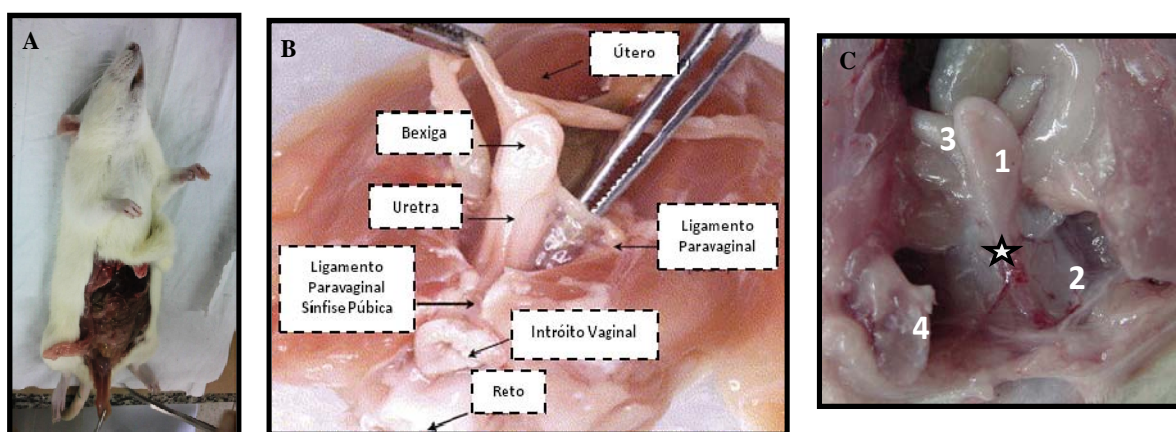


Figura 15. Anatomia da pelve feminina de rata. A e B- Retirada do conjunto uretra-vagina. C- Bexiga (1), Vagina (2), Cornos uterinos (3), Sínfise púbica (4), Uretra (♠).

6.2) Estrutura da uretra

Através de cortes transversais corados com Hematoxilina-eosina (HE) é possível observar a morfologia geral da uretra normal (Figura 16).

A uretra apresenta luz irregular parcialmente colabada, constituída de várias pregas de mucosa formada por epitélio estratificado pavimentoso e lâmina própria/submucosa de tecido conjuntivo frouxo. Duas camadas de músculo liso envolvem as túnicas mucosa e submucosa sendo uma com orientação longitudinal (interna) e outra circular (externa). Em vários pontos um entrelaçamento destas camadas é observado. Mais externamente uma camada de fibras musculares estriadas orientada circularmente circunscribe a uretra ao longo de toda sua extensão. Essa camada denomina-se músculo uretral externo. Entre as camadas de músculo liso e estriado está presente um plexo vascular.

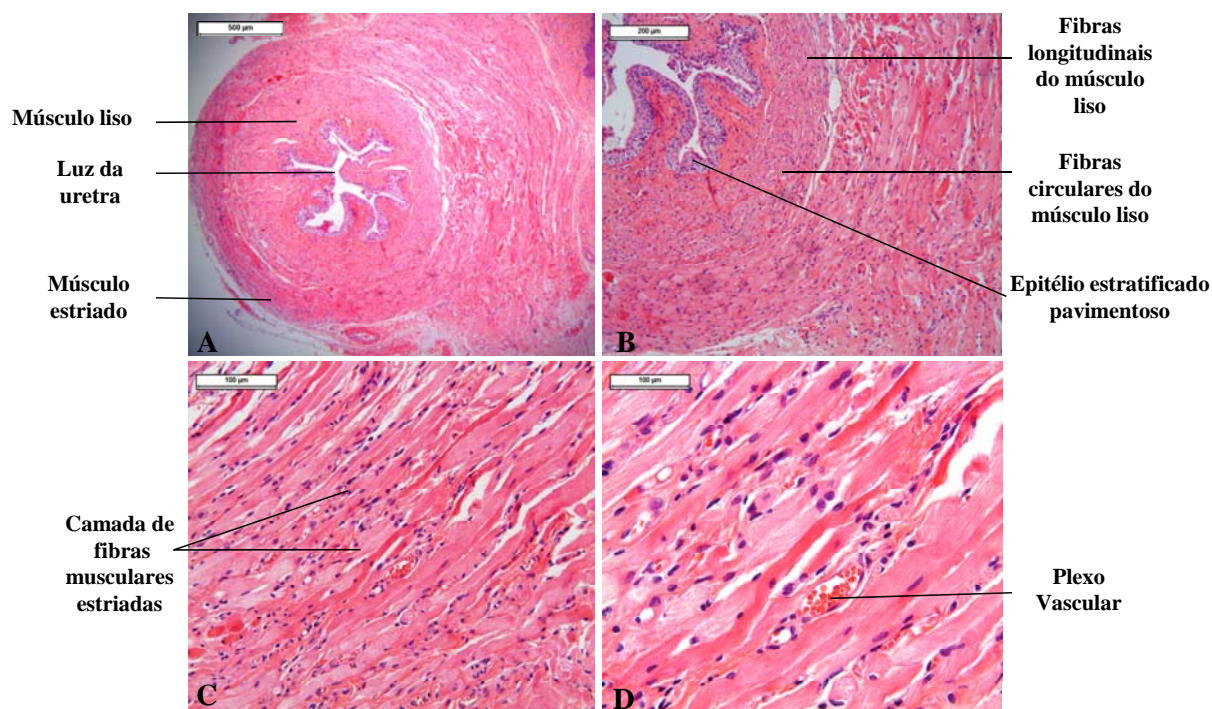


Figura 16. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada em HE. (A) Aumento de 4x, (B) Aumento de 10x, (C) Aumento de 20x e (D) Aumento de 40x.

A coloração de Tricômico de Masson mostra simultaneamente as fibras musculares lisas e estriadas (em vermelho) e fibras de colágeno (em azul) uretral (Figura 17).

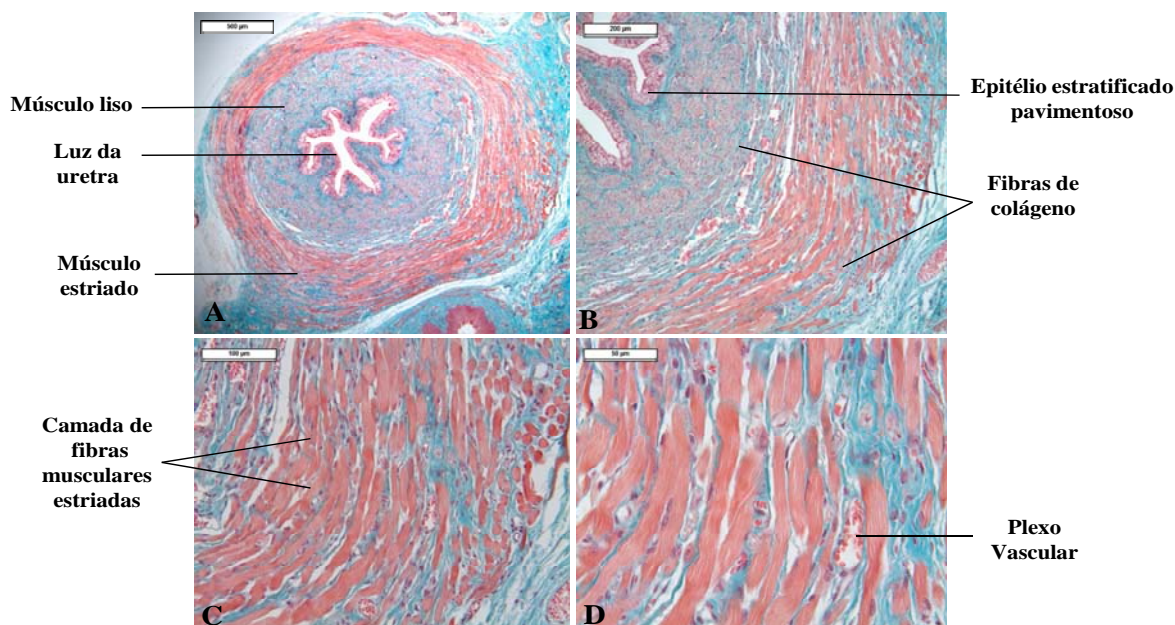


Figura 17. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com Tricômico de Masson. (A) Aumento de 4x, (B) Aumento de 10x, (C) Aumento de 20x e (D) Aumento de 40x.

Através da coloração de Picrosirius red (Figura 18) obtém-se a confirmação da quantidade de colágeno presente entre as fibras musculares da uretra, sejam elas lisas ou estriadas. Essa coloração juntamente com a Reticulina de Gomori (Figura 19) confirmam a presença de colágeno e torna possível identificá-los em tipo I e III.

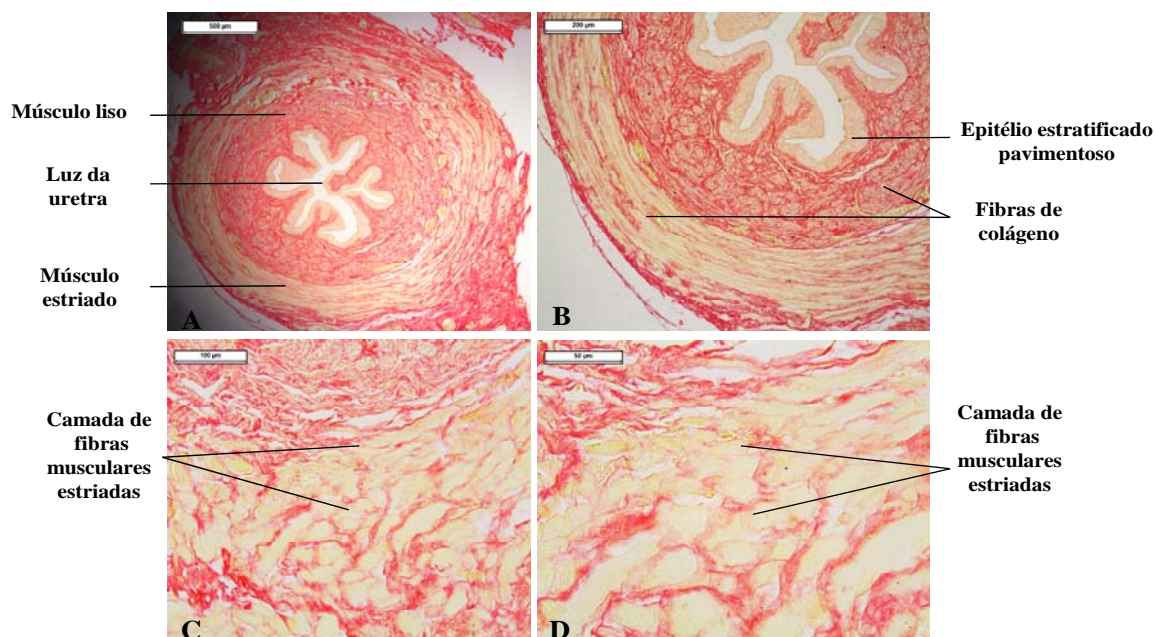


Figura 18. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com Picrosíríus red. (A) Aumento de 4x, (B) Aumento de 10x, (C) Aumento de 20x e (D) Aumento de 40x.

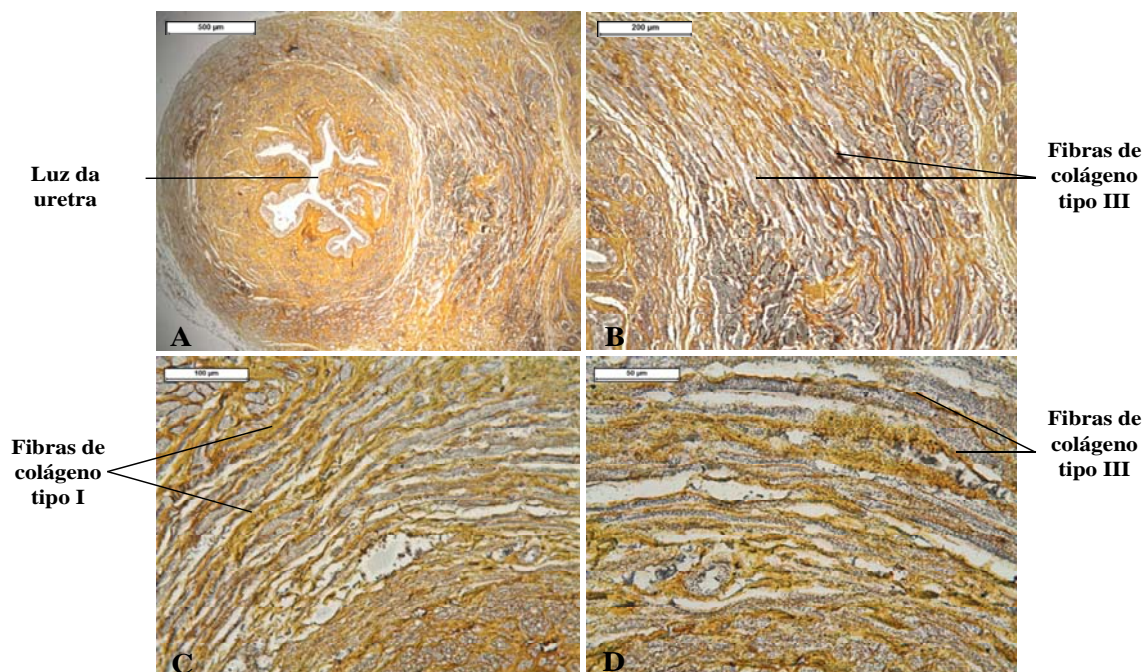


Figura 19. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com Reticulina de Gomori. (A) Aumento de 4x, (B) Aumento de 10x, (C) Aumento de 20x e (D) Aumento de 40x.

A análise dos açúcares neutros presentes nas glicoprotéínas das membranas basais das fibras musculares da uretra pode ser observado através da coloração de PAS, que ainda permite destacar o endomísio das fibras musculares (Figura 20).

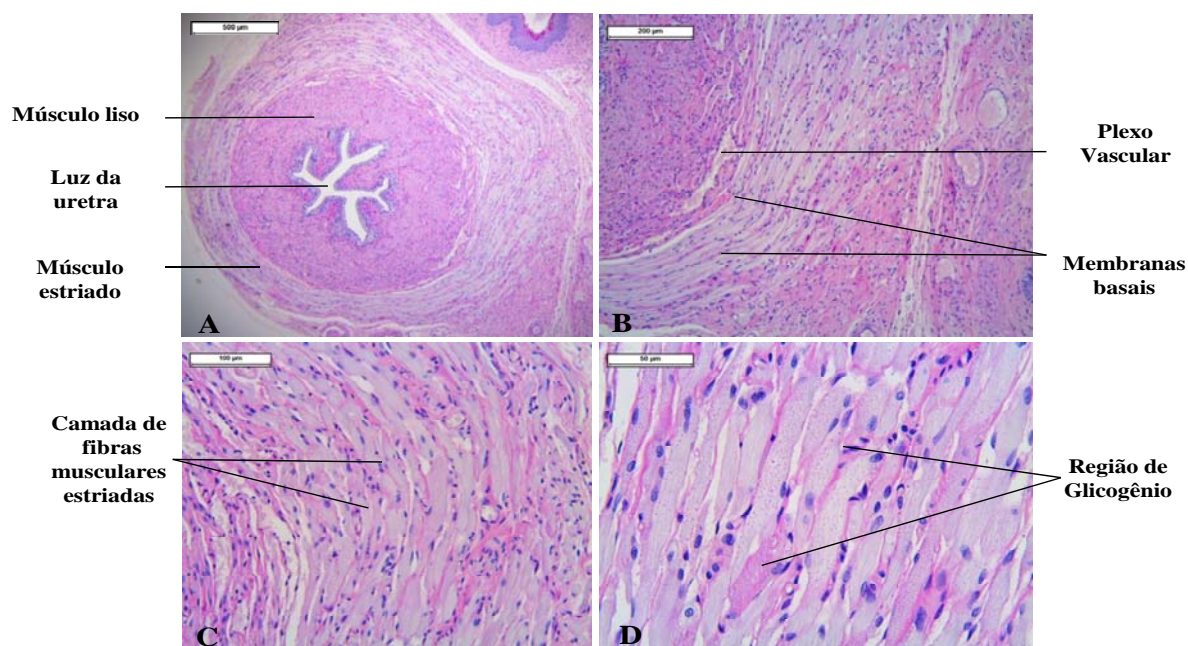


Figura 20. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com PAS. (A) Aumento de 4x, (B) Aumento de 10x, (C) Aumento de 20x e (D) Aumento de 40x.

A coloração de azul de toluidina evidencia a presença de glicosaminoglicanos sulfatados e carboxilados, e no caso da figura abaixo, evidencia-se discreta quantidade desses polissacarídeos na membrana basal das fibras musculares uretrais (Figura 21).

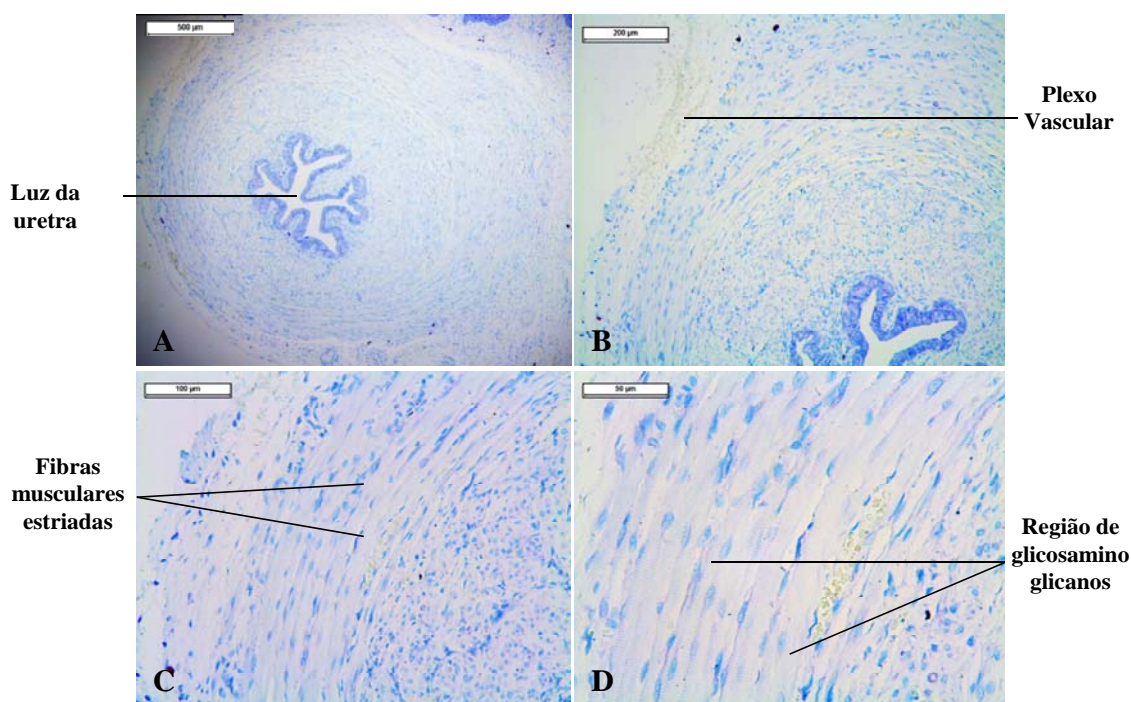


Figura 21. Micrografia do corte transversal da uretra de ratas corada com Azul de Toluidina. (A) Aumento de 4x, (B) Aumento de 10x, (C) Aumento de 20x e (D) Aumento de 40x.

6.3) Ultraestrutura da uretra:

A análise ultraestrutural do músculo estriado uretral através da microscopia eletrônica de transmissão revela miofibrilas bem organizadas formando sarcômeros íntegros com características morfológicas relacionadas aos diferentes tipos musculares. Mitocôndrias intermiofibrilares e raras gotículas de lipídeos são observadas. Não é detectado aumento do conjuntivo intersticial e há pouco colágeno entre as miofibrilas. São observados grânulos de glicogênio dispersos, subsarcolemas e intermiofibrilares (Figura 22).

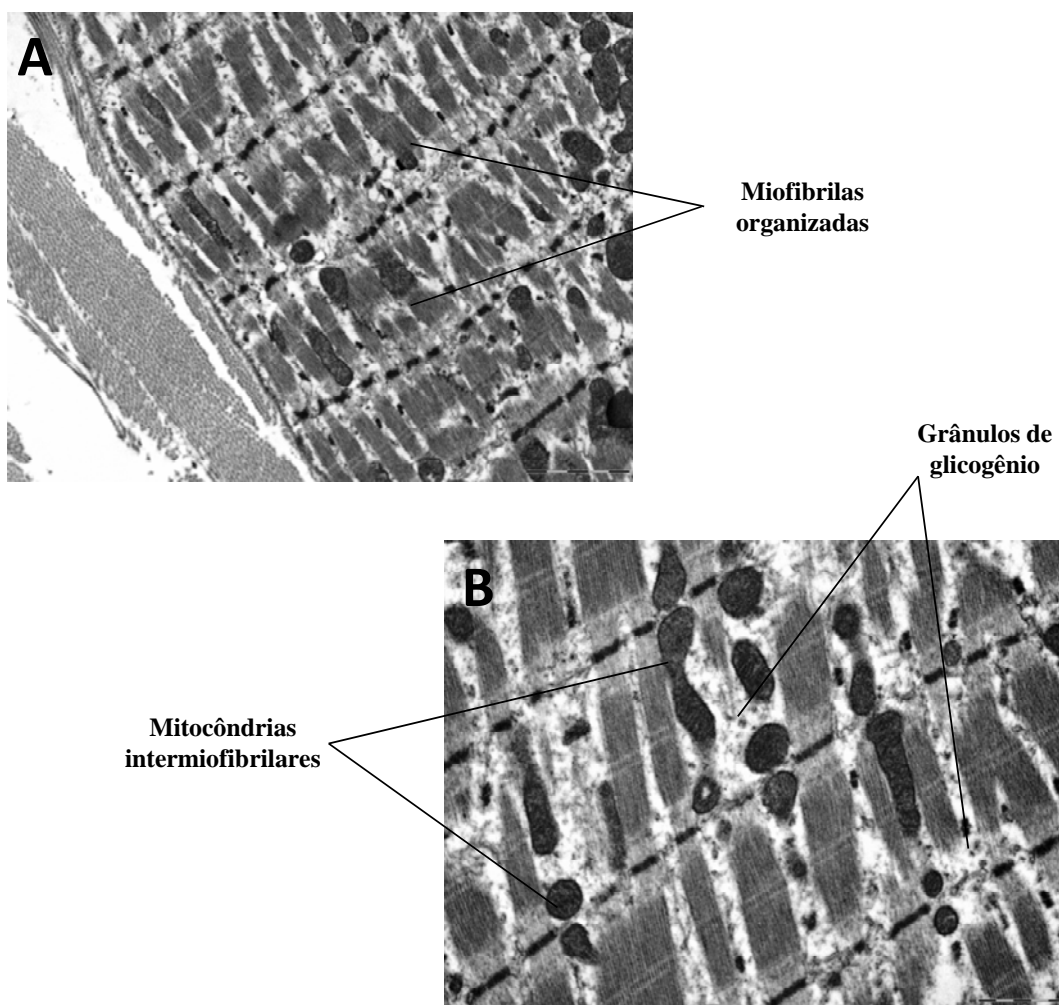


Figura 22. Micrografia eletrônica do músculo estriado uretral de ratas (A -B).

6.4) Imunoistoquímica - anticorpos para miosina rápida e lenta:

As reações de imunistoquímica revelam que as miofibrilas do músculo estriado expressam predominantemente as cadeias de miosina pesada rápida. As camadas de fibras rápidas estão presentes em uma camada externa espessa, em toda a circunferência. As fibras lentas apresentam-se em uma camada interna delgada, com fibras individuais pequenas e finas (Figura 23).

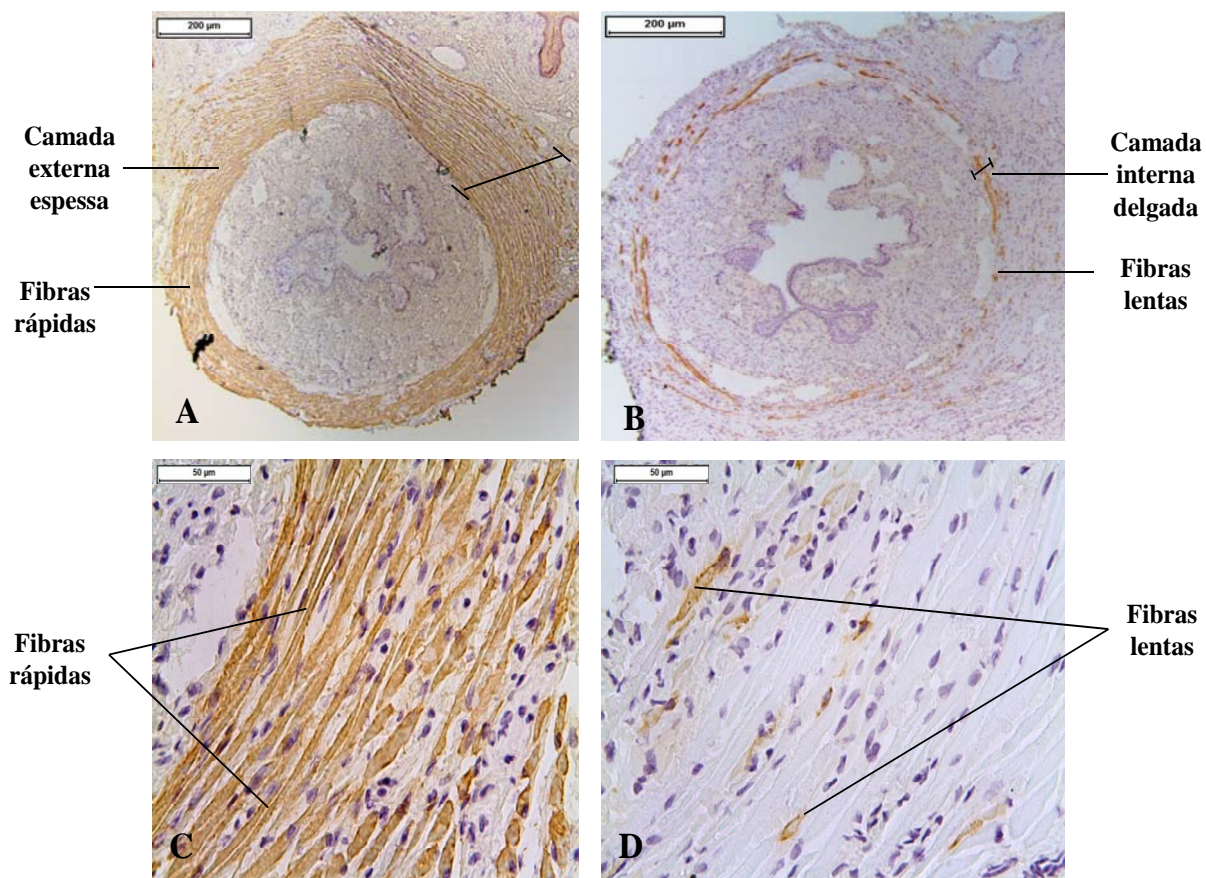


Figura 23. Micrografias do corte transversal da uretra de ratas após imunohistoquímica para fibras rápidas (A-C) e lentas (B-D), nos aumentos de 4x (A-B) e 40x (C-D).

7) Referências

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

JUNQUEIRA, Luis Carlos U.; JUNQUEIRA, Luiza Maria M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983.

STEVENS, Alan; LOWE, James. Histologia. São Paulo: Manole, 1995.

BOZZOLA, John J.; RUSSELL, Lonnie D. Electron Microscopy, Second Edition. Jones and Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA, 1999, 670 pgs. ISBN 0-7637-0192-0 capítulo 4.

ATTIAS, Márcia. Microscopia Eletrônica em Biologia. Instituto de Biofísica UFRJ - www.cbpf.br

RODRIGUES et al. Desenvolvimento de Nanocompósitos Polipropileno/Argila Bentonita Brasileira: I Tratamento da Argila e Influência de Compatibilizantes Polares nas Propriedades Mecânicas; Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 17, nº 3, p. 219-227, 2007.

Links:

http://www.pathology.com.br/instrutoria/introducao%20microscopia/introducao_microscopia.html

<http://www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/mftecnicas.htm>

<http://www.neurofisiologia.unifesp.br/eletronica.htm>

http://estudodavida.no.comunidades.net/index.php?pagina=1205862713_01


<http://www.icb.usp.br/mol/1basico.html>

www.sciencedirect.com





Anexos

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JOSÉ CARLOS DE OLIVEIRA"
RUA DO MATÃO, 300 - JARDIM BOTÂNICO
13061-970 - BOTUCATU - SP






Comissão de Ética em Experimentação Animal



Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99

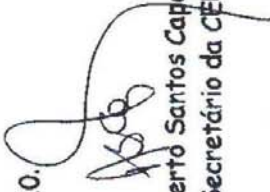
Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 846-2010) "Efeito do diabetes moderado na matriz extracelular e no músculo estriado uretral em ratas prenhes", a ser conduzido por **Fernanda Piculo**, orientada pela Prof^a. Titular **Marilza Vieira Cunha Rudge**, Co-orientada pela Prof^a. Dr^a. **Débora Cristina Damasceno**, com a colaboração de **Angélica Mércia Pascon Barbosa**, **Gabriela Marini**, **Selma Maria Michelin Mathews** e **Sérgio Luis Felisbino**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratas" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Profª Drª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 30/09/2010.



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Comissão de Ética em Exp. Animal

Fls. nº 29

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 16.018-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

ANEXO – Ofício do envio para publicação do Capítulo 1



**Article title: PESQUISA TRANSLACIONAL EM *DIABETES MELLITUS*
GESTACIONAL E HIPERGLICEMIA GESTACIONAL LEVE:
CONHECIMENTO ATUAL E NOSSA EXPERIÊNCIA**

ID : ABME 2607

Authors : Marilza Vieira Cunha Rudge, Fernanda Piculo, Gabriela Marini, Débora C Damasceno, Iracema Mattos Paranhos Calderon, Angélica Mércia Pascon Barbosa

Journal : Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

Dear Fernanda Piculo:

Thank you for submitting the manuscript: "ABEM-2607 - TRANSLATIONAL RESEARCH IN GESTATIONAL DIABETES MELLITUS AND MILD GESTATIONAL HYPERGLYCEMIA: CURRENT KNOWLEDGE AND OUR EXPERIENCE" to Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Please do not hesitate to contact me if you have any questions. Thank you for considering this Journal as a venue for your work.

Sincerely,

ABE&M - editores

Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia

Editorial Staff ABE&M

abem-editorial@endocrino.org.br

www.abem-sbem.org.br

Quarta-feira, 16 de Janeiro de 2013