



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Efeitos do diabetes gestacional moderado e da reposição com insulina na lactação sobre a próstata ventral do rato Wistar.

Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada Área de concentração Biologia estrutural e funcional.

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Botucatu – SP

2014

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – UNESP
Distrito de Rubião Júnior s/n. Cx. Postal. 510. CEP: 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil
Fone/Fax. +55 (14) 3811-6148 – posgraduacao@ibb.unesp.br / [HTTP://www.ibb.unesp.br](http://www.ibb.unesp.br)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos do diabetes gestacional moderado e da reposição com insulina na lactação sobre a próstata ventral do rato Wistar.

Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Orientador Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada Área de concentração Biologia estrutural e funcional.

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Botucatu – SP

2014

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada – UNESP
Distrito de Rubião Júnior s/n. Cx. Postal. 510. CEP: 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil
Fone/Fax. +55 (14) 3811-6148 – posgraduacao@ibb.unesp.br / [HTTP://www.ibb.unesp.br](http://www.ibb.unesp.br)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Santos, Sérgio Alexandre Alcantara dos.

Efeitos do diabetes gestacional moderado e da reposição com insulina na lactação sobre a próstata ventral do rato Wistar / Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Luis Antonio Justulin Junior

Capes: 20603002

1. Diabetes na gravidez - Tratamento. 2. Insulina. 3. Próstata. 4. Apoptose. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Diabetes gestacional moderado; Insulina; Próstata.

Botucatu, 27 de fevereiro de 2014.

Santos, Sérgio Alexandre Alcantara dos
Efeitos do diabetes gestacional moderado e da reposição com insulina na
lactação sobre a próstata ventral do rato Wistar.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior
(orientador – UNESP/Botucatu - SP)

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
(UNESP/São José do Rio Preto - SP)

Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa
(UNESP/Botucatu - SP)

Prof.^a Dr.^a Elaine Manoela Porto Amorim
(UNIOESTE / Paraná - PR)

Prof.^a Dr.^a Raquel Fantin Domeniconi
(UNESP/Botucatu - SP)

Dedicatória

*À minha querida família,
Que sempre me apoiou e confiou em mim,
um grande abraço a todos vocês!
Véinho, Véinha,
Ameba, Foquinha,
Vó Durva, Peteka,
Leitão, Nequinho e Princesa.*

*“Família é quem você escolhe pra viver
Família é quem você escolhe pra você
Não precisa ter conta sanguínea
É preciso ter sempre um pouco mais de sintonia”
O Rappa.*

Agradecimento Especial

Aos meus pais Leontil e Alcina,

Que são meu alicerce, muito obrigado pela boa educação e muito amor que sempre me deram.

A minhas queridas irmãs Fernanda e Aline,

Por toda ajuda e carinho todos estes anos, muito obrigado.

A minha querida companheira Thaís,

Thaís, agradeço por ter aceitado seguir esta jornada ao meu lado, sou muito grato pela sua companhia diária que tanto me ajuda a enfrentar as dificuldades, obrigado pelos momentos maravilhosos que passamos nestes últimos 5 anos, te amo.

Aos meus dois orientadores Dr. Sérgio Luís Felisbino e Dr. Luís Antonio Justulin Junior,

Sérgio, muito obrigado por todo o ensinamento, e por me acolher tão bem, desde o meu primeiro ano em Botucatu.

Justo, muito obrigado pela amizade, pela grande ajuda neste projeto, e por ter feito esta dissertação tão boa quanto ela poderia ser, grande abraço companheiro!

Vocês são meu grande espelho.

Agradecimentos

Ao laboratório de matriz extracelular,

Caros amigos, Amanda, Ana Carolina, Jaqueline, Carina, Andrei, Flávia, Bruno, Helga, Brenda, Caroline, Marcel, Gabriel, Greyce, Flávia Dellêla, Justulin Marcela, Heloisa, Bruna, Gabriela e Ketlin agradeço a todos vocês por toda a ajuda durante esta etapa, vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, obrigado pela companhia, pelos cafés, e todas as conversas que tivemos nestes últimos dois anos.

As minhas duas estagiárias preferidas Amanda e Ana Carolina, muito obrigado por ajudar a desenvolver este trabalho, sem vocês ele não estaria pronto, espero ter a oportunidade de trabalhar por muito tempo ao lado de vocês.

Aos meus irmãos da República tipo-rei , onde vivi por três anos incríveis, um forte abraço a todos vocês! Agradecimento especial a Dona Dalva, que cuidava de todos nós.

Aos meus grandes amigos André “rapidão”, Rodolfo “rapa-nada” e Moises “bife” pelas parcerias desde o início da faculdade.

As amigas Geórgia “tipiti” e Marcela “mirregaço” por todas as aventuras vividas na graduação.

A minha querida nutricionista Mariana Tablas (Albertina) muito obrigado por me ajudar a enfrentar este mostro que é o “regime” hoje sou uma pessoa muito mais saudável.

Aos alunos do 43º curso de biociências da Unesp de Botucatu, obrigado pelas discussões e grandes círculos temáticos que me tornaram um profissional melhor.

A Sílvia Canova Felisbino, por me “adotar” no início da faculdade e por sempre me receber tão bem na sua casa.

Ao meu sogrão Sérgio Bovi e minha sogra Cleide, meus cunhados Fernando, Gabriela e Juninho, meus sobrinhos Murilo e Davi por toda a ajuda e pelos momentos bons vividos.

Ao meu cunhado Manel, por ser um ótimo exemplo de como eu deveria estudar! Obrigado por todas a ajuda.

Ao meu Amigo Samuel Thomaz (roska), obrigado pela amizade e por todas as ajudas possíveis e imagináveis que já te pedi.

Aos colegas do Departamento de Morfologia, IB, Unesp de Botucatu: Bruno (pira) , Luana, Rodrigo (aero), Ivan, Warley (fanfas), Fernanda Piculo, Gabriela, Edson, Juarez, Léo, Tatá, Nelci, Marcos (Spike), Bruna, Joyce, Mariana, Mariana (tina) Lucas (Sopetão), Ariane(sponja), Leonarndo, André (dói), Livia (pejo), Adalto, Diego, Bruno, Júlio, Bianca Juliana, Jason, Marília, Josi, Patrícia, Gabriel, Raquel, Marci, André (quali), Rondi, obrigado pela ajuda e pelos momentos de descontração nos nossos almoços coletivos.

À professora Maria Terezinha Serrão Peraçoli docente do departamento de imunologia e suas alunas Mariana Matias e Mariana Romao, pela ajuda com a técnica de Elisa, e por serem tão atenciosas comigo, muito obrigado.

Aos professores que aceitaram o convite para constituírem a banca examinadora desta dissertação. Obrigada por contribuírem com a minha formação!

Aos professores Dra. Raquel Fantin Domeniconi, Dr. Luis Gustavo Chuffa, e Dra. Arielle Arena, pela participação na fase da minha qualificação e pelas contribuições científicas.

A coordenadoria e professores do programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada pela excelência na formação de seus alunos.

Aos secretários da seção de pós-graduação pela paciência, competência e profissionalismo nos processos burocráticos para a execução desta dissertação.

Aos professores do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu pelo acolhimento, conhecimento compartilhado e pela oportunidade que me concederam de atuar em aulas na graduação através do estágio docência.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia, IB, UNESP de Botucatu pela colaboração e pela agradável convivência. Especialmente aos técnicos José Eduardo, Ricardo, Vivian (Kuma) e Keila. À secretária Luciana e também a Dona Iolanda e Terezinha (Dona Tera)

A todos os meus amigos de São José do Rio Preto, em especial ao Adriano (norma), Kelvin, Willian, Thiago, Matheus (careca), Amanda, Robson (pardal), Verônica, João e Hugo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (2011/16522-0) e também agradeço por ter financiado o meu projeto através do auxílio pesquisa (2012/18100-9).

Aos animais experimentais, os quais tratamos com todo o respeito e consideração.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Lista de Abreviaturas e Siglas

(Abreviações que aparecem no texto em português e em inglês que contem o mesmo significado estão apresentadas em conjunto)

ADA: American diabetes association

AR – receptor de andrógeno.

CaP – câncer de próstata.

CK – citoqueratina.

DAG ou AGD – distância ano-genital.

DG ou GD – dia gestacional.

DHT – diidrotestosterona.

DM: Diabetes *mellitus*

DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

DMG: Diabetes *mellitus* Gestacional

DOHaD – Developmental Origin of Health and Disease.

DPN ou PND – dia pós-natal.

IFD: International Diabetes Federation

IR: Receptor de insulina

MEC – matriz extracelular.

PA ou AP – lobo prostático anterior.

PBS – tampão fosfato-salina.

PCNA – antígeno nuclear de células proliferativas.

PD ou DP – lobo prostático dorsal.

PDL ou DLP – lobo prostático dorsolateral.

PL ou LP – lobo prostático lateral.

PSA – antígeno prostático específico.

T – testosterona.

VS ou SV – vesícula seminal.

Sumário

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 PROGRAMAÇÃO FETAL.....	14
1.2 DIABETES.....	14
1.2.1. DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1.....	16
1.2.2. DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2	16
1.2.3. DIABETES <i>MELLITUS</i> GESTACIONAL.....	17
1.3. DIABETES <i>MELLITUS</i> E SISTEMA GENITAL MASCULINO.....	19
1.4. GLÂNDULA PROSTÁTICA E O DIABETES <i>MELLITUS</i>	20
1.4.1. ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DA PRÓSTATA.....	20
1.4.2. CARACTERÍSTICAS DO DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA.....	24
1.4.3. EFEITOS DO DIABETES <i>MELLITUS</i> NA GLÂNDULA PROSTÁTICA....	29
1.5. INSULINA EXÓGENA E PRÓSTATA.....	30
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA PROPOSTO.....	31
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Capítulo I: Mild gestational diabetes impairs ventral prostate maturation and decrease secretory function in wistar rat.....	32
5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	74
6. CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	84

Resumo

Santos, SAA. **Efeitos do diabetes gestacional moderado e da reposição com insulina na lactação sobre a próstata ventral do rato Wistar.** [Dissertação]. Botucatu, São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2014.

Diabetes mellitus (DM) é uma síndrome clínica heterogênea, causada pela falta de produção de insulina pelas células beta pancreáticas ou pelo defeito nos receptores para insulina nas células alvo, resultando em doença metabólica hiperglicêmica. Diabetes quando associado à gravidez causa complicações maternas e fetais, hiperglicemia materna estimula o crescimento, devido à maior disponibilidade de glicose no fluxo sanguíneo e pela regulação de fatores de crescimento. O alto peso no nascimento está relacionado com o risco de desenvolver resistência a insulina, obesidade e DM tipo 2 na idade adulta. Apesar dos muitos estudos sobre os efeitos do diabetes nas funções testiculares e fertilidade masculina, o impacto do diabetes gestacional sobre a morfogênese e crescimento da próstata da prole masculina ainda é limitado. Desta forma, este projeto objetivou avaliar os possíveis efeitos do diabetes gestacional no processo de crescimento e maturação prostática. Foram investigados os processos de proliferação e morte celular por apoptose, expressão do receptor de andrógino (AR) e da proteína de secreção prostateína no lobo ventral da próstata de ratos, filhos de mãe com diabetes moderado induzido em período gestacional. Foram realizadas análises citoquímicas, morfométricas, imunohistoquímicas e de western blotting nos animais sacrificados aos 60 e 120 dias de idade. A testosterona e a insulina séricas não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais. O peso relativo da próstata ventral (PV) no grupo onde as mães receberam insulina durante a lactação (DGI) no dia pós-natal 120 (DPN120) foi significativamente maior do que o grupo controle CT na mesma idade. Histologicamente, a PV do grupo onde as mães permaneceram diabéticas durante todo o período (D) em ambas as idades apresentaram redução nos ácinos prostáticos e aumento no estroma fibromuscular em comparação com os outros grupos em ambas as idades. A reposição exógena de insulina materna durante a lactação restaurou a morfologia glandular, embora no grupo DGI no DPN120, o estroma permaneça mais espesso do que a observada no grupo de CT. Não houve diferença nos índices proliferação celular e apoptose entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão do receptor de androgênio (AR) foi menor no grupo D em comparação com o grupo CT no DPN60. A atividade secretora foi diminuída nos grupos D em ambas as idades. O diabetes gestacional moderado (DGM) prejudica a maturação da próstata ventral durante a puberdade que leva à diminuição da atividade secretora na idade adulta. A reposição de insulina durante a lactação é capaz de restaurar a morfofisiologia glandular. Assim, os efeitos adversos do DGM na fisiologia da próstata podem levar a uma diminuição do potencial reprodutivo desses animais.

Palavras-chave: Diabetes Gestacional moderado, próstata, insulina, próstata ventral.

Abstract

Santos, SAA. **Effects of mild gestational diabetes and insulin replacement on lactation on Wistar rat ventral prostate.** [Dissertation]. Botucatu, São Paulo: Institute of Biosciences, São Paulo State University - UNESP, 2014.

Diabetes mellitus (DM) is a clinical heterogenic, caused by β -pancreatic cell deficiency of insulin synthesis or due to target cells-dysfunction in insulin receptor, resulting in hyperglycemic metabolic disease. When associated with pregnancy, diabetes can lead to increased risk for maternal/fetal. The maternal hyperglycemia stimulates the fetal outgrow due to higher blood-glucose levels and growth factors. The high birth weight is related to the risk of development insulin resistance, obesity and DM type 2 in adulthood. The diabetes also affects negatively male reproductive system, mainly accessory glands and gonads. Although the literature has been demonstrated the influence of diabetes on testicular functions and fertility, the impact of gestational diabetes on prostate morphogenesis and growth in male offspring is far to be elucidated. Thus, due to the clinical importance of thematic, the aim of this project was to evaluate the possible effects of mild gestational diabetes on the rat ventral prostate (VP) growth, maturation and function at post-natal day (PND) 60 and 120. It was investigate the general morphology, cell proliferation and apoptosis, androgen receptor localization and expression, as well as the prostatein, an androgen-stimulated secretory protein in the VP of male offspring from dams streptozotozin-induced moderated gestational diabetes. The serum testosterone and insulin showed no statistical difference between experimental groups. The VP relative weight increased in the offspring of mothers that received insulin during lactation (GDI) on PND120. Histologically, the VP from diabetic mother (D) showed a reduction in the lumen of acini and increased in prostatic fibromuscular stroma. Insulin replacement during lactation restored glandular morphology, although in the GDI group at PND120, the stroma remained thicker than that observed in the CT group. There is no difference in cell proliferation or apoptosis among the experimental groups. However, expression of the androgen receptor (AR) in group D was lower compared to control (CT) at the same age. The secretory activity was decreased in groups VP from D group at both ages. The mild gestational diabetes impairs the VP maturation during puberty leading to decreased secretory activity in adulthood. The insulin replacement during lactation is able to restore glandular morphophysiology. Thus, the adverse effects of mild-GDM on prostate physiology may lead to an impairment of reproductive potential in these animals.

Keywords: Mild gestational diabetes, prostate, insulin, ventral prostate.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROGRAMAÇÃO FETAL

O desenvolvimento intrauterino representa uma fase de alta vulnerabilidade, portanto é sensível a insultos tanto metabólicos quanto a agentes químicos ambientais. Dependendo do tipo, da dose e do tempo de exposição ao insulto, as consequências são diversas, desde baixo peso ao nascimento, desvios no desenvolvimento, maior susceptibilidade à doenças na idade adulta ou mesmo a morte. Estes eventos ocorrem em função de mudanças no padrão de expressão de genes responsáveis por diversas vias de sinalização que atuam durante esta fase do desenvolvimento, alteração de proliferação celular e/ou diferenciação celular e alteração na proporção dos diferentes tipos celulares que constituem órgãos e sistemas. Tais mudanças podem levar a alterações na morfologia dos tecidos e afetar de modo irreversível o funcionamento dos órgãos e sistemas, bem como comprometer sua longevidade (Qasem *et al.*, 2012). Estas respostas adaptativas de um organismo frente a insultos durante um período crítico de desenvolvimento intrauterino e que afeta os órgãos de maneira irreversível, denomina-se **programação fetal** (Barker *et al.*, 1989). A programação fetal, posteriormente também denominada *developmental origin of health and disease* (DOHaD), estabelece a hipótese de que eventos ocorridos no período intrauterino ou perinatal são “memorizados” pelo organismo em desenvolvimento através do *imprinting* fetal ou neonatal (Langley-Evans e McMullen, 2010).

Dentre os possíveis insultos no período gestacional, o diabetes *mellitus* gestacional (DMG), desde a década de 70, vem sendo relacionado com a prevalência de diabetes do tipo II e obesidade na vida adulta dos descendentes, (Dörner e Plagemann, 1994). Estudos atuais apontam que crianças expostas ao GDM tem risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidade, síndrome metabólica entre outras doenças crônicas na vida adulta (Lawlor *et al.*, 2011; Crume *et al.*, 2011; Dabelea *et al.*, 2008; Pettitt *et al.*, 1993).

1.2 DIABETES

Diabetes mellitus (DM) é definido como uma síndrome clínica heterogênea, causada pela falta de produção de insulina pela célula beta pancreática ou por defeito nos receptores para insulina nas células-alvo, resultando em doença metabólica

hiperglicêmica, com grande amplitude nos valores glicêmicos (ADA, 2013). A etiologia da doença é multifatorial, sendo influenciada tanto por fatores genéticos quanto ambientais. Dependendo da severidade da anormalidade metabólica, o DM pode ser assintomático ou estar associado a sintomas clássicos, tais como polidipsia (aumento da ingestão de líquidos; sede), poliúria (aumento da frequência urinária), polifagia (aumento da ingestão de alimentos) e baixo ganho de peso corporal (Kuzuya *et al.*, 2002).

A hiperglicemia crônica causada pelo diabetes está associada à disfunção e/ou a falência de diferentes órgãos e sistemas, tais como olhos, rins, sistema nervoso e cardiovascular, podendo levar a distúrbios de consciência, coma e até a morte (Kuzuya *et al.*, 2002; ADA, 2013).

Recentemente, a IDF, sigla em inglês para *International Diabetes Federation*, demonstrou que a perspectiva para o número de pessoas portadoras de diabetes com idades entre 20 e 79 anos é de 371 milhões e que 50% destes indivíduos desconhecem esta condição. O Brasil ocupa a 4ª posição entre os países com maior prevalência de diabetes sendo 13,4 milhões de pessoas portadoras, o que corresponde a aproximadamente 6,5% da população entre 20 e 79 anos de idade (IDF, 2012).

A classificação etiológica da patofisiologia do DM inclui três tipos, sendo a hiperglicemia um denominador comum a todos: **DM Tipo 1 (DM1)** (diabetes insulino dependente), que afeta cerca de 5-10% dos pacientes, principalmente crianças e jovens, sendo caracterizado por lesões destrutivas das células β pancreáticas devido a mecanismos autoimune, viral ou ambiental; **DM Tipo 2 (DM2)** (não dependente de insulina), caracterizado por uma combinação de diminuição na secreção e resistência à insulina, que corresponde a maioria dos casos diagnosticados (90-95%), afetando principalmente adultos e tem a obesidade como fator de risco; **Diabetes Gestacional (DMG)**, caracterizada pela intolerância à glicose, principalmente diagnosticada entre a 24ª e 26ª semanas de gestação. O DMG pode persistir após o nascimento e progredir para o DM2 (Saito *et al.*, 2010; ADA, 2013).

Durante o ciclo normal da vida podem ocorrer flutuações na sensibilidade à insulina, sendo a resistência à insulina observada principalmente durante a puberdade, (Moran *et al.*, 1999), gravidez (Buchanan *et al.*, 1990) e com o envelhecimento (DeFronzo, 1979). Por outro lado, a variação do estilo de vida, tal como o aumento da

atividade física (Goodyear *et al.*, 1998) e aumento da ingestão de carboidratos (Chen *et al.*, 1988) estão associados variações na sensibilidade a insulina.

1.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1

Os primeiros estudos envolvendo a patofisiologia do DM1 descreveram a ocorrência de um processo inflamatório associado às ilhotas de Langerhans denominado de insulite em 1965, além da detecção de autoanticorpos específicos no ano de 1974 (Luce *et al.*, 2013). Embora a etiologia do DM1 não seja totalmente esclarecida, estudos recentes demonstram que o DM1 pode se desenvolver como uma doença autoimune, desencadeado por fatores genéticos, imunológicos e ambientais (Al-Mutairi *et al.*, 2007) que levam à destruição gradual das células beta-pancreáticas.

Atualmente, o DM1 é considerado a endocrinopatia mais comumente diagnosticada durante a infância e idade adulta, caracteriza-se pela destruição gradual das células beta pancreáticas, o que resulta em deficiência na síntese de insulina e conseqüentemente a hiperglicemia (Eurodiab, 2000). Dados do ano de 2007 demonstraram que aproximadamente 20 milhões de pessoas em todo o mundo eram portadoras de DM1, com um número crescente de casos diagnosticado a cada ano (ADA, 2008). Estudos epidemiológicos demonstram uma maior incidência da doença entre os familiares de portadores da síndrome metabólica (6% em irmãos contra 0,4% na população geral) (Pociot *et al.*, 2002), o que confere um caráter genético ao DM1.

1.2.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2

O DM2, também conhecido como diabetes mellitus não insulino dependente é um distúrbio metabólico caracterizado pelo elevado nível de glicose no sangue em função da resistência e/ou insuficiência na síntese e secreção de insulina. Estudos recentes demonstram que, nos últimos 30 anos, houve um aumento crescente no número de indivíduos em idade reprodutiva afetados pela DM2 (Danaei *et al.*, 2011). Uma possível explicação para estes números é o aumento da incidência da obesidade em todo o mundo, uma vez que estas duas condições (diabetes e obesidade) estão intimamente associadas (Colosia *et al.*, 2013). O aumento da prevalência do DM2 tem sido relacionado ao estilo de vida contemporâneo, incluindo dieta com o alto teor de gordura e caloria, associada ao hábito de vida sedentário (Godfrey *et al.*, 2010). A obesidade está associada a uma variedade de distúrbios metabólicos secundários, incluindo a

resistência à insulina, hiperlipidêmica, além da DM2, que são denominados coletivamente como síndrome metabólica (Kopelman, 1997). A DM2 frequentemente leva muitos anos para ser diagnosticada, pois como o aumento da glicemia é gradual, os sintomas clássicos do diabetes demoram a se manifestar (ADA, 2013).

1.2.3. DIABETES *MELLITUS* GESTACIONAL

O Diabetes *mellitus* Gestacional (DMG) é uma das complicações médicas mais comumente associada ao período gestacional, podendo gerar complicações tanto para a mãe como para os descendentes (Buchanan *et al.*, 2012). O aumento do número de mulheres acometidas pelo DMG está diretamente relacionado à elevação dos índices de DM2, uma vez que dados demográficos demonstram números cada vez maiores de mulheres obesas em idade reprodutiva, com potencial para desenvolver DMG (Fontbonne *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 2009; Ramachandran *et al.*, 2010; Chen, 2011; Ma *et al.*, 2013).

Outro fator relevante para o desenvolvimento do DMG é que durante o período gestacional ocorrem adaptações na produção hormonal materna para permitir o desenvolvimento normal do embrião/feto. A placenta aumenta a síntese de hormônios que reduzem a ação da insulina, responsável pela captação e utilização da glicose pelo corpo. O pâncreas, conseqüentemente, aumenta a síntese de insulina para compensar este quadro de resistência a sua ação. Entretanto, em algumas mulheres (3 a 8%) ocorre queda na síntese de insulina (hipoinsulinemia), o que leva ao quadro de hiperglicemia, caracterizando o DMG (Saito *et al.*, 2010). A hiperglicemia materna estimula o crescimento fetal (macrossomia), devido à maior disponibilidade de glicose no fluxo sanguíneo e pela regulação de fatores de crescimento (Maayan-Metzger *et al.*, 2009), além disso, esta maior oferta de açúcares estimula a produção de insulina fetal, provocando hiperinsulinemia, que pode estimular o crescimento de tecidos sensíveis a ação da insulina (Balsells *et al.*, 1997) (Fig. 1). O alto peso ao nascimento está relacionado com o risco de desenvolver resistência à insulina, obesidade e DM2 na idade adulta (Nomura *et al.*, 2005; Tannus *et al.*, 2007; Hummel *et al.*, 2009)

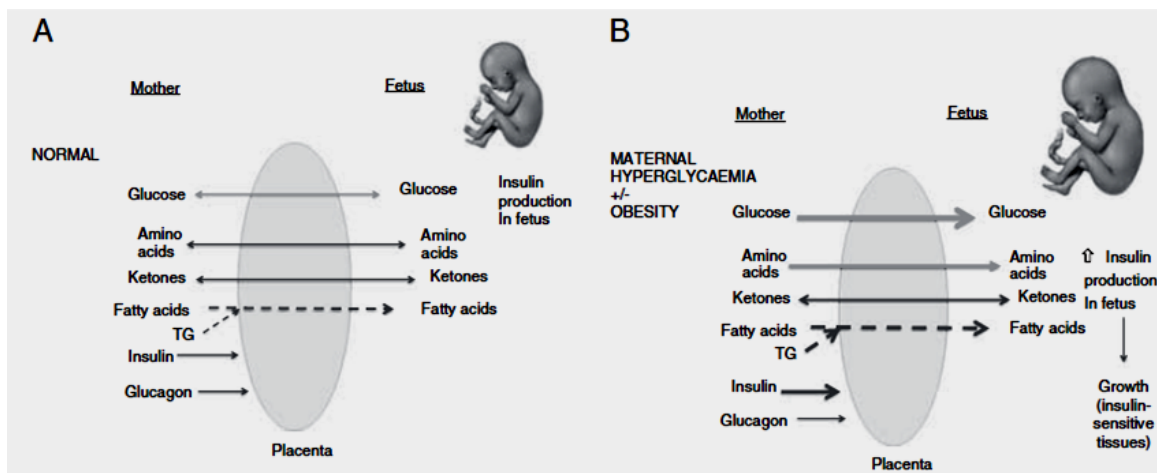


Figura 1. A. Transporte de nutrientes através da placenta sob condições normais; B. Transporte de nutrientes durante o Diabetes *mellitus* gestacional, com ou sem obesidade. O transporte de glicose, dependente de insulina da mãe para o feto, ocorre principalmente através de transportadores de glicose (GLUT-1, GLUT-3) e é dependente de sua concentração. O transporte ativo de aminoácidos também é dependente da concentração, mas é saturável. A transferência de corpos cetônicos ocorre por difusão através da placenta. A resposta fetal a hipernutrição e hiperglicemia materna difere de acordo com o genótipo e fenótipo fetal. O aumento do aporte de glicose da mãe para o feto via placentária induz a maior produção de insulina fetal, e esta hiperinsulinemia pode afetar tecidos sensíveis à insulina. TG: Triglicerídeos. Adaptado de Ma *et al.*, (2013).

No DMG, a prevalência de malformações congênitas é de aproximadamente três a cinco vezes maior em filhos de mães diabéticas (Schaefer-Graf *et al.*, 2000; Garcia-Patterson *et al.*, 2004), sendo a causa mais comum de morte perinatal entre essas crianças (Casson *et al.*, 1997; Hawthorne *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstraram que a incidência de obesidade e DM2 é maior em filhos de mães que sofreram diabetes gestacional, comparado à mães que tiveram gravidez normal (Padilha *et al.*, 2007; Maayan-Metzger *et al.*, 2009). Além disso, quando comparados os efeitos do DMG entre irmãos, constatou-se que aqueles nascidos após uma gravidez hiperglicêmica são mais propensos a desenvolver obesidade e DM2 comparados aos que nasceram após uma gravidez normal (Pettitt *et al.*, 2008; Buchanan *et al.*, 2012). Estes dados evidenciam que o DMG tem efeito direto sobre o desenvolvimento dos descendentes,

que apresentam maior probabilidade de aumento na adiposidade e doenças cardiometabólicas (Metzger *et al.*, 2009; Tam *et al.*, 2010).

A detecção e controle do diabetes em mulheres grávidas podem diminuir a gravidade das complicações a curto e longo prazo (Eriksson, 2009). A terapia mais indicada para o tratamento do DMG é a intervenção nutricional, que determina redução da ingestão calórica, limita o consumo de carboidratos simples e privilegia a ingestão de carboidratos complexos (Major *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 2012). Com este tratamento, aproximadamente 50% das mulheres afetadas por DMG alcançam valores glicêmicos normais após 2 semanas. Entretanto, 10% das mulheres afetadas atingem níveis glicêmicos normais apenas após 4 semanas, sendo que 40% não respondem à intervenção nutricional. Baseado nestes dados, a administração de insulina exógena representa a melhor forma de terapia contra a DMG. Estudos recentes tem demonstrado que a terapia materna com insulina diminui a taxa de morbidade neonatal por reduzir a incidência de nascimentos prematuros, macrossomia, síndromes respiratórias e hiperbilirrubinemia (Durnwald, 2013).

1.2 DIABETES MELLITUS E SISTEMA GENITAL MASCULINO

Em mamíferos, o sistema genital masculino é composto pelos testículos, responsáveis tanto pela produção dos gametas masculinos (espermatozoides) no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, como também da testosterona, principal hormônio esteróide sintetizado pelas células de Leydig presentes no interstício testicular. As vias espermáticas são constituídas pelos epidídimos, responsáveis pela maturação e armazenamento dos espermatozoides e ductos deferentes, que conduzem os espermatozoides até a uretra. As glândulas acessórias (vesícula seminal e próstata) sintetizam o fluído seminal, que juntamente com os espermatozóides, constituem o sêmen. O pênis é o órgão de transferência dos espermatozoides para o interior do sistema genital feminino. E composto pela uretra e por três corpos cilíndricos de tecido erétil: os corpos cavernosos, localizados na parte dorsal do pênis e corpo cavernoso da uretra ou corpo esponjoso que envolve a uretra (Junqueira & Carneiro, 2013).

Tanto o desenvolvimento como a maturação e funcionamento do sistema genital masculino são altamente dependentes de andrógeno (Handelsman *et al.* 1985). Estudos clínicos e em modelos experimentais demonstram que as células de Leydig, produtoras de testosterona, são altamente afetadas pelo DM, que leva a diminuição na quantidade

dos níveis de testosterona (La Vignera *et al.*, 2009). Assim, o DM afeta negativamente os órgãos genitais masculinos, especialmente as glândulas sexuais acessórias e as gônadas (Ribeiro *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que disfunções sexuais e reprodutivas, incluindo impotência, redução da libido, prejuízo da espermatogênese, infertilidade e diminuição da qualidade espermática, alterações nos testículos e glândulas sexuais acessórias, são freqüentemente associados com o DM no homem (Kolodny *et al.*, 1974; Bartak *et al.*, 1975; Handselman *et al.*, 1985; Vignon *et al.*, 1991; Ali *et al.*, 1993; Niven *et al.*, 1995; Baccetti *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2003) e em animais experimentais (King *et al.*, 1990; Steger *et al.*, 1990; Altay *et al.*, 2003; Sacarano *et al.*, 2006; Porto *et al.*, 2011). Um estudo recente mostrou que homens diabéticos têm até três vezes menos sucesso ao realizar o método de inseminação artificial, quando comparados a homens normais (Mulholland, 2011). Isto pode ser explicado pela diminuição na motilidade espermática ou pelo aumento no estresse oxidativo gerado pelo ambiente hiperglicêmico, com danos ao DNA das células germinativas.

1.4. GLÂNDULA PROSTÁTICA E O DIABETES MELLITUS

1.4.1. ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DA PRÓSTATA

A próstata é uma glândula exócrina acessória do aparelho genital masculino cujo desenvolvimento e homeostasia se encontram sob controle androgênico (Cunha *et al.*, 1985). Ela secreta um complexo proteolítico composto por fosfatase ácida, ácido cítrico, fibrinolisinase, enzimas específicas e outros fatores componentes do fluido seminal (Marker *et al.*, 2003). Esta secreção é fundamental para o sucesso reprodutivo, pois liquefaz o ejaculado além de possuir enzimas, nutrientes e gradientes iônicos que alcalinizam o canal vaginal e garantem a motilidade dos espermatozoides (Aumüller e Seitz, 1990). Em algumas espécies, a próstata ainda produz proteínas importantes para a formação do “plug copulatório”, o qual atua como uma proteção contra a superfecundação (Cunha *et al.*, 1987). No homem, o principal componente da secreção prostática é o antígeno prostático específico (PSA), uma serina protease pertencente à família das calicreínas importantes para a dissolução do coágulo seminal (Wang *et al.*, 1979).

No homem adulto, a próstata localiza-se no compartimento subperitoneal, entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal posterior da sínfise púbica, anterior ao reto e inferior a bexiga (Schauer e Rowley, 2011). Estruturalmente ela é encapsulada por uma fina camada de tecido fibroelástico que lhe confere uma aparência não lobulada. Histologicamente a próstata pode ser dividida em três conjuntos de glândulas túbulo alveolares: 1) glândulas da zona central ou periuretrais ou da mucosa (equivalente a 5% do tecido prostático) 2) glândulas da zona periférica ou glândulas principais periférica (que corresponde a 70% da glândula e é a principal zona de ocorrência de câncer); 3) glândulas da zona de transição ou da submucosa (compreende cerca de 25% do tecido prostático), além de uma região não glandular, o estroma fibromuscular anterior (Fig. 2A). Este estroma se estende anterior e lateralmente formando uma cápsula, que separa a próstata da gordura periprostática (Roy-Burman *et al.*, 2004; Valkenburg, 2011). Enquanto as zonas periférica e de transição se originam do seio urogenital (UGS), a zona central origina-se dos ductos de Wolffian (Lee *et al.*, 2011).

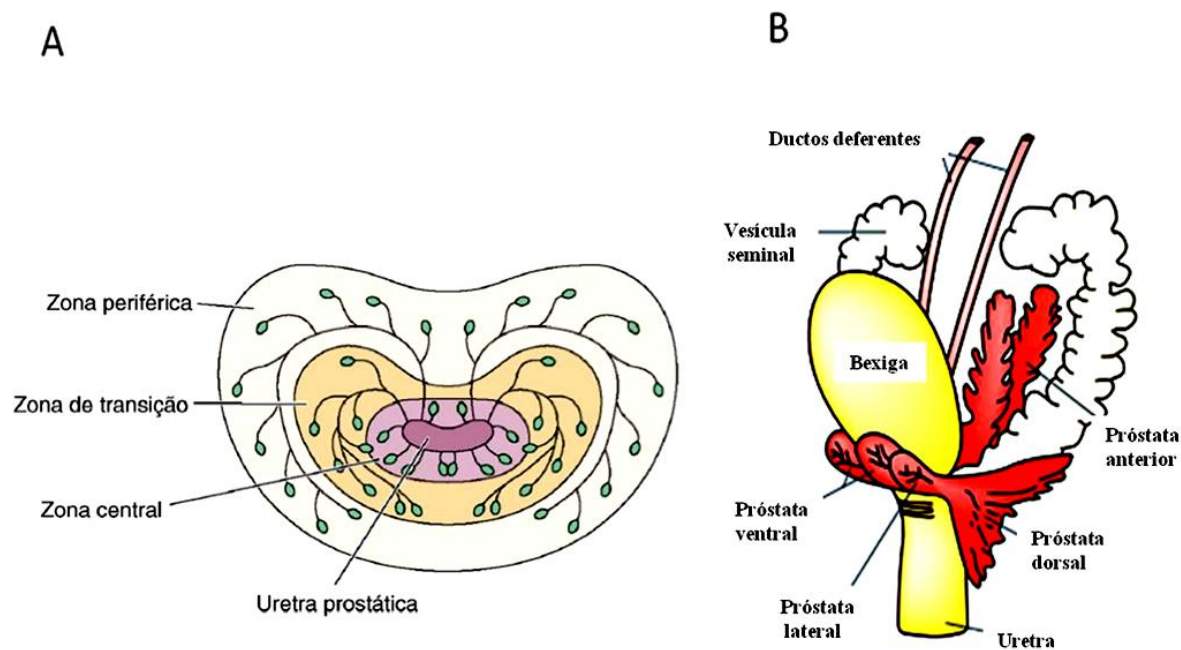


Figura 2. Organização anatômicas da próstata humana (A) e da próstata de roedores (B). Adaptado de Junqueira & Carneiro, 2013 e Marker *et al.*, 2003, respectivamente.

A próstata de roedores é composta por pares distintos de lobos: ventrais, dorsais, laterais e anteriores (Fig 3A), sendo que os lobos dorsais e laterais são frequentemente referidos como lobos dorsolaterais e os lobos anteriores são também conhecidos como glândulas coaguladoras (Bosland, 1996) associadas às vesículas seminais (Fig. 2B). Em termos de homologia com a próstata humana, os lobos anteriores são homólogos às glândulas da zona central, enquanto que os lobos dorsolaterais são considerados homólogos às glândulas da zona periférica da próstata humana. Os lobos ventrais dos roedores, apesar de não apresentarem homologia com nenhuma zona da próstata humana, são os mais estudados, principalmente por serem os lobos de mais rápido e fácil acesso durante a coleta, por serem lobos de maior tamanho e por geralmente não desenvolverem prostatite (Roy-Burman *et al.*, 2004).

Histologicamente em roedores e humanos, a próstata é uma glândula túbulo alveolar composta, cujos ductos, túbulos e alvéolos são revestidos por epitélio secretor simples, constituído de células secretoras, basais e neuroendócrinas, todas apoiadas em uma membrana basal composta principalmente por colágeno IV e laminina (Nemeth e Lee, 1996). Este epitélio é sustentado por estroma constituído por células musculares lisas e fibroblastos, além de mastócitos, macrófagos, vasos e nervos. Ao redor destas células estromais, existe complexa matriz extracelular (MEC) composta por fibras colágenas, fibras reticulares, fibras do sistema elástico, proteoglicanos e diversas glicoproteínas. O estroma é espesso na próstata humana e mais delgado nos lobos prostáticos dos roedores (McNeal, 1988; Nemeth e Lee, 1996).

Envolvendo este órgão, tem-se uma cápsula fibromuscular, que confere diferentes formas ao órgão nos diversos mamíferos (Price, 1963). No rato, cada lobo prostático é envolto e separado do outro por um estroma delgado, composto por apenas algumas células fusiformes distribuídas entre as fibras de colágeno e tecido conjuntivo frouxo, conferindo arquitetura lobada à próstata. Além disso, os diferentes lobos da próstata do rato apresentam particularidades quanto ao padrão de ramificação dos ductos (Hayashi *et al.*, 1991), padrão de expressão gênica (Takeda *et al.*, 1990), resposta à hormônios (Prins *et al.*, 1992), síntese proteica e tipo de secreção (Lee *et al.*, 1990). Outro fator a ser considerado é que cada lobo apresenta características histológicas distintas como extensas pregas epiteliais na PA, dobras menores na PDL e pregas mínimas na PV (Cunha *et al.*, 1987).

A PV (Fig. 2B e 3A) é dividida em dois lobos (direito e esquerdo) compostos de oito conjuntos de ductos cada um. Estes ductos se originam a partir da uretra como uma estrutura tubular simples e se ramificam distalmente. Ao longo de sua extensão os ductos podem ser divididos nos segmentos distal, intermediário e proximal, de acordo com a sua posição em relação à uretra. (Lee *et al.*, 1990; Shabsigh *et al.*, 1999). Enquanto nas regiões distal e intermediária, as células epiteliais são colunares altas, na região proximal, estas células são cúbicas e baixas. Células em proliferação são mais frequentes no epitélio da região distal, células apoptóticas são mais abundantes na região proximal e células secretoras são mais diferenciadas na região intermediária (Nemeth e Lee, 1996). Em relação ao estroma, tanto na região intermediária como na proximal, o tecido fibroso está presente no espaço entre os ductos, ocasionalmente intercalando-se com a camada de células musculares lisas que é contínua na região intermediária e torna-se descontínua na região distal (Lee *et al.*, 1990). Independentemente da região prostática, todo o estroma é rico em elementos da matriz extracelular (MEC) (Augusto *et al.*, 2008).

A PD origina-se da base da vesícula seminal, bilateralmente (Fig 2B). Ela é constituída por um conjunto de ductos principais, que se ramificam extensamente formando uma estrutura arborizada. Estes ductos possuem poucas pregas e são revestidos por células colunares baixas e com menor basofilia citoplasmática que as da PV. Ao redor dos ductos, encontra-se um espesso estroma fibromuscular formado por 2 a 4 camadas de células musculares lisas. Na luz dos ductos, ocorre acúmulo de uma secreção eosinofílica, além de debris celulares. A PL, em relação a PD, apresenta epitélio cilíndrico simples mais baixo com núcleo basal, basofilia citoplasmática, menos dobras epiteliais e o estroma muito delgado. Estes lóbulos são frequentemente agrupados e recebem a terminologia de próstata dorsolateral (PDL) (Roy-Burman *et al.*, 2004) (Fig. 3A).

A PA, também conhecida como glândula de coagulação, tem forma tubular e aparência gelatinosa. Seu produto de secreção é abundante e homogêneo. As células epiteliais são colunares simples, com núcleo central e podem apresentar padrão cribiforme devido grande quantidade de dobras do epitélio. Comparativamente, a PA tem estroma mais desenvolvido que a PV (Fig. 3A). Além disso, as células musculares lisas formam camadas concêntricas ao redor dos alvéolos (Roy-Burman *et al.*, 2004).

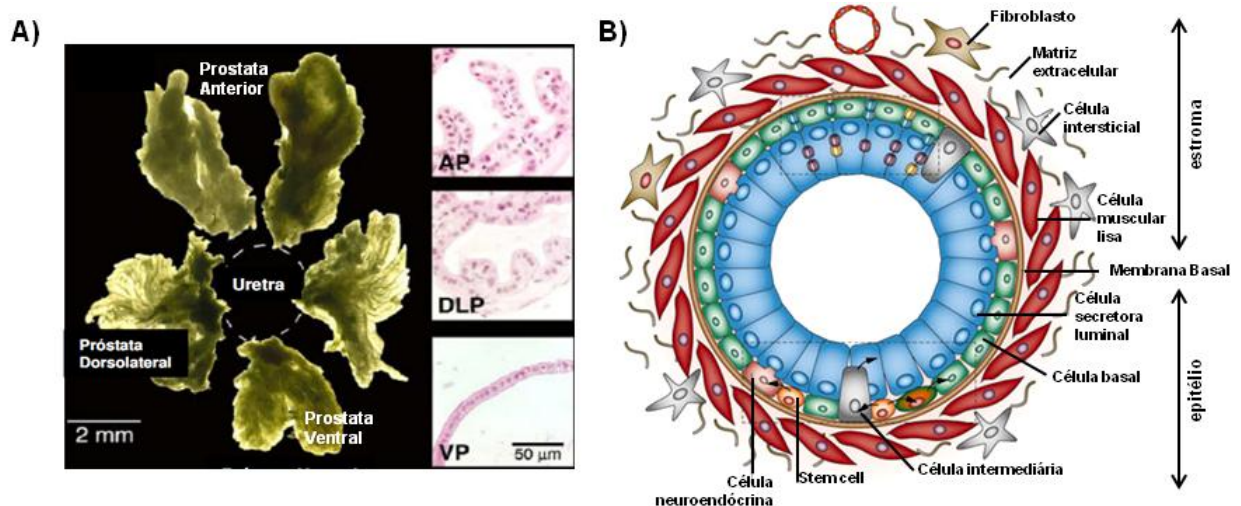


Figura 3. Imagem dos lobos prostáticos e sua organização celular. A) Aparência macroscópica e organização microscópica (coloração em H.E.) dos pares de lobos prostáticos do rato adulto (Marker *et al.*, 2003). B) Esquema da organização celular do epitélio e estroma prostático do homem adulto (modificado de Czyz *et al.*, 2012). AP, próstata anterior; DLP, próstata dorsolateral; VP, próstata ventral.

1.4.2. Características do desenvolvimento da próstata

O desenvolvimento da próstata é um processo complexo que envolve múltiplas vias de sinalização, incluindo sinalização endócrina, parácrina, autócrina e fatores de transcrição. Enquanto a maioria das glândulas acessórias desenvolvem-se a partir do ducto de Wolffian (mesodermal), a próstata origina-se do UGS, uma subdivisão da cloaca (Marker *et al.*, 2003). O UGS é constituído de uma camada epitelial derivada do endoderme e está envolvido por uma camada mesenquimal derivada do mesoderme (Prins e Putz, 2008). Este processo de desenvolvimento não é determinado pelo sexo genético, mas pela exposição aos andrógenos, pois tem sido demonstrado que o UGS de fêmea ou macho pode formar tecidos prostáticos funcionais, caso eles sejam estimulados por andrógenos no período adequado (Takeda *et al.*, 1986).

A formação da próstata inicia-se por volta do 17º dia de gestação em camundongos, 18º dia em ratos e entre a 9-10ª semana em humanos (Welsh *et al.*, 2008). Em todas as espécies, inclusive nos humanos, a glândula prostática se desenvolve através de um processo altamente conservado, denominado “morfogênese de ramificação”, onde pequenos brotos se projetam a partir do epitélio do UGS. Em humanos, o desenvolvimento da próstata está completo ao nascimento, enquanto nos

roedores a próstata é rudimentar ao nascimento, sendo a maior parte do desenvolvimento, durante os primeiros 15 dias de vida pós-natal (DPN). Em ambos, esse processo se estende até que a maturidade sexual seja atingida (Marker *et al.*, 2003).

Os andrógenos circulantes, produzidos pelos testículos fetais masculinizam o trato reprodutor e conduzem à formação glandular (Fig. 4A). Embora a testosterona (T) seja o primeiro andrógeno produzido pelos testículos, é a diidrotestosterona (DHT, forma hidroxilada da T) a principal responsável pela morfogênese prostática. A DHT é produzida no UGS a partir da redução enzimática de T pela 5α -redutase. Existem dois tipos de isoenzimas 5α -redutase, sendo a do tipo 2 expressa na próstata, particularmente nas células musculares lisas do estroma e nas células epiteliais basais (Steers, 2001). Assim, sob a ação androgênica, células mesenquimais que expressam AR invaginam da uretra na base da bexiga para formar o mesênquima do UGS (Timms *et al.*, 1994) (Fig. 3B). Posteriormente, as células epiteliais do UGS passam a expressar AR e em resposta aos andrógenos observa-se a expressão do gene homeobox Nkx3.1 no DG15,5 e dois dias depois surgem os brotos prostáticos (Timms *et al.*, 1994). Depois do nascimento, ocorre alongamento dos brotos e início da morfogênese com a formação dos ductos (Prins *et al.*, 1992). A diferenciação epitelial e mesenquimal está coordenada com o processo de ramificação morfogênica e ocorre no sentido proximal-distal (Prins e Birch, 1995).

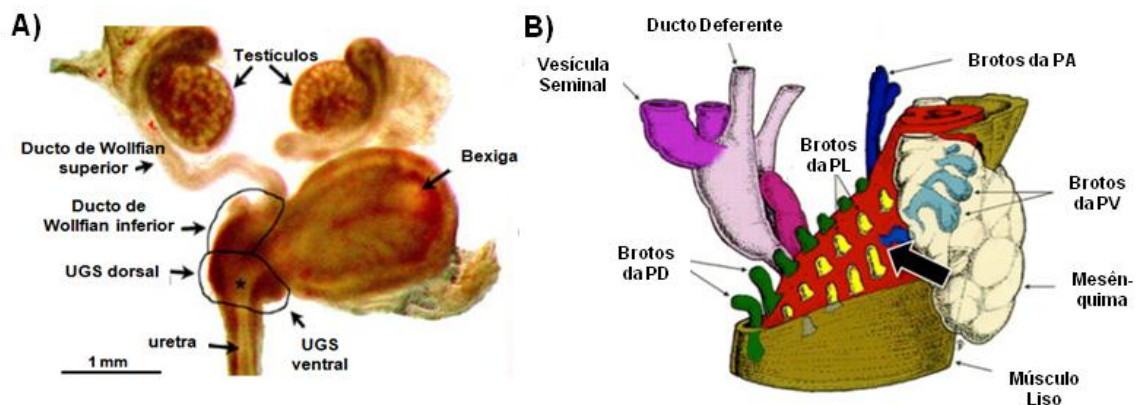


Figura 4. Desenvolvimento da próstata. **A)** Imagem do sistema urogenital de embrião de camundongo no dia gestacional 16,5. Note o seio urogenital (UGS) na base da bexiga embrionária. Nessa fase, o epitélio do UGS é visível como uma dilatação na uretra (*). Também é possível observar o mesênquima condensado nas áreas escuras ventral e dorsalmente ao epitélio (modificado de Marker *et al.*, 2003). **B)** Esquema da porção

urogenital de embrião de camundongo mostrando o padrão de brotamento prostático. Observe os brotos epiteliais sólidos da próstata ventral (PV), dorsal (PD), lateral (PL) e anterior (PA). A seta aponta ramificação lateral a partir dos brotos iniciais. No estroma adjacente observa-se as células sofrendo citodiferenciação no sentido proximal-distal e o músculo liso envolvendo a porção proximal dos ductos prostáticos (Timms e Hofkamp, 2011).

O padrão de ramificação é complexo e lóbulo-específico, sendo que este processo inicia-se no DPN3-5 na próstata ventral (PV) e dois dias depois na próstata dorsolateral (PDL). Concomitantemente, as células mesenquimais prostáticas condensam-se ao redor dos brotos (Fig. 4B), forma-se uma camada periductal de células musculares lisas enquanto as células interductais diferenciam-se em fibroblastos (Hayward *et al.*, 1997). Em seguida, tem-se início o processo de luminização (formação do lúmen) atingindo as extremidades distais dos ductos no DPN12. Outro processo importante que ocorre entre os DPN10-15, é a diferenciação funcional das células epiteliais luminiais (Prins e Birch, 1995), sendo que em roedores, as proteínas de secreção prostáticas são detectáveis a partir do DPN20 e tornam-se mais abundantes concomitantemente ao aumento dos níveis séricos de testosterona (Marker *et al.*, 2003), sendo o processo de maturação completado com a puberdade (DPN25-40) (Hayashi *et al.*, 1991).

Os eventos de proliferação e diferenciação celular que levam a morfogênese prostática são regulados pela expressão de genes em uma sequência espacial e temporal precisamente coordenada. Destes processos participam várias famílias gênicas, sendo as principais: Sonic Hedgehog (Shh), Proteína Morfogenética Óssea (BMPs), Fator de Crescimento Derivado de Fibroblasto (FGF) e a família gênica Wingless-Related MMTV Integration site (Wnt). Sabe-se que o desequilíbrio na expressão destes genes está relacionado a vários desvios no desenvolvimento e à carcinogênese (Huang *et al.*, 2009). Além disso, também participam da morfogênese prostática diferentes polipeptídeos como os fatores de crescimento homólogos a insulina (IGFs), fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), fatores de crescimento e transformação (TGFs) e fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs) (Reynolds e Kyprianou, 2006). Recentemente, foi demonstrado que a próstata apresenta receptores para hormônio do crescimento (GHR) e que distúrbios nessa via de sinalização estão relacionados tanto a

problemas no desenvolvimento, quanto a alterações na susceptibilidade da próstata a desenvolver lesões na idade adulta (Wang *et al.*, 2008).

A glândula prostática totalmente formada é composta por diferentes tipos celulares que constituem o parênquima secretor e o estroma fibromuscular (Berry *et al.*, 2008). O epitélio secretor é constituído por duas camadas morfológicamente definidas, as camadas luminal e basal (Fig. 3B), que podem ser distinguidas pela expressão diferencial de citoqueratinas (CK) e antígenos de superfície (CD) e/ou a expressão conjunta desses. Nestas camadas observam-se as células basais, luminais ou secretoras e neuroendócrinas (Miki, 2009). Há ainda a possibilidade de se distinguir as células prostáticas nos subtipos: células de amplificação transitória (transit-amplifying cells) e as células intermediárias. Estas últimas podem expressar, numa fase transitória, citoqueratinas comuns às células basais e luminais (Hudson *et al.*, 2001). Experimentos envolvendo ablação androgênica seguida de restauração hormonal em roedores também sugerem a existência de uma população celular de vida-longa e autorenovável que são responsáveis pela manutenção e homeostasia da glândula. Esta população denominada de stem cells está presentes tanto no epitélio prostático de roedores quanto na próstata humana (Lukacs *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de órgãos como a próstata, útero e glândulas mamárias, que são formados por um epitélio parenquimal, depende de uma interação epitélio-mesenquimal (Cunha *et al.*, 2004). Essas interações são importantes em diversos estágios da morfogênese, na diferenciação celular, na manutenção da diferenciação do epitélio e na função geral dos epitélios glandulares (Hall, 1978; Hay, 1981; Vilamaior *et al.*, 2000; Taboga *et al.*, 2009) (Fig. 5).

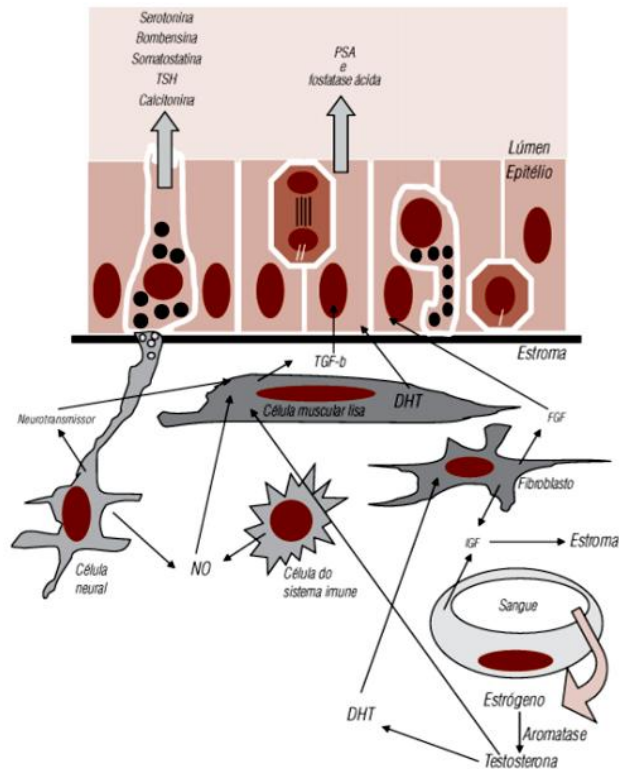


Figura 5. Interação entre o epitélio e o estroma na próstata (Taboga *et al.*, 2009). FGF- β , fator de crescimento beta; DHT, dihidrotestosterona; NO, óxido nítrico; FGF (fator de crescimento fibroblástico); PSA, antígeno prostático específico; I célula basal; II célula em divisão.

Os fatores de crescimento produzidos no estroma exercem influência parácrina sobre as células epiteliais adjacentes, através da ligação com seus receptores específicos. O epitélio, por sua vez, é estimulado a secretar polipeptídeos que irão promover crescimento estromal (Reynolds e Kyprianou, 2006). Assim, os fatores de crescimento e seus receptores atuam como mediadores da interação bidirecional entre o epitélio e o estroma, a qual também envolve sinais providos por proteínas da matriz extracelular (MEC) e pelos receptores intracelulares de hormônios esteróides (Chung *et al.*, 2005).

O compartimento estromal é formado por um arranjo complexo de células, incluindo as células musculares lisas, fibroblastos e miofibroblastos, mastócitos, macrófagos células endoteliais e pericitos, nervos e vasos sanguíneos. Ao redor destas células estromais, existe uma complexa MEC os quais provêm sinais biológicos gerais e exercem influências sobre as células epiteliais (Marker *et al.*, 2003). A matriz extracelular (MEC) é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e

proteoglicanos, sendo também um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes (Tuxhorn *et al.*, 2001)

1.4.3 EFEITOS DO DIABETES MELLITUS NA GLÂNDULA PROSTÁTICA

Nos últimos anos, a próstata, tem despertado grande interesse médico-científico pela alta incidência de doenças, principalmente a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer (CaP), que é a segunda causa de óbitos por câncer entre homens. Estima-se que aproximadamente 240 mil americanos tenham sido diagnosticados com CaP em 2011 e que 34 mil pessoas tenham morrido em decorrência da doença (Dasgupta *et al.*, 2012). No Brasil, o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer apontam para mais de 60 mil novos casos diagnosticados em 2012, com número de mortes próximo de 13 mil indivíduos (<http://www.inca.gov.br>).

Considerando a dependência androgênica prostática e o conhecido efeito da diabetes em diminuir os níveis circulantes de andrógeno (El Baba & Azar, 2013), estudos têm demonstrado que a função, morfologia, histologia e ultraestrutura da glândula prostática são alteradas pelo diabetes em modelos experimentais (Cagnon *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2006). Em um recente estudo, Pei *et al.* (2013) demonstraram redução do volume de secreção prostática em ratos diabéticos. Estes autores associaram este resultado à diminuição da expressão das aquaporinas 1, 3, 4 na próstata ventral. A análise da próstata anterior de camundongos espontaneamente diabéticos NOD (non-obese diabetic) e induzidos com aloxana C57BL/6J, mostrou espessamento do estroma, atrofia das células epiteliais secretoras e desorganização das organelas envolvidas em processos secretórios (Carvalho *et al.*, 2003), evidenciando drásticas mudanças morfológicas e prejuízo da função glandular. Da mesma forma, Ribeiro *et al.* (2006), analisando a próstata ventral de camundongos NOD, verificaram redução da área epitelial e aumento do estroma, com hipertrofia das fibras musculares e colágenas. Estudos realizados em nosso laboratório evidenciaram que o diabetes promove redução do crescimento prostático, redução da fração do parênquima e aumento do volume da fração estromal (Porto, 2011). Recentemente, Gobbo, (2012) demonstrou que o diabetes induzido por estreptozocina em ratos adulto-jovens levou a diminuição dos níveis circulantes de testosterona, assim como proliferação celular e marcação para receptor de andrógeno na próstata ventral de ratos.

1.5. INSULINA EXÓGENA E PRÓSTATA

Vários estudos recentes têm demonstrado os efeitos negativos do DM sobre a próstata em modelos de roedores (Cagnon *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2006; Porto *et al.*, 2011; Gobbo *et al.*, 2012). Em sua maioria, estes resultados são associados à diminuição de testosterona induzida pelo DM. Entretanto, a insulina também exerce efeito anabólico e mitogênico nos vertebrados que possuem receptores para insulina (IR) (Kahn 1985). Neste sentido, além da redução dos níveis de testosterona, a redução dos níveis de insulina induzida pelo diabetes também está relacionada à atrofia prostática e diminuição do volume de secreção. Porto *et al.* (2011) relataram que o tratamento com insulina exógena, consegue restaurar efeitos adversos da hiperglicemia na próstata de animais com diabetes severo. Em outro experimento, Vikram *et al.*, (2010), demonstraram que ratos machos castrados e diabéticos que receberam administração de testosterona não obtiveram total recuperação prostática, ao passo que quando estes animais foram tratados com testosterona e insulina, ocorreu completa recuperação glandular. Estes dados demonstram a necessidade de interação entre testosterona e insulina para a manutenção da morfofisiologia prostática.

Considerando os efeitos anabólicos da insulina sobre a próstata, associado ao fato de o início do desenvolvimento prostático ocorrer durante o período fetal, recentes estudos tem demonstrado que o DMG pode levar a disfunção vascular na placenta (Padilha *et al.*, 2007; Maayan-Metzger *et al.*, 2009) que aumenta a geração de moléculas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo no microambiente uterino, causando danos sistêmicos que afetam o desenvolvimento em filhotes de mães diabéticas (Lorenzoni *et al.*, 2013).

Assim, a administração de insulina à mães que desenvolvem DMG tem por objetivo um bom controle glicêmico, o que diminui os riscos de complicações perinatais, tanto para a mãe como para o recém-nascido. Whitmore *et al.*, (2012) demonstraram que a insulina exógena administrada às gestantes diabéticas foi detectado no leite materno. Estes resultados demonstram que a insulina administrada às gestantes pode ser transportada até o leite materno, uma vez que estes autores não detectaram síntese de insulina na glândula mamária, entretanto estes dados diferem da literatura vigente, que considera a insulina um peptídeo grande para ser secretado no leite (Berlin *et al.*, 2005; Hale *et al.*, 2003).

Além disso, Whitmore *et al.*, (2011) sugerem que a insulina ingerida na amamentação pode passar pelo trato gastrointestinal e ser transportada para o sangue e ainda assim exercer seus efeitos biológicos. Neste sentido, os efeitos benéficos da terapia com reposição de insulina para o feto/recém-nascido pode ser devido ao efeito direto da insulina sobre os tecidos alvos.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA PROPOSTO

A próstata é o órgão mais frequentemente acometido por neoplasia no homem. Além disso, a fundamental participação da próstata no processo reprodutivo tem motivado estudos sobre a biologia celular, molecular e endocrinologia desse órgão. Devido às conhecidas alterações metabólicas causadas pelo diabetes gestacional, e a influência do ambiente intrauterino sobre a origem de doenças na idade adulta, acreditamos ser extremamente relevante avaliar os efeitos do diabetes gestacional moderado, assim como as repercussões da administração exógena de insulina às ratas lactantes sobre a próstata dos filhotes machos.

A próstata ventral não apresenta homologia com a próstata humana, entretanto, é o principal órgão alvo de investigação além de ser a mais responsiva a modulação hormonal (Prins *et al.*, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem por objetivo, investigar os efeitos do Diabetes mellitus tipo 1 gestacional moderado e o tratamento com insulina exógena durante a lactação sobre a histofisiologia do lobo ventral da glândula prostática na puberdade e na idade adulta na prole masculina de ratos wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do DMG moderado e a reposição materna com insulina durante a lactação sobre o ganho de peso da prole masculina.
- Avaliar se o DMG moderado e a reposição insulínica materna na lactação alteram os níveis séricos de T e insulina na prole de machos;

- Investigar se os ratos, filhos de mães diabéticas, apresentam alteração de peso corpóreo, peso do lobo prostático ventral e peso testicular;
- Avaliar os efeitos do DMG moderado e a reposição insulínica materna na lactação sobre os parâmetros morfológicos e morfométrico do lobo prostático ventral, como altura do epitélio secretor, área de colágeno, volumes relativos e absolutos do parênquima e estroma prostático;
- Investigar se a DMG moderado e a reposição insulínica materna na lactação interfere nos índices de proliferação e morte das células epiteliais da PV na prole masculina aos 60 e 120 dias de idade;
- Analisar se a DMG moderado e a reposição insulínica materna na lactação altera a localização e a expressão proteica tecidual de receptor de andrógeno (AR);
- Analisar se a DMG moderado e a reposição insulínica materna na lactação altera a localização e a expressão da proteica de secreção prostática prostateína.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos desta dissertação estão no capítulo 1 apresentado na forma de artigo científico:

4.1 CAPÍTULO I: Mild gestational diabetes impairs ventral prostate maturation and decrease secretory function in wistar rat.

**Mild gestational diabetes mellitus impairs rat ventral prostate
maturation and decreases secretory activity in adulthood**

Sérgio AA dos Santos, Jaqueline C Rinaldi, Amanda E Martins, Ana CL Camargo,

Carina Leoneli, Flávia K Delella, Sérgio L Felisbino, Luis A Justulin Jr

Department of Morphology, Institute of Bioscience, Univ Estadual Paulista, Botucatu,

SP, Brazil

Short running title: Mild gestational diabetes and ventral prostate

Keywords: ventral prostate, gestational diabetes, insulin, cell proliferation, secretory function

Correspondence: Luis A Justulin Jr, Department of Morphology, Institute of Bioscience, Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP

CEP: 18618-970

Tel/Fax: +55 14 3880-0472

email: justulin@ibb.unesp.br

Artigo submetido á revista Life Sciences

Abstract

Aims: To investigate whether mild gestational diabetes mellitus (GDM) followed or not by maternal insulin replacement affects the ventral prostate (VP) structure and function in male offspring at puberty and adulthood. *Main Methods:* Pregnant rats were divided into 3 groups: Control (CT); Streptozotocin (STZ)-induced diabetics (D); and D plus insulin replacement during lactation (GDI). The male offspring from different groups were euthanized at post-natal day (PND) 60 and 120. Biometrical parameters, hormonal levels and prostates were harvested. *Key findings:* Mild-GDM promoted reduction in the glandular parenchyma and increases collagen deposition. Insulin replacement during lactation restores the VP morphology. Most importantly, mild-GDM decreases the androgen induced secretory function, as determined by prostatein expression, whereas insulin replacement reverts this effect. *Significance:* Our results show that mild gestational diabetes mellitus impairs the ventral prostate maturation during puberty leading to decreasing of secretory activity in adulthood. Insulin replacement during lactation is able to restore the glandular morphophysiology. Thus, the adverse effects of mild-GDM on prostate physiology may lead to an impairment of reproductive potential in these animals.

Introduction

Epidemiological and experimental studies have demonstrated that an adequate intrauterine microenvironment is essential for embryo/fetal development and adverse stimulus occurring during pregnancy and/or early infancy can permanently change the offspring body structure, physiology and metabolism, increasing the susceptibility to lifetime risk of obesity and several cancers, including breast and prostate (Barker, 1997; Ozzani et al., 2004; Langley-Evans et al., 2012; Rinaldi et al., 2013).

Different experimental models have been used to investigate the effects of intrauterine environment in the offspring development. These include exposition of dams to low protein diet (Rinaldi et al., 2013), global nutrient restriction (Garofano et al., 1997) and experimental-induced gestational diabetes mellitus (Amorim et al., 2011; Damaceno et al., 2011). Particularly, recent data have demonstrated that gestational diabetes mellitus (GDM), a growing problem worldwide, can induce adverse maternal, fetal, and/or neonatal outcomes, leading to long-term complications in offspring of diabetic mothers (ADA, 2013). The adverse effect of GDM may be largely due to the growth-promoting effects of fetal insulin which is produced in response to the high levels of maternal glucose (Catalano & Hauguel-De Mouzon, 2011). Thus, infants of poorly controlled diabetic mothers have increased risk of perinatal mortality and morbidity, including cardiomyopathy, macrosomia, hypoglycemia, hypocalcemia, and respiratory distress syndrome (Moley et al., 1991; Nold & Georgieff, 2004; Katkhuda et al., 2012). Fortunately, studies have shown that appropriate managements such as dietary, moderate exercise, oral hypoglycemic agents and insulin therapy could reduce

the risk of complications and improve maternal and neonatal outcomes (Lehnen et al., 2013).

Human studies that explore mechanisms responsible for changes caused by diabetes are limited not only for ethical reasons but also by the many uncontrollable variables (diet, socioeconomic factors, nutrition, and genetic factors) that can alter the intrauterine environment and increase congenital malformations. In view of this, there is a need to develop a suitable animal model (López-Soldado & Herrera, 2003). An ideal experimental model of gestational diabetes should have normal glycemia levels before gestation but glucose intolerance and impaired insulin secretion and/or function after mild pregnancy, which leads to alterations in both glucose and lipid metabolism in the mother and consequently in the fetus (Damaceno et al., 2011).

There are models that have been developed to reproduce the clinical conditions of type-2 and gestational diabetes. In laboratory animals, these are classified as mild diabetes (glycemia between 120 and 300 mg/dL) (Saito et al., 2010). Although the evidences that GDM interferes with offspring health, there is few data on the effect of GDM on reproductive function of male offspring (Amorim et al., 2011) especially those involving the prostate, a fundamental accessory in the reproductive biology. The prostate secretes different nutrients that partly compose seminal fluid, which is essential for sperm motility and nutrition (Untergasser et al., 2005).

Prostate development involves a complex and coordinate cascade of events, where steroids hormones, growth factors and insulin signaling pathway have a pivotal role (Reynolds & Kyprianou, 2006). In humans, the prostate development occurs during the second and third trimester and is complete at the time of birth (Lowsley, 1912; Prins, 1993). In contrasts, rodent prostate, which is rudimentary at birth, undergoes the

majority of its development during the first 15 days of life. In the rat, the prostate formation begins at fetal day 18.5 in a 21 day gestation strain (Hayashi et al., 1991). At birth, the ventral, dorsal, and lateral rodent prostate lobes primarily consist of unbranched, solid elongating buds or ducts and subsequent outgrowth and patterning occur postnatally. In this scenario, the prostate development potentially can be affected by GDM-induced hyperinsulinemia in utero, since insulin participates into the signaling pathway during prostate development.

In the present study we examined the male offspring exposed to mild GDM during the last-half of pregnancy to determine whether mild GDM disturbs VP glandular morphophysiology in Wistar rats at two important phases: growth and maturation. Our results demonstrated that mild GDM impairs the VP parenchyma maturation. This result is associated with an increase in the fibromuscular stroma compartment. Functionally, the reduction in the VP parenchyma decreased the glandular secretory activity, as demonstrated by low expression of prostatein. Insulin replacement was able to partially restore the morphology and secretory function of the ventral prostate.

Material and Methods

Adult female (90 days of age, n=24) and male (90 days of age, n=10) Wistar rats were obtained from the Central Stock breeder at the State University of Campinas-UNICAMP (Campinas, SP, Brazil). The animals were maintained under controlled temperature conditions (22 to 25°C), relative humidity (55%), and a 12h photoperiod (light period beginning at 7a.m.). The animals had free access to water and chow. The

experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation (CEEAA) at the Institute of Biosciences at Botucatu (protocol no. 474/2013).

Virgin female Wistar rats (90 days old) were mated overnight with established male breeders, and the day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as gestational day 0 (GD0). Mild gestational diabetes was induced in pregnant rats on DG10 with STZ (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) administered intravenously (i.v.) into the caudal vein. The DG10 was chosen by mimicking the 3th trimester of human gestation, period in which pregnancy develops GDM (Damaceno et al., 2011). Glycemia was determined by collecting one drop of blood of the distal part of the rat tail and depositing it in glucose oxidase reagent strips, which were read in a specific glycosimeter (One Touch Ultra - Johnson & Johnson®). Only diabetic female rats with blood glucose levels between 120 and 250 mg/dL were included in this study (Damaceno et al., 2011).

The animals were then randomized into three experimental groups: Control group (CT) received only citrate buffer; Gestational Diabetes group (D) received STZ (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) in a single dose of 30 mg/kg dissolved in citrate buffer (0.1 M, pH 4.5) (Steger, 1990; Porto et al., 2011); and Gestational Diabetes plus Insulin Replacement (GDI) received the same treatment of D and was administered with insulin (3ui, subcutaneously injected) for 11 consecutive days. This protocol was adopted to diminish the effects of diabetes during lactation in the GDI group (Lehnen et al., 2013).

After birth, all groups (mothers and offspring) had free access to normal protein diet for the remainder of the study. The birth weight and anogenital distance (AGD) of male pups were measured on post-natal day one (PND1). At 72h post-birth, the litter size was standardized to eight pups (the gender ratio was kept as close to 1:1 as possible) per dam for both the CT and D groups. This procedure maximizes lactation performance (Fischbeck & Rasmussen, 1987). At PND 22 the littermates were weaned and housed in isosexual groups. Post-weaning, body weight and food intake of the pups were measured weekly throughout the duration of the study. On PND60 and 120 male rats (n=12/group) were weighed and euthanized by decapitation. Blood samples were collected from ruptured cervical vessels. The ventral prostate (VP) lobes were removed, weighted, and processed for histology and biochemical analyzes.

Hormone assay

For testosterone and insulin measurement, blood samples (n=12) from each animal were collected at the time of euthanasia. Serum was obtained after centrifugation (2400×g, 20 min) and stored at -20°C. The concentration of the testosterone was determined by chemiluminescence (VITROS ECi-Johnson and Johnson Ultra-Sensitive Chemiluminescence analysis) using specific reagents (Johnson and Johnson Orthoclinical). The sensitivities of this assay were 0.02 and 0.04 ng/mL. The insulin measurement was performed in serum by ELISA following the protocol of the manufacturer (Millipore-Rat Insulin). The sensitivities of this assay were 0.02 and 10.0 ng/mL.

Histological procedures, stereological and morphometrical analysis

The prostatic lobes were fixed by immersion in 4% buffered formalin for 24h, dehydrated in a series of graded ethanol and embedded in glycol methacrylate resin (Leica Historesin embedding kit), or they were clarified in xylene and embedded in Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO). The resin sections of 3 μ m were obtained and stained with hematoxylin-eosin (H&E) for morphological and morphometric-stereological analyses. Paraplast sections of 5 μ m were stained with picosirius for collagen fibers (type I and type III collagen fibers) and stereological analysis (Junqueira et al., 1979). The sections were analyzed in a Leica DMLB 80 microscope connected to a Leica DC300FX camera under normal and polarized light. The digitalized images, obtained by using the image analyzer Leica Q-win software Version 3 for Windows, were used for morphometric-stereological analysis.

The mean of epithelial heights of the prostatic lobes was determined from a total of 1200 random measurements, at 10 different points, in 20 different fields (40X) and from six different animals (sections stained by H&E). The mean of the collagen fibers' volume in the prostatic lobes was determined by a red color automatic detection, in 10 different microscopic fields (20X) and from 10 different individual prostatic lobe sections. The collagen volume was determined as a percentage of red-stained areas per total prostatic area. To determine the relative proportions of the prostate components (epithelium, stroma and lumen) stereological analysis was carried out using Weibel et al. (1966) multipurpose graticulate with 130 points and 60 test lines. Random measurements were performed in 10 different fields (20X) and from six different individual prostatic lobe sections. The relative values were determined by counting the coincident points of the test grid and dividing them by the total number of points. To

avoid erroneous interpretations of the morphometric data, all measurements were made in the intermediate regions of the prostate lobes, which represent the major portion of the prostatic ductal system in rats (Lee et al., 1990 and Nemeth & Lee, 1996). Image acquisition, all quantitative measurements, and the identification of animal and experimental groups were performed in a blind manner by two independent investigators.

Immunohistochemistry

Sections of Paraplast® embedded prostates of 4µm were collected on silanized glass. Antigen retrieval was achieved using a decloaker for 20min. After washing, the slides were blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol for 10min followed by 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1h at room temperature. Slides were then incubated with monoclonal anti-rat-Ki-67 antibody (clone MIB-5, Dako, Carpinteria, CA), polyclonal rabbit anti-androgen receptor (AR) antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), rabbit anti-Prostatein (AbDsorotec, Kidlington, UK) diluted in 1% BSA in PBS and incubated overnight at 4°C. After washing with PBS, the slides were incubated for 1h at room temperature with goat anti-mouse IgG-HRP or goat anti-rabbit IgG-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA) diluted 1:200 in 1% BSA in PBS. Chromogen color development was carried out with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, slides were counterstained with Harris's hematoxylin. Negative control was performed by omitting the primary antibody incubation step.

In situ cell apoptosis detection by TUNEL assay

Apoptosis detection was based in a reaction of in situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated Biotinylated UTP Nick End-Labeling (TUNEL). Detection was performed using the FragEL™ DNA (Calbiochem, CA, USA) according to the manufacturer's directions. The VP were counterstained with Hematoxylin and mounted with Permount. The epithelial cells were counted in 10 random microscopic fields (40X) from 6 different ventral prostatic lobe sections from CT, D and GDI groups in both PND60 and 120. Approximately 10.000 cells were counted per experimental group. TUNEL index was expressed as a percentage of total cells counted (number of TUNEL-positive cells X 100/total cell number).

Proliferation and apoptosis index determinations

The number of epithelial cells that showed positive immunolabelling for Ki-67 or TUNEL was counted in 50 random fields at 400X magnification from six different VP lobes for each treatment and expressed as a percentage (%) (mean±SD) of the total counted cells. All image acquisition and quantitative measurements were performed with the investigators blind to both the animal identity and experimental condition. Approximately 10.000 cells were counted per experimental group.

Western blotting analysis of androgen receptor, PCNA and Prostatein

Frozen samples of ventral prostatic lobes from all experimental groups at PND60 and 120 were mechanically homogenized in 50mM Tris-HCl buffer pH 7.5 plus

0.25% Triton-X 100 by Polytron for 30s at 4°C, centrifuged, and protein was extracted on supernatant and quantified as per Bradford methods (Bradford, 1976). Protein sample (70µg) was loaded into 10% SDS-PAGE under reducing conditions. After electrophoresis, the proteins were transblotted onto a nitrocellulose membrane (Sigma-CO™, Saint Louis, MO, USA). The blot was blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBST (10mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mMNaCl; 0.1% Tween-20) for 1h. The blot was then incubated overnight at 4°C with 3% BSA in TBST containing a 1:1000 dilution of monoclonal mouse anti-PCNA (Proliferating cell nuclear antigen, Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), polyclonal rabbit anti-Prostatein (AbDserotec, Kidlington, UK), or polyclonal rabbit anti-AR (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA), or polyclonal goat anti-beta actin (Santa Cruz Biotechnology™, CA, USA) primary antibodies. The blot membranes were then washed five times for 20 min in TBST and incubated for 1h at room temperature with respective secondary peroxidase-conjugated antibodies. After washing in TBST, antibody location was detected using chemiluminescence substrate kit (Pierce ECL Western Blotting Substrate-GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The substrates were removed from membranes and ECL signals were captured by CCD camera (ImageQuant LAS 4000 mini®, GE Healthcare™). The integrated optical density (IOD) of the target proteins bands was measured using the Image J software downloaded from the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) to compare the protein levels. The AR, PCNA and Prostatein expression was normalized to the β-actin values and the results were expressed as means±SD.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out using InStat software (version 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA). According to the type of the data, either a non-parametric Mann–Whitney test or a T test (with Welch's correction factor) was used to examine the significance of any difference between groups. The results were presented as the mean±SD. Differences were considered statistically significant when p-value was <0.05.

Results

Dams biometric parameters

The body weights of dams from CT, D and GDI groups did not change throughout the pregnancy (Table 1). After diabetes induction (DG10), the glycemic index values measured at DG12 were higher in dams from D and GDI compared to CT groups (Table 1) demonstrating that dams developed gestational diabetes and that two days of insulin replacement was not sufficient to recover the glycemic index in GDI group. The glycemic index determined 21 days after delivery (PND21) revealed that insulin replacement in the GDI group was able to restore glycemic index observed in CT groups. In the D groups, the glycemic index still remained higher compared to CT and GDI (Table 1).

Male offspring parameters at PND1

Gestational diabetes mellitus followed or not by insulin replacement did not affect the litter size and gestational length (data not shown). The birth weight and male anogenital distance determined at DG01 did not change in pups from all experimental groups (Table 1).

Male offspring and prostate parameters at PND60 and 120

All comparison was made in the age-matched groups. Testosterone levels did not differ statistically among the experimental groups at PND60 and 120, although a tendency towards testosterone decreased in D groups in both ages (Table 1). Blood glucose and insulin quantifications demonstrated no statically difference between experimental groups (Table 1), although a tendency towards insulin increased in the D group in both ages. The VP absolute weight determined at PND60 and 120 did not differ between the experimental groups. However, the relative VP weight was higher in GDI groups at PND60 and 120 (Table 2). This result may be due to the tendency of decreasing in the body weight observed in animals from GDI groups in both ages (Table 2).

Morphological and morphometrical-stereological analyses

The VP lobes presented similar morphological aspects in all experimental groups (Fig.1). However, the VP from D groups at PND60 and 120 showed an apparent reduction in the luminal diameter of the prostatic acini compared to CT groups at the

same ages (Fig. 1). This result was associated with an increase in both epithelial and stromal compartments. In the GDI groups at PND60, the luminal, epithelial and stromal compartments recovered the morphological aspect observed in the CT (Fig. 1). However, in the GDI group from PND120, the stromal compartment remained higher than observed in CT (Fig. 1). Stereological results confirmed these changes in relative frequency of the prostate compartment observed in our morphological analysis (Table 2).

Picrosirius staining showed collagen fibers adjacent to the epithelium, in the interacinar stroma, and around smooth muscle cells in VP in all groups (Fig. 2). In D group at PND60 and 120, it was evident an increase in the collagen fibers volume compared to CT at the same age (Fig. 2). In the GDI, only the prostate from PND120 group presented increased collagen deposition (Fig. 2), since the values in GDI group from PND60 was similar to the observed in the CT group (Fig. 2). The same images analyzed under picrosirius plus polarization method showed thin and weakly birefringent greenish fibers, in the in the CT groups (Fig. 2). In contrast, the D and GDI groups contained thick, bright (strongly birefringent with several pattern of interference colours) greenish, yellow and some points red fibers surrounding prostatic acini (Fig. 2).

Morphometric analysis confirmed our morphological data (Table 2).

Epithelial cell proliferation and apoptosis

The positive reaction against Ki-67 antigen was visualized as a dark brown stain mainly in the epithelial secretory cells in the VP from all groups (Fig. 3). The number of positive nuclei of Ki-67 reaction in the VP epithelium did not change between the

experimental groups. The apoptosis was also not affected by mild GDM or insulin replacement in all ages (Fig. 4). The quantitative analysis confirmed the Ki-67 and TUNEL reactions (Table 2). No positive staining was observed in the negative control of KI-67 and TUNEL reactions (data not shown).

Androgen Receptor and Prostatein

Androgen receptor immunostaining was detected mainly in the nuclei of columnar and basal epithelial cells of the ventral prostatic lobes from the all experimental groups (Fig. 5). AR immunostaining was apparently less intense in the nuclei of prostatic epithelial cells from D group at PND60 compared to the CT group in the same age (Fig. 5). The prostatein was localized in the cytoplasm and apical portion of the epithelial cells in all experimental groups (Fig. 6). The reaction was apparently less intense in the D groups at the PND60 and 120 compared to CT groups in the same age (Fig. 6).

Western Blotting

The expression of PCNA, AR, and prostatein was evaluated by western blotting. There was no difference in the PCNA expression in the VP in all experimental groups (Fig. 7a and b), although a tendency of reduction in the D groups at PND60 and 120. The analysis of AR expression demonstrated statistical differences between D group at PND60 compared to CT and GDI in the same age (Fig. 8a and b). The prostatein expression was lower in the D groups at PND60 and 120, compared to CT and GDI in the same age (Figs. 9a and b).

Discussion

Clinical and experimental studies have shown that exposure to adverse conditions during the critical stages of embryonic, fetal or neonatal development changes the mechanisms of growth and metabolism observed later in childhood, leading to a significantly increase risk of later disease. David Barker, one of the most influential clinical epidemiologists challenged the idea that chronic disorders such as diabetes and cardiovascular disease are explained only by bad genes and unhealthy adult lifestyles. His 'Barker hypothesis' proposed that the fetal environment and early infant health permanently “programme” the body's metabolism and growth, and thus determine the pathologies of old age (Barker, 1997). Initially controversial, his ideas triggered an explosion of research worldwide into the relationship between early development and adult disease (Cooper, 2013).

Diabetes during pregnancy, a common condition around the world, has been linked to increased risk of obesity and diabetes in offspring. This type of diabetes maybe divided into clinical diabetes (women previously diagnosed with type 1 or type 2 diabetes) and gestational diabetes mellitus, defined as any glucose intolerance detected during pregnancy that has evolved from a diagnosis associated with the metabolic risk of type 2 diabetes to a clinical condition associated with higher risks for maternal and perinatal morbidity (Forsbach-Sánchez et al., 2005).

Although the known effects of GDM in offspring health, there is few information on the influence of the mild-GDM on reproductive function of male offspring, especially those involving prostate, an essential gland for semen fluid secretion and male fertility. Therefore, to our knowledge, this is the first study

addressing the effect of gestational diabetes mellitus on rat ventral prostate morphophysiology at pubertal and adult ages.

In our experiment, mild-GDM (glycemia between 120 and 300 mg/dL) was induced with a single dose of STZ (30mg/kg) administered intravenously into the caudal vein of dams at DG10, period which mimics the 3th trimester of human gestation (Damaceno et al., 2011). The insulin replacement in GDI group was able to recover glycemic index at PND21, mimicking a condition of insulin-treatment of GDM in women (Lehnen et al., 2013). Besides improving maternal hyperglycemia, recent study demonstrated that insulin can be transported into human milk, retaining biological activity when ingested by the infant (Shehadeh et al., 2006). Our results demonstrated that mild-GDM followed or not by insulin replacement did not change the dam body weight during pregnancy, gestational length, and litter size or litter birth weight. Other authors have demonstrated, experimentally, that mild-GDM in rat led to a negative impact on maternal reproductive performance (Jawerbaum et al., 1996; López-Soldado & Herrera, 2003; Chang et al., 2005; Damasceno et al., 2011; Horgan et al., 2011). Saito et al. (2010) demonstrated increased rates of pre and post-implantation losses, reduced rates of fetuses with appropriate weight for gestational age and decreased dams body weight. However, in this study, the diabetes was induced at birth and the adult female rats presenting with lower glycemia than 120 mg/dL received more 20mg STZ/kg (i.p.) at day 7 of pregnancy (2nd induction) a protocol that increases the negative impact of GDM for pregnant. In another experimental study, Sinzato et al. (2012) demonstrated that mild diabetes, induced neonatally in female Wistar rats altered maternal glycemia at the beginning of pregnancy, affecting the initial development of the embryo and its implantation. Interestingly, these authors demonstrated no changes in the fetal weight at

term and attributed this result to the maintenance of the labyrinth, a region of maternal-fetal exchange, which contributed to appropriate fetal development. In our study, as the mild-GDM was induced in the latter-half of pregnancy, period in which the implantation and the early intrauterine development had finished, we did not observe the change in the reproductive performance function of dams nor in the litter birth weight as observed by the others.

The AGD has been used as a good external biomarker for correct prenatal androgen exposure because it is regulated by testosterone from fetal testes (Graham & Gandelman, 1986; Swan et al., 2005). Our results demonstrated no statically difference in this parameter between male offspring in all experimental groups. This result is in accordance with the levels of testosterone quantification, which did not change, although a tendency towards decreased testosterone levels was observed in the D and a restoration in GDI groups of both ages. Despite, we did not find data in the literature on the effect of mild-GDM on anogenital in male offspring, Rinaldi et al., (2013) demonstrated that male pups subjected to maternal malnutrition, another model to induce adverse intrauterine condition, presented decreased in AGD at PND1. In these animals, the testosterone levels were reduced until PND30, returning to the control levels afterward. Amorim et al. (2011), demonstrated delay in testicular descent, preputial separation and decrease in reproductive organs in a model GDM-induced approximately 10 days before mating. Despite these results, no changes in the testosterone levels were observed by these authors in male offspring measured from PND40 until PND90. Thus, we believe that changes in hormonal status caused by mild-GDM or insulin replacement were not sufficient to interfere with androgenic-determination of AGD in male offspring.

In adulthood, clinical studies have shown that male reproductive function is impaired by diabetes mellitus, mainly due to decreased serum androgen levels (Kelly et al., 2013; Spitzer et al., 2013). These include impotency, decrease in libido, spermatogenesis and infertility (Kolodny et al., 1974; Bartak et al., 1975; Handselman et al., 1985; Vignou et al., 1991; Ali et al., 1993; Niven et al., 1995; Baccetti et al., 2002; Ryu et al., 2003). In experimental models of STZ-induced diabetes mellitus in adult rats, there are a body of evidences indicating impairment in the reproductive functions, such as testicular and ejaculatory dysfunctions, decrease in reproductive organs weight, in sperm counts and fertility (Kuhn-Velten et al., 1984; Murray et al., 1983; Scarano et al., 2006; Amorim et al., 2011; Phillips et al., 2014).

The prostate is also affected by diabetes mellitus during aging. Experimental studies demonstrated that diabetes leads to prostatic involution (Cagnon et al., 2000; Ikeda et al., 2000; Ribeiro et al., 2006), a imbalance between proliferation and cell death in the secretory epithelium (Burke et al., 2006; Favaro et al., 2008), extracellular matrix remodeling and functional and phenotypic changes in stromal cells adult rats (Ribeiro et al., 2006; Arcolino et al., 2010).

In spite of the evidences about the effects of diabetes on prostate, there are no data focusing the effects of mild-GDM on prostate morphophysiology. Our morphometric-stereological results demonstrated that mild-GDM induced decrease in the glandular lumen associated with increase in the stromal compartment in D group at PND60 and 120, even we have not found changes in the cellular proliferation and apoptotic indexes. These changes in VP structure can be attributed to the low androgen receptor expression in the D group at PND60. We believe that decreasing in androgenic signaling, observed at PND60 can lead to lower growth in the glandular parenchyma,

since it plays a major role in the VP growth (Marker et al., 2003; Shidaifat et al., 2004; Justulin et al., 2010). Furthermore, we cannot exclude the possible interference of mild-GDM on genes-controlling cell proliferation and differentiation during fetal development and lactation, which could lead to change in prostate morphology and function (Qasem et al., 2012).

On the other hand, insulin replacement (GDI groups) was able to revert the effect of mild-GDM on parenchyma growth, as well as the tendency of decrease testosterone levels in both ages. We did not find in the literature data on the hormonal status of male offspring of diabetic mothers that have received insulin replacement. However, the effects of insulin replacement on androgenic signaling in adult diabetics rats were controversial. Some studies demonstrated that insulin replacement restores the testosterone levels in STZ-induced in male rats (Sudha et al., 2000) while others showed partial recovery of testosterone after insulin administration in adult diabetic rats (Suthagar et al., 2009; Porto et al., 2011). As reviewed by Steger and Rabe (1997), differences in results between studies on experimental diabetes are mainly due to variations in the severity and duration of diabetes and in the degree of glycemic control achieved with insulin replacement. Moreover, Porto et al. (2011) demonstrated that although testosterone levels remains lower than observed in control after insulin replacement, the rat ventral prostate weight and morphology were completely recovered. Our results are in accordance with those proposed by Porto et al. (2011) and demonstrate the growth-promoting effects of insulin in the prostate (Vikram et al., 2010).

Most importantly, although the prostate structure have been recovered, the androgen-induced secretory activity, as determined by the expression of prostatein, an

androgen-regulated secreted protein, remained lower in both D groups at PND60 and 120, as compared to the CT groups. The insulin replacement was able to restore the VP secretory activity in both ages. These results demonstrate that the prostate physiology has been impaired by mild-GDM in both puberty and adulthood. Furthermore, our results reinforce the role of insulin as an important hormone for prostate morphophysiology.

In conclusion, mild gestational diabetes mellitus impairs the ventral prostate maturation during puberty leading to decreasing of secretory activity in adulthood. Insulin replacement during lactation is able to restore the glandular morphophysiology of male offspring. Thus, the adverse effects of mild-GDM on prostate physiology may lead to an impairment of reproductive potential in these animals.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by São Paulo Research Foundation, grants no. 11/16522-0 and 12/18100-9. This article represents part of the Master's degree thesis developed by SAAS to the Institute of Biosciences (UNESP), Brazil.

References

- Ali ST, Shaikh RN, Siddiqi NA, Siddiqi PQ. Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Arch Androl.* 1993;30:47-54.
- Amorim EM, Damasceno DC, Perobelli JE, Spadotto R, Fernandez CD, Volpato GT, *et al.* Short- and long-term reproductive effects of prenatal and lactational growth restriction caused by maternal diabetes in male rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:154
- Arcolino FO, Ribeiro DL, Gobbo MG, Taboga SR, Góes RM. Proliferation and apoptotic rates and increased frequency of p63-positive cells in the prostate acinar epithelium of alloxan-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol.* 2010;91:144-54.
- Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36 Suppl 1:S67-74.
- Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, *et al.* Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod.* 2002;17:2673-7.
- Barker DJ. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition.* 1997;13:807-13.
- Barták V, Josífko M, Horácková M. Juvenile diabetes and human sperm quality. *Int J Fertil.* 1975;20:30-2.
- Bonovas S, Filioussi K, Tsantes A. Diabetes mellitus and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Diabetologia.* 2004;47:1071-8.
- Burke TJ. The effect of monochromatic infrared energy on sensation in subjects with diabetic peripheral neuropathy: A double-blind, placebo-controlled study: Response to Clifft *et al.* *Diabetes Care.* 2006;29:1186; author reply -7.
- Cagnon VH, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani R, Padovani CR, Martinez FE. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). *Tissue Cell.* 2000;32:275-83.
- Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S. Is it time to revisit the Pedersen hypothesis in the face of the obesity epidemic? *Am J Obstet Gynecol.* 2011a;204:479-87.
- Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S. Is it time to revisit the Pedersen hypothesis in the face of the obesity epidemic? *Am J Obstet Gynecol.* 2011b;204:479-87.
- Chan JM, Latini DM, Cowan J, Duchane J, Carroll PR. History of diabetes, clinical features of prostate cancer, and prostate cancer recurrence-data from CaPSURE (United States). *Cancer Causes Control.* 2005;16:789-97.

Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 2005;146:2445-53.

Cooper C. David Barker (1938-2013). *Nature*. 2013;502:304.

Dabelea D. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care*. 2007;30 Suppl 2:S169-74.

Dabelea D, Hanson RL, Bennett PH, Roumain J, Knowler WC, Pettitt DJ. Increasing prevalence of Type II diabetes in American Indian children. *Diabetologia*. 1998;41:904-10.

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. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011;119:408-13.

Damasceno DC, Volpato GT, de Mattos Paranhos Calderon I, Cunha Rudge MV. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci*. 2002;72:235-44.

Dauge MC, Delmas V, Potier M. [The anatomic lobulation of the prostate, a controversial description]. *Morphologie*. 1999;83:5-14.

Dong L, Liu E, Guo J, Pan L, Li B, Leng J, *et al*. Relationship between maternal fasting glucose levels at 4-12 gestational weeks and offspring growth and development in early infancy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013;102:210-7.

Eriksson UJ, Borg LA, Cederberg J, Nordstrand H, Simán CM, Wentzel C, *et al*. Pathogenesis of diabetes-induced congenital malformations. *Ups J Med Sci*. 2000;105:53-84.

Eriksson UJ, Cederberg J, Wentzel P. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003;4:79-93.

Fischbeck KL, Rasmussen KM. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr*. 1987;117:1967-75.

Forsbach-Sánchez G, Tamez-Peréz HE, Vazquez-Lara J. Diabetes and pregnancy. *Arch Med Res*. 2005a;36:291-9.

Forsbach-Sánchez G, Tamez-Peréz HE, Vazquez-Lara J. Diabetes and pregnancy. *Arch Med Res*. 2005b;36:291-9.

Fávaro WJ, Cagnon VH. Immunolocalization of androgen and oestrogen receptors in the ventral lobe of rat (*Rattus norvegicus*) prostate after long-term treatment with ethanol and nicotine. *Int J Androl*. 2008;31:609-18.

- Garcia Carrapato MR. The offspring of gestational diabetes. *J Perinat Med*. 2003;31:5-11.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia*. 1997;40:1231-4.
- Graham S, Gandelman R. The expression of ano-genital distance data in the mouse. *Physiol Behav*. 1986;36:103-4.
- Haider S, Ahmed S, Tabassum S, Memon Z, Ikram M, Haleem DJ. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. *Acta Neurol Belg*. 2013;113:35-41.
- Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Yue DK, Turtle JR. Testicular function and glycemic control in diabetic men. A controlled study. *Andrologia*. 1985a;17:488-96.
- Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Yue DK, Turtle JR. Testicular function and glycemic control in diabetic men. A controlled study. *Andrologia*. 1985b;17:488-96.
- Hayashi N, Sugimura Y, Kawamura J, Donjacour AA, Cunha GR. Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod*. 1991;45:308-21.
- Horgan RP, Broadhurst DI, Walsh SK, Dunn WB, Brown M, Roberts CT, *et al*. Metabolic profiling uncovers a phenotypic signature of small for gestational age in early pregnancy. *J Proteome Res*. 2011;10:3660-73.
- Ikeda K, Wada Y, Foster HE, Wang Z, Weiss RM, Latifpour J. Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor-beta. *J Urol*. 2000;164:180-5.
- Jawerbaum A, Gonzalez ET, Faletti A, Novaro V, Vitullo A, Gimeno MA. Altered prostanoid production by cumulus-oocyte complexes in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Prostaglandins*. 1996;52:209-19.
- Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-55.
- Justulin LA, Della-Coleta HH, Taboga SR, Felisbino SL. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int J Androl*. 2010;33:696-708.
- Kasper JS, Giovannucci E. A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:2056-62.

Katkhuda R, Peterson ES, Roghair RD, Norris AW, Scholz TD, Segar JL. Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. *Pediatr Res.* 2012a;72:352-61.

Katkhuda R, Peterson ES, Roghair RD, Norris AW, Scholz TD, Segar JL. Sex-specific programming of hypertension in offspring of late-gestation diabetic rats. *Pediatr Res.* 2012b;72:352-61.

Kelly DM, Jones TH. Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *J Endocrinol.* 2013;217:R25-45.

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. *Diabetol Metab Syndr.* 2009;1:21.

Kolodny RC, Kahn CB, Goldstein HH, Barnett DM. Sexual dysfunction in diabetic men. *Diabetes.* 1974;23:306-9.

Kühn-Velten N, Schermer R, Staib W. Effect of streptozotocin-induced hyperglycaemia on androgen-binding protein in rat testis and epididymis. *Diabetologia.* 1984;26:300-3.

Langley-Evans SC, Alexander B, McArdle HJ, Sloboda DM. Developmental origins of health and disease. *J Nutr Metab.* 2012;2012:838640.

Lee C, Sensibar JA, Dudek SM, Hiipakka RA, Liao ST. Prostatic ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. *Biol Reprod.* 1990;43:1079-86.

Lehnen AM, Leguisamo NM, Dias LD, Pinto GH, Okamoto NM, Machado UF, *et al.* Changes in renal glucose transporters in an animal model of metabolic syndrome. *Horm Metab Res.* 2013;45:840-3.

Leitzmann MF, Ahn J, Albanes D, Hsing AW, Schatzkin A, Chang SC, *et al.* Diabetes mellitus and prostate cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Cancer Causes Control.* 2008;19:1267-76.

Li X, Luo SJ, Zhang K, Yang HX. [Streptozotocin-induced maternal intrauterine hyperglycemia environment and its influence on development and metabolic in adult offspring with high birth weight in rats]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2012;47:769-76.

López-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Exp Diabetes Res.* 2003;4:107-18.

Minicucci MF, Azevedo PS, Oliveira SA, Martinez PF, Chiuso-Minicucci F, Polegato BF, *et al.* Tissue vitamin A insufficiency results in adverse ventricular remodeling after

experimental myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26:523-30.

Moley KH, Vaughn WK, DeCherney AH, Diamond MP. Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development. *J Reprod Fertil*. 1991a;93:325-32.

Murray FT, Cameron DF, Orth JM. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat. *Metabolism*. 1983;32:141-7.

Nemeth JA, Lee C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate*. 1996;28:124-8.

Niven MJ, Hitman GA, Badenoch DF. A study of spermatozoal motility in type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1995;12:921-4.

Nold JL, Georgieff MK. Infants of diabetic mothers. *Pediatr Clin North Am*. 2004b;51:619-37, viii.

Palomino Garibay MA, Revilla Monsalve C, Cárdenas Sánchez A, Polanco Ponce AC, Islas Andrade S. [Effect of induced diabetes on reproduction and development]. *Ginecol Obstet Mex*. 1998;66:403-6.

Pettitt DJ, Aleck KA, Baird HR, Carraher MJ, Bennett PH, Knowler WC. Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. *Diabetes*. 1988;37:622-8.

Pettitt DJ, Baird HR, Aleck KA, Bennett PH, Knowler WC. Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *N Engl J Med*. 1983;308:242-5.

Phillips E, Carpenter C, Oates RD. Ejaculatory dysfunction. *Urol Clin North Am*. 2014;41:115-28.

Pinho CF, Ribeiro MA, Rinaldi JC, Felisbino SL, Pinheiro PF, Domeniconi RF, *et al*. Gestational protein restriction delays prostate morphogenesis in male rats. *Reprod Fertil Dev*. 2013.

Porto EM, Dos Santos SA, Ribeiro LM, Lacorte LM, Rinaldi JC, Justulin LA, *et al*. Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. *Microsc Res Tech*. 2011;74:1040-8.

Reynolds AR, Kyprianou N. Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. *Br J Pharmacol*. 2006b;147 Suppl 2:S144-52.

Ribeiro DL, Caldeira EJ, Cândido EM, Manzato AJ, Taboga SR, Cagnon VH. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *Eur J Histochem*. 2006;50:51-60.

Ribeiro DL, Rafacho A, Bosqueiro JR, Taboga SR, Góes RM. Cellular changes in the

prostatic stroma of glucocorticoid-treated rats. *Cell Tissue Res.* 2008;332:499-508.

Rinaldi JC, Justulin LA, Lacorte LM, Sarobo C, Boer PA, Scarano WR, *et al.* Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Sci.* 2013;92:763-74.

Rother KI. Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med.* 2007;356:1499-501.

Rudge MV, Damasceno DC, Volpato GT, Almeida FC, Calderon IM, Lemonica IP. Effect of Ginkgo biloba on the reproductive outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:1095-9.

Ryu JK, Kim DJ, Lee T, Kang YS, Yoon SM, Suh JK. The role of free radical in the pathogenesis of impotence in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J.* 2003;44:236-41.

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. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2:26.

Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl.* 2006;29:482-8.

Shidaifat F, Daradka M, Al-Omari R. Effect of androgen ablation on prostatic cell differentiation in dogs. *Endocr Res.* 2004;30:327-34.

Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL, Bueno A, Calderon IeM, Rudge MV, *et al.* Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res.* 2012a;2012:108163.

Spitzer M, Huang G, Basaria S, Travison TG, Bhasin S. Risks and benefits of testosterone therapy in older men. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:414-24.

Steger RW. Testosterone replacement fails to reverse the adverse effects of streptozotocin-induced diabetes on sexual behavior in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;35:577-82.

Sudha S, Valli G, Julie PM, Arunakaran J, Govindarajulu P, Balasubramanian K. Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000;108:14-20.

Suthagar E, Soudamani S, Yuvaraj S, Ismail Khan A, Aruldas MM, Balasubramanian K. Effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. *Biomed Pharmacother.* 2009;63:43-50.

Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, *et al.* Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect.* 2005;113:1056-61.

Untergasser G, Plas E, Pfister G, Heinrich E, Berger P. Interferon-gamma induces neuroendocrine-like differentiation of human prostate basal-epithelial cells. *Prostate.* 2005;64:419-29.

Vignon F, Le Faou A, Montagnon D, Pradignac A, Cranz C, Winiszewsky P, *et al.* Comparative study of semen in diabetic and healthy men. *Diabete Metab.* 1991;17:350-4.

Vikram A, Jena GB, Ramarao P. Increased cell proliferation and contractility of prostate in insulin resistant rats: linking hyperinsulinemia with benign prostate hyperplasia. *Prostate.* 2010;70:79-89.

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. *J Ethnopharmacol.* 2008;116:131-7.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966;30:23-38.

Table 1. Biometric and morphological parameters of dams and male pups from different experimental groups.

Parameters	Experimental Groups		
	CT	D	GDI
Data of pregnant rat			
Body Weight (g) at GD0	234.21 ± 14.83	236.32 ± 12.35	242±16.31
Body Weight (g) at GD21	358.42 ± 11.61	328.53 ± 11.91	346±12.47
Blood glucose levels (mg/dL) at GD12	87.41±7.08 ^a	246±41.23 ^b	248.33±50.06 ^b
Blood glucose levels (mg/dL) at PND21	86.16±8.04 ^a	244.83±38.14 ^b	99.16±11.76 ^a
Data of pups			
Birth weight (g)	6.55±0.17	6.42±0.21	6.44±0.25
Anogenital distance (mm)	2.38±0.25	2.40±0.12	2.44±0.14
Male serum testosterone (ng/dL) at PND60	155.4±94.42	60.8±20.45	117.5±78.11
Male serum testosterone (ng/dL) at PND120	142±100	85.9±67.83	123.1±49.14
Male blood glucose levels (mg/dL) at PND60	82.3±7.97	81.3±10.64	80.3±13.28
Male blood glucose levels (mg/dL) at PND120	85±6.75	87.4±7.35	93.2±16.41
Male serum insulin (ng/mL) at PND60	0.98±0.50	1.26±0.64	0.89±0.71
Male serum insulin (ng/mL) at PND120	1.04±0.56	1.41±0.82	1.05±0.664

Values expressed as mean ± standard deviation. Different superscript letters indicate significant differences among experimental (p<0.05). GD: gestational day; PND: post-natal day; CT, control; D: mild gestational diabetes; GDI: gestational diabetes plus insulin

Table 2. Biometric and morphological-stereological parameters of rat and ventral prostate from different experimental groups.

Parameters	Experimental Groups					
	CT60	D (PND60)	GDI(PND60)	CT(PND120)	D(PND120)	GDI(PND120)
Biometric Data (n=12)						
Body weight (g)	276.2±27.5	257.0±19.9	259.0±20.1	389.7±37.2	351.7±45.8	335.1±29.1
Ventral Prostate (n = 8)						
VP absolute weight (g)	222.4±80.9	223.0±34.4	231.9±35.4	354.3±51.0	392.2±53.4	405.1±29.1
VP relative weight (g)	0.78±0.22 ^a	0.85±0.069 ^a	0.91±0.15 ^b	0.93±0.12 ^a	1.05±0.10 ^a	1.13±0.03 ^b
Collagen fibers volume fraction (%)	4.4±1.5 ^a	5.7±1.02 ^b	4.9±0.9 ^a	3.3±0.7 ^a	3.91±0.8 ^b	4.5±1.1 ^b
Epithelial Proliferation index (%)	2.45±0.49	2.7±0.82	3.42±0.47	1.65±0.43	1.41±0.5	1.94±0.71
Epithelial apoptotic index (%)	0.35±0.46	0.72±0.53	0.49±0.6	1.51±0.18	1.43±0.72	1.34±0.51
Relative frequency of VP compartment						
Lumen	58.90±7.29 ^a	43.58±7.81 ^b	54.13±5.75 ^a	66.96±4.60 ^a	56.93±11.71 ^b	61.14±5.48 ^a
Epithelium	28.51±5.48 ^a	38.14±4.44 ^b	30.96±4.44 ^a	24.20±3.00 ^a	28.08±2.67 ^b	30.11±7.76 ^a
Stroma	11.96±2.10 ^a	15.25±1.56 ^b	12.41±1.58 ^a	8.82±1.98 ^a	13.01±4.67 ^b	11.77±2.93 ^b

Values expressed as mean ± standard deviation. Different superscript letters indicate significant differences among experimental (p<0.05). PND: post-natal day; CT, control; D: mild gestational diabetes; GDI: gestational diabetes plus insulin; VP: ventral prostate.

Legend of Figures

Figure 1. Representative sections of the ventral prostatic lobe from the CT, D and GDI groups at PND60 and 120 stained with hematoxylin-eosin. s= stroma, ep= epithelium L= lumen.

Figure 2. Representative sections of the Picrosirius stained ventral prostatic from the CT, D, and GDI groups at PND60 and 120 stained by Picrosirius and analyzed under normal and polarized light. Collagen fibers (arrows).

Figure 3. Representative sections of the ventral prostatic lobe from the CT, D and GDI groups at PND60 and 120, immunostained for Ki-67. The arrows point to nuclei positive for Ki-67 cells that were used to determine the proliferation index. s= stroma, ep= epithelium L= lumen.

Figure 4. Representative images of TUNEL reaction in sections of the rat ventral prostatic lobe from the CT, D and GDI groups at PND60 and 120. The arrows indicate typical positively stained apoptotic epithelial cells that were used to determine the TUNEL index. s= stroma, ep= epithelium L= lumen.

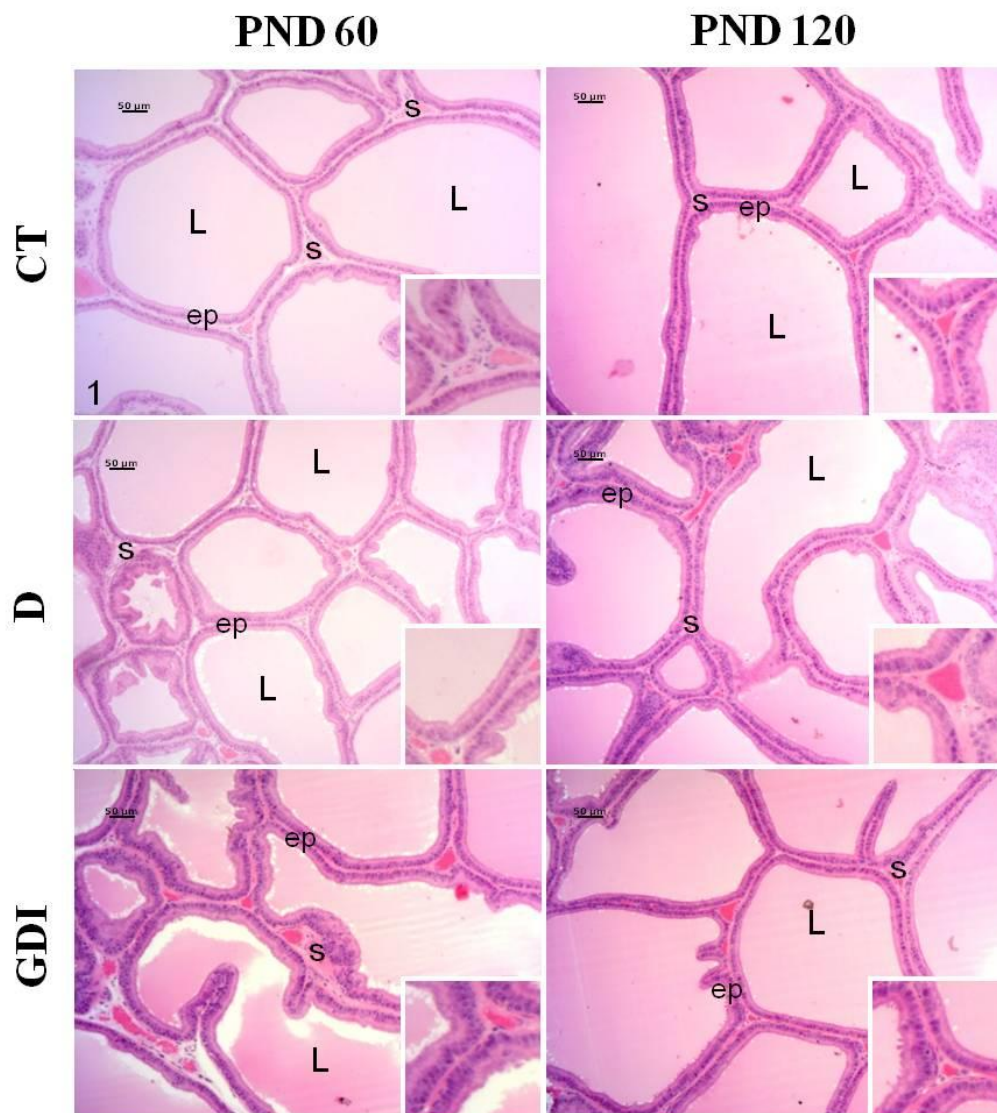
Figure 5. Representative sections of the ventral prostatic lobe from the CT, D and GDI groups at PND60 and 120 immunostained for androgen receptor. Intense reaction was pointed by arrows in all groups and weak reaction was pointed by arrowheads in the group D at PND60. s= stroma, ep= epithelium L= lumen.

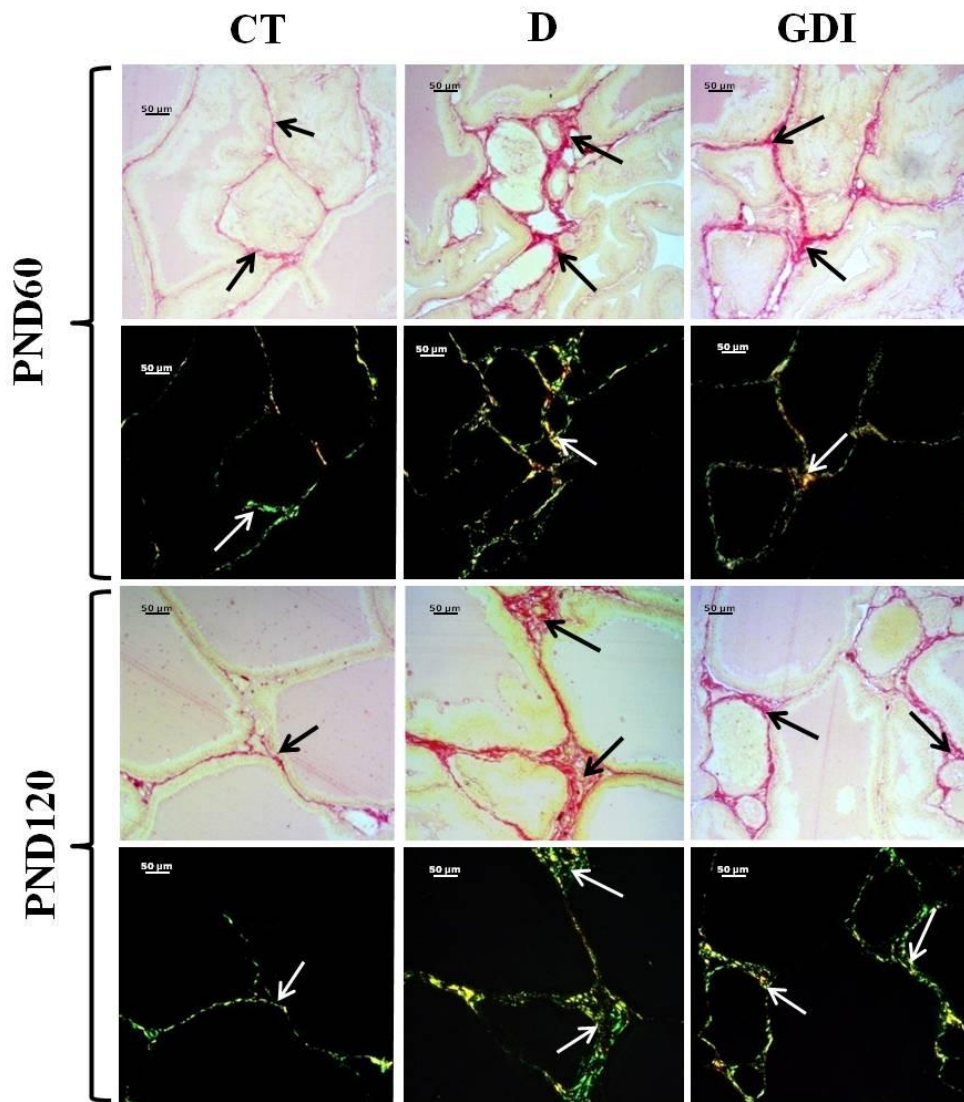
Figure 6. Representative sections of the ventral prostatic lobe from the CT, D and GDI groups at PND60 and 120 immunostained for prostatein pointed in the cytoplasm of epithelial secretory cells (arrows). s= stroma, ep= epithelium L= lumen.

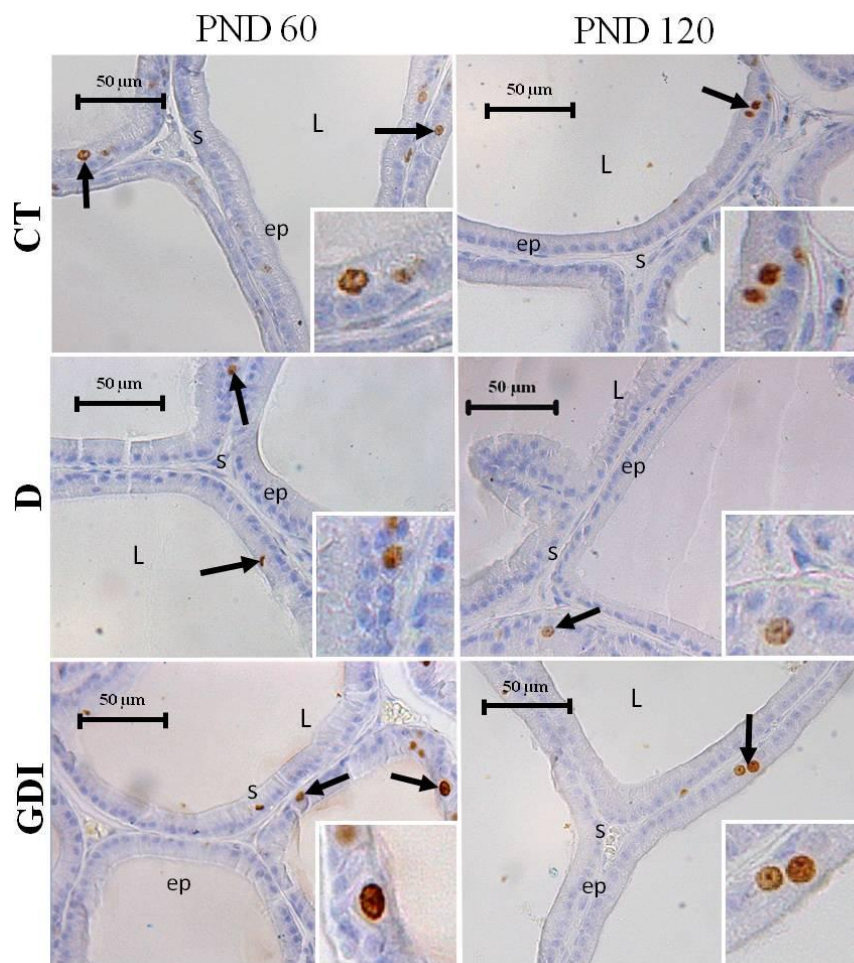
Figure 7. Representative Western blotting analyses of PCNA expression in the rat ventral prostate from the control (CT), gestational diabetes (D) and gestational diabetes plus insulin replacement (GDI) groups at PND60 and PND120. B) Densitometric analysis of the PCNA bands revealed no statistical difference between experimental groups.

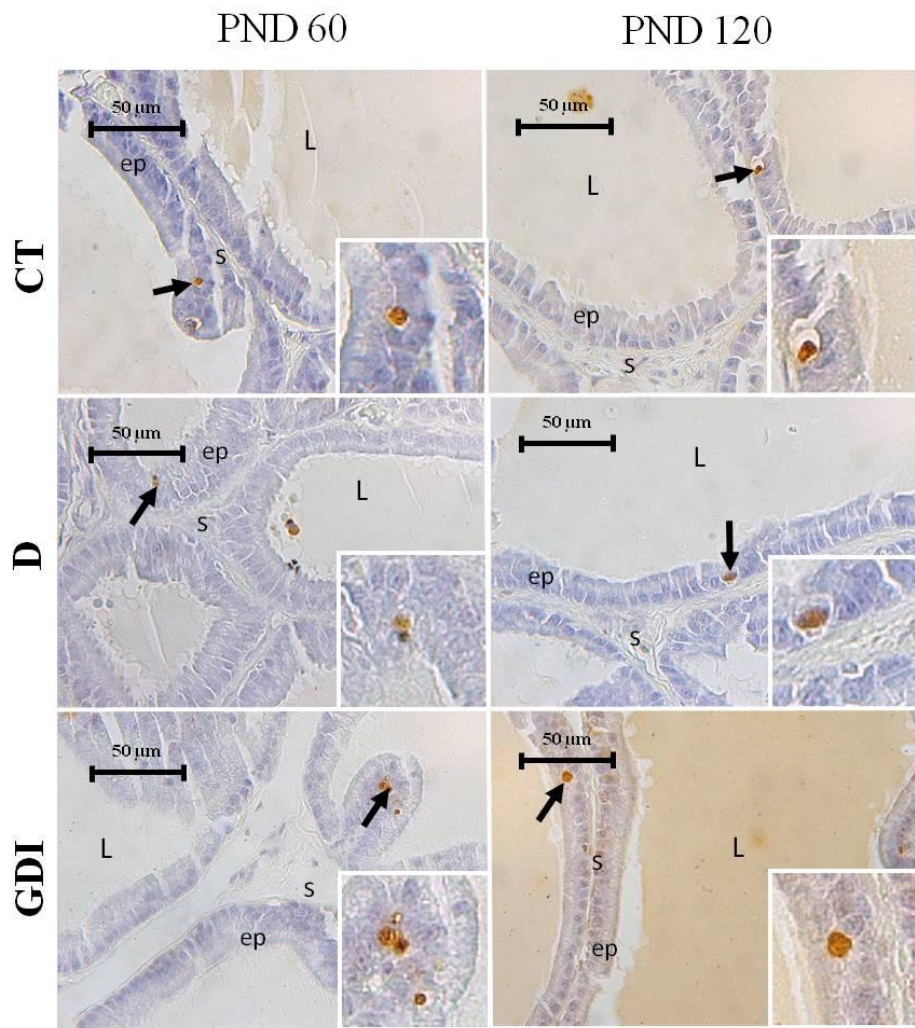
Figure 8. Representative Western blotting analyses of androgen receptor (AR) expression in the rat ventral prostate from the CT, D and GDI groups. B) Densitometric analysis of the AR bands. Asterisks (*) means statistical difference in relation to CT group with $p < 0.05$.

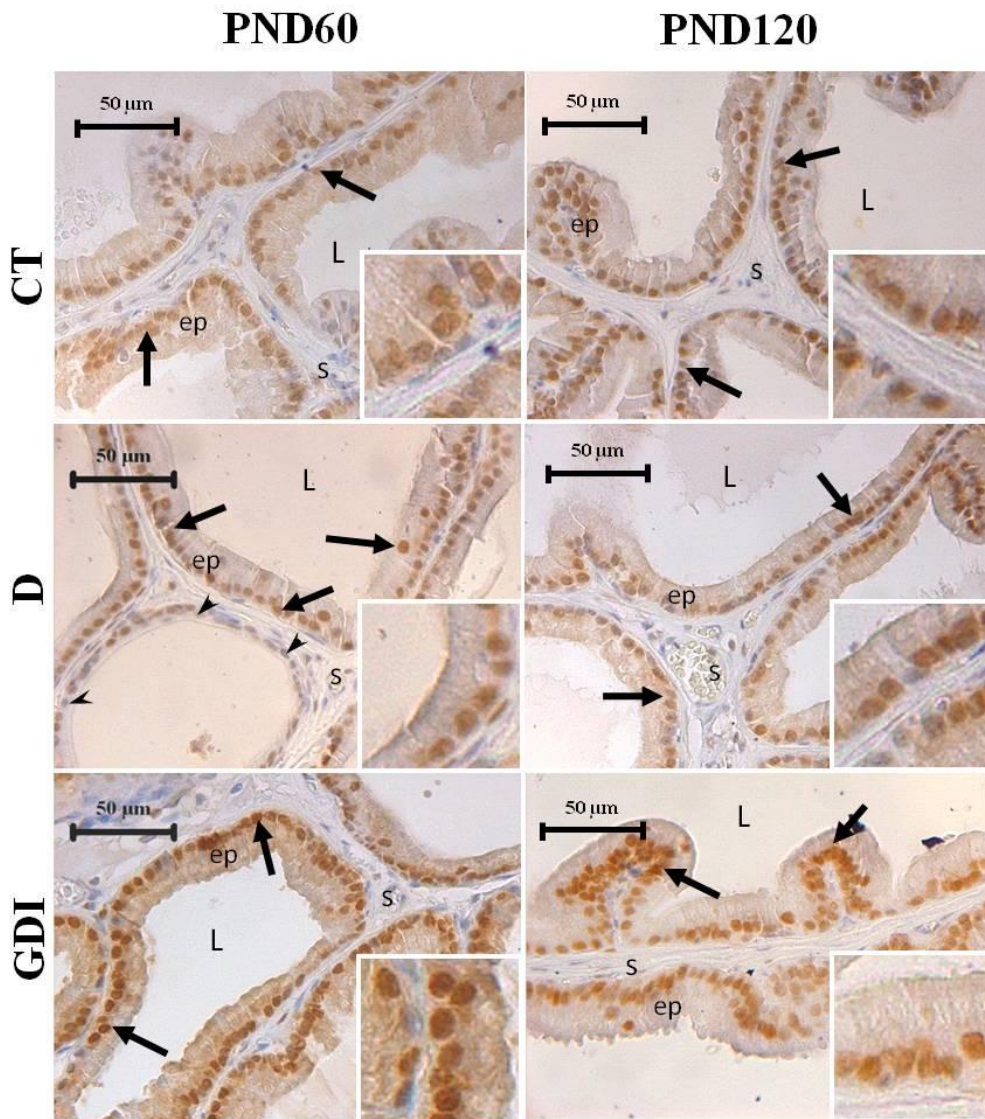
Figure 9. Representative Western blotting analyses of prostatein expression in the rat ventral prostate from the control (CT), gestational diabetes (D) and gestational diabetes plus insulin replacement (GDI) groups at PND60 and PND120. B) Densitometric analysis of the prostatein bands. Asterisks (*) means statistical difference in relation to CT group with $p < 0.05$.

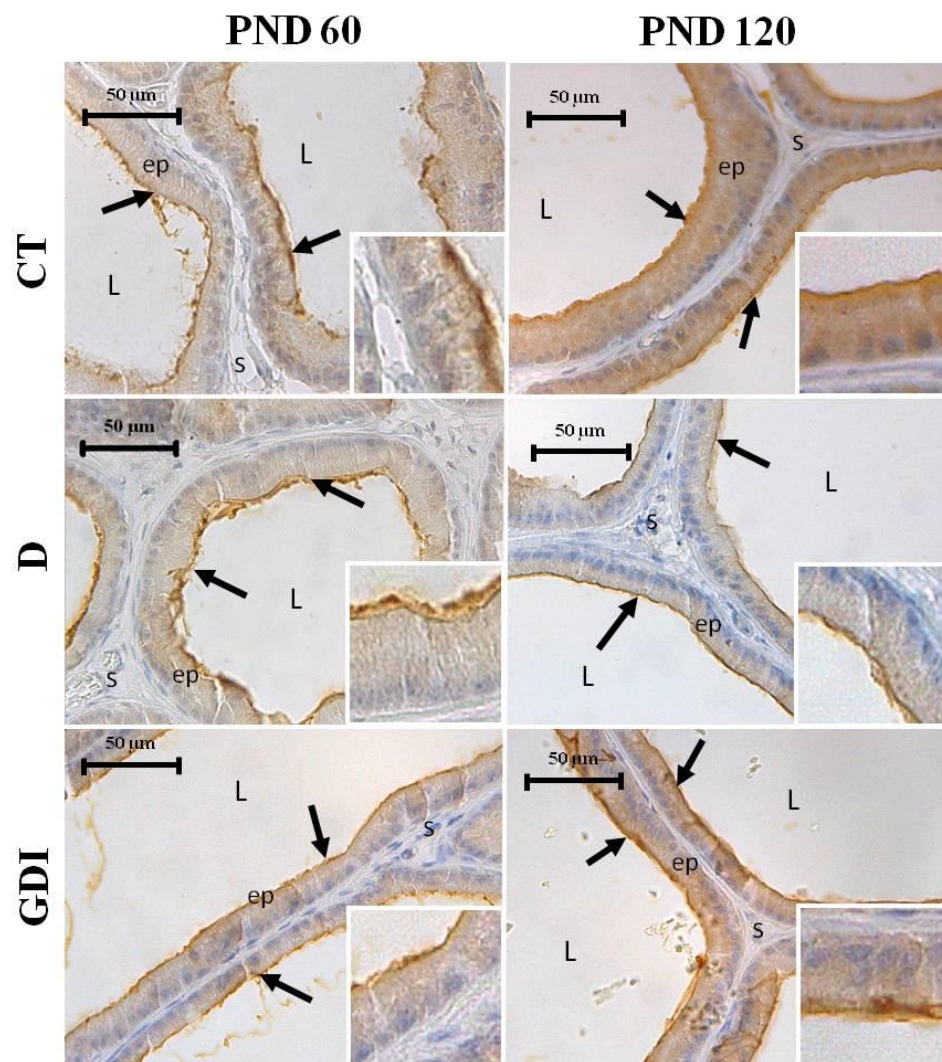


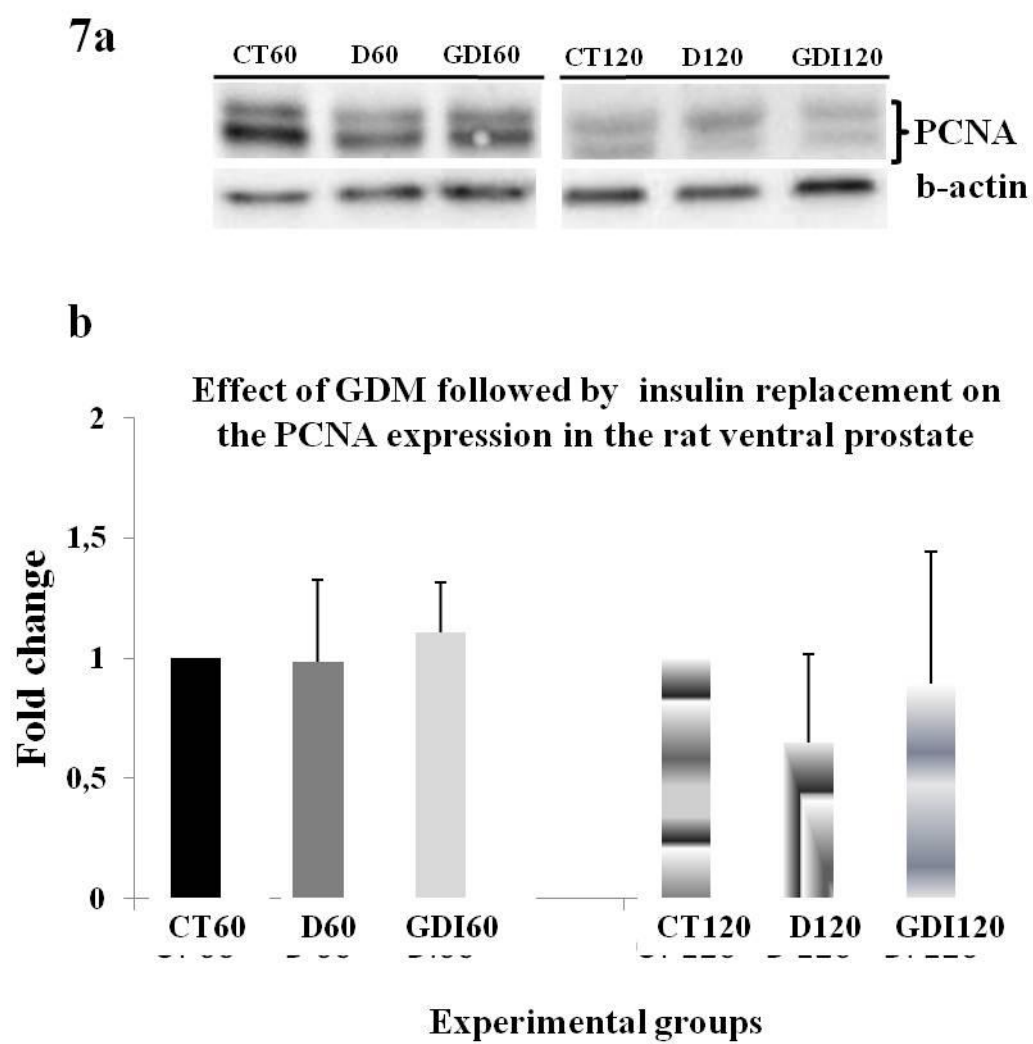


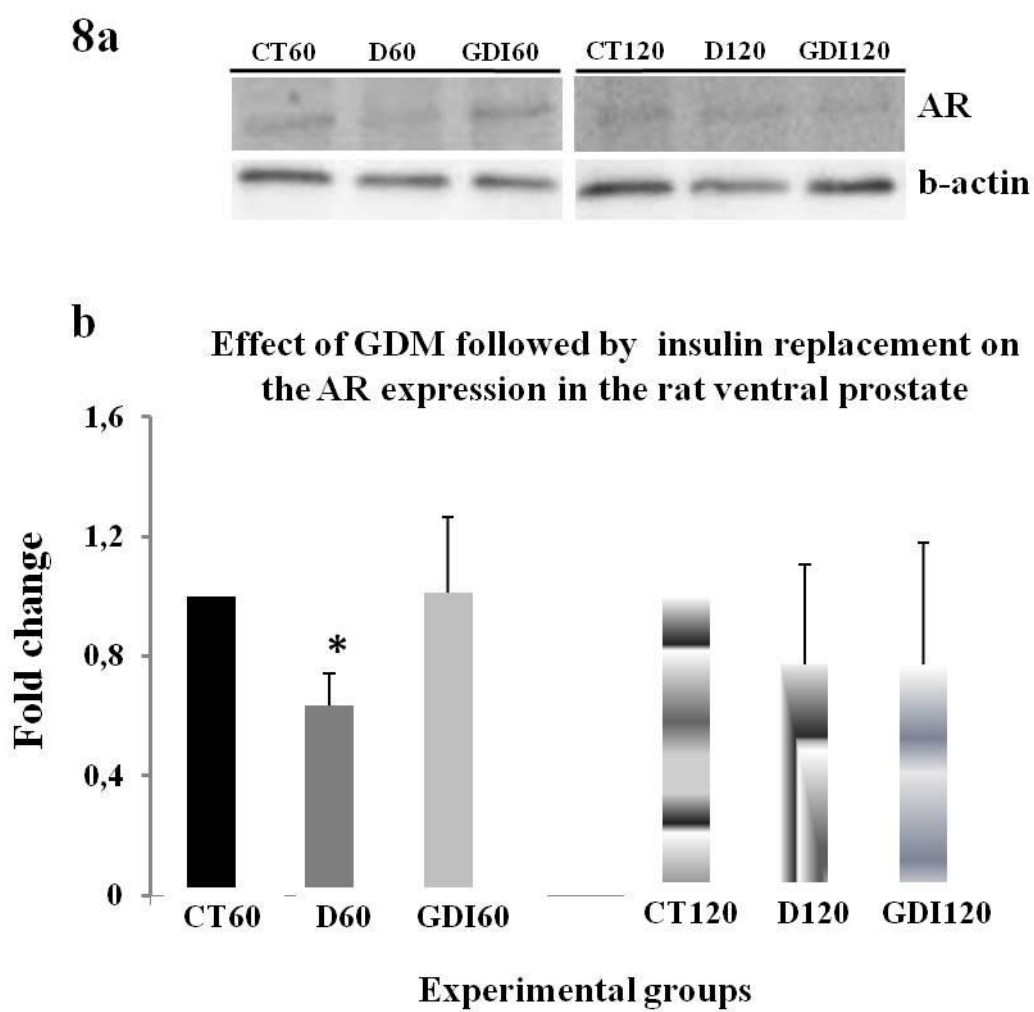




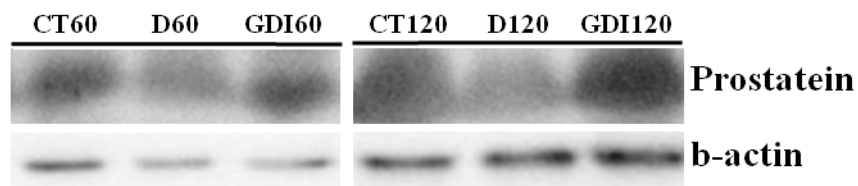






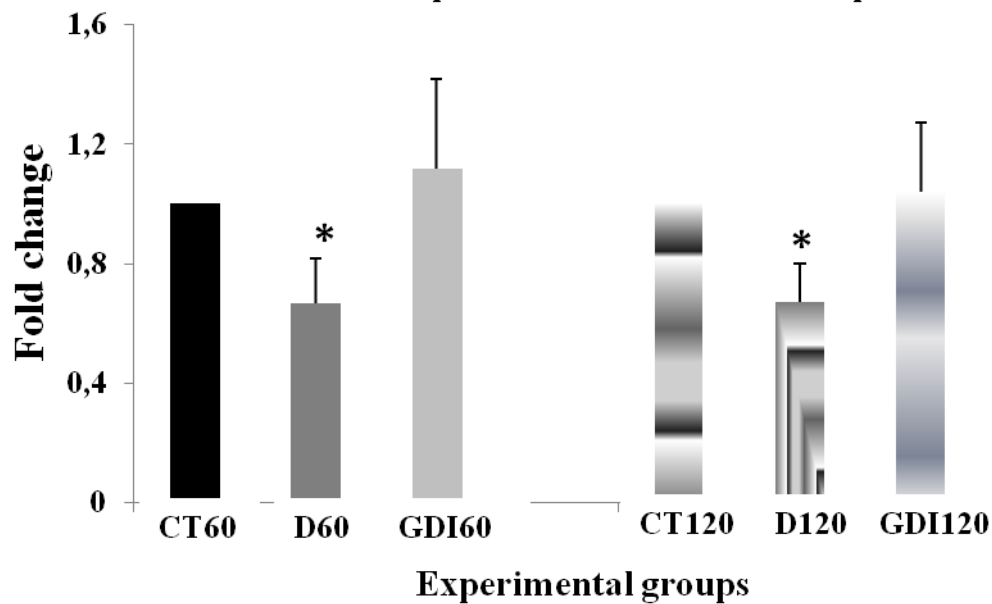


9a



b

Effect of GDM followed by insulin replacement on the Prostatein expression in the rat ventral prostate



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ALI, S.T.; SHAIKH, R.N.; SIDDIQI, N.A.; SIDDIQI, P.Q. Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Arch Androl.*, v. 30(1), p. 47-54, Jan-Feb. 1993.

AL-MUTAIRI, H.F.; MOHSEN, A.M.; AL-MAZIDI, Z.M. Genetics of type I diabetes. **Kuwait Med J.**, v. 39, p. 107-15, 2007.

ALTAY, B.; CETINKALP, S.; DOGANAVŞARGIL, B.; HEKIMGIL, M., SEMERCI, B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. **Fertil Steril.**, v. 80, p. 828-31, Sep. 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 36, p. 67-74, Jan. 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. **Diabetes Care.**, v. 31(3), p. 596-615, Mar, 2008. Erratum in *Diabetes Care*, v. 31(6), p. 1271, Jun. 2008.

AUGUSTO, T. M.; FELISBINO, S. L.; CARVALHO, H. F. Remodeling of rat ventral prostate after castration involves heparanase-1. **Cell Tissue Res**, v. 332, n. 2, p. 307-15, May 2008.

AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. **Int Rev Cytol**, v. 121, p. 127-231, 1990.

BARKER, D.J.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, ME.; Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. **BMJ**, v. 298, n. 6673, p. 564-7, Mar 1989.

BACCETTI, B.; LA MARCA, A.; PIOMBONI, P.; CAPITANI, S.; BRUNI, E.; PETRAGLIA, F.; DE LEO, V. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Hum Reprod.**, v. 17(10), p. 2673-7, Oct. 2002.

BALSELLS, M.; CORCOY, R.; MAURICIO, D.; MORALES, J.; GARCÍA-PATTERSON, A.; CARRERAS, G.; PUIG-DOMINGO, M.; DE LEIVA, A. Insulin antibody response to a short course of human insulin therapy in women with gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 20(7), p. 1172-5, Jul. 1997.

BARTÁK, V.; JOSÍFKO, M.; HORÁCKOVÁ, M. Juvenile diabetes and human sperm quality. **Int J Fertil.**, v. 20(1), p. 30-2, 1975.

BERLIN, C.M.; BRIGGS, G.G. Drugs and chemicals in human milk. **Semin Fetal Neonatal Med.**, v. 10(2), p. 149-59, Apr. 2005.

BERRY, P. A.; MAITLAND, N. J.; COLLINS, A. T. Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 288, n. 1-2, p. 30-7, Jun 2008

BOSLAND, M. C. Chemical and hormonal induction of prostate cancer in animal models. **Urol Oncol**, v. 2, n. 4, p. 103-10, 1996 Jul-Aug 1996.

BUCHANAN, T.A.; METZGER, B.E.; FREINKEL, N.; BERGMAN, R.N. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 162(4), p. 1008-14, Apr. 1990.

BUCHANAN, T.A.; XIANG, A.H.; PAGE, K.A. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 8(11), p. 639-49, Nov. 2012.

CAGNON, V.H.; CAMARGO, A.M.; ROSA, R.M.; FABIANI, R.; PADOVANI, C.R.; MARTINEZ, F.E. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C57BL/6J). **Tissue Cell.**, v. 32(4), p. 275-83, Aug. 2000.

CARVALHO, C.A.; CAMARGO, A.M.; CAGNON, V.H.; PADOVANI, C.R. Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of C57BL/6J and NOD mice. **Anat Rec a Discov Mol Cell Evol Biol.**, v. 270(2), p. 129-36, Feb. 2003.

CASSON, I.F.; CLARKE, C.A.; HOWARD, C.V.; MCKENDRICK, O.; PENNYCOOK, S.; PHAROAH, P.O.; PLATT, M.J.; STANISSTREET, M.; VAN VELSZEN, D.; WALKINSHAW, S. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. **BMJ.**, v. 2;315(7103), p. 275-8, Aug. 1997.

CHAN, J.C.; MALIK, V.; JIA, W.; KADOWAKI, T.; YAJNIK, C.S.; YOON, K.H.; HU, F.B. Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. **JAMA.**, v. 27;301(20), p. 2129-40, May. 2009.

CHEN, L.; MAGLIANO, D.J.; ZIMMET, P.Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 8(4), p. 228-36, Nov. 2011.

CHEN, M.; BERGMAN, R.N.; PORTE D, J.R. Insulin resistance and beta-cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 67(5), p. 951-7, Nov. 1988.

CHUNG, L.W.; BASEMAN, A.; ASSIKIS, V.; ZHAU, HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. **J Urol**, v. 173, n. 1, p. 10-20, Jan 2005.

COLOSIA, A.D.; PALENCIA, R.; KHAN, S. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies: a systematic literature review. **Diabetes Metab Syndr Obes.**, v. 19(6), p. 327-38, Sep. 2013.

CRUME, T.L.; OGDEN, L.; DANIELS, S, *et-al.* The impact of in utero exposure to diabetes on childhood body mass index growth trajectories: the EPOCH study. **J Pediatr**, v 158, p 941-946, Jun, 2011.

CUNHA, G.R.; DONJACOUR, A.A.; COOKE, P.S.; MEE, S.; BIGSBY, R.M.; HIGGINS, S.J.; *et al.* The endocrinology and developmental biology of the prostate. **Endocr Rev**, v. 8, n. 3, p. 338-62, Aug 1987.

CUNHA, G.R.; RICKE, W.; THOMSON, A.; MARKER, P.; RISBRIDGER, G.; HAYWARD, S.W.; *et al.* Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 92, n. 4, p. 221-36, Nov 2004.

CUNHA, G. R.; BIGSBY, RM.; COOKE, P.S.; SUGIMURA, Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs. **Cell Differ**, v. 17, n. 3, p. 137-48, Sep 1985.

DABELEA, D.; MAYER-DAVIS, EJ.; LAMICHHANE, AP.; D'AGOSTINO, RB. JR.; LIESE, A.D.; VEHIK, KS.; NARAYAN, KM.; ZEITLER, P.; HAMMAN RF. Association of intrauterine exposure to maternal diabetes and obesity with type 2 diabetes in youth: the SEARCH Case-Control Study. **Diabetes Care**, v. 31, n. 7, p. 1422-6, Jul 2008.

DANAELI, G.; FINUCANE, M.M.; LU, Y.; SINGH, G.M.; COWAN, M.J.; PACIOREK, C.J.; LIN, J.K.; FARZADFAR, F.; KHANG, Y.H. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v. 2, p. 31-40, Jul. 2001.

DASGUPTA, A.; SAXENA, R. Regulatory T cells: a review. **Natl Med J India**, v. 25(6), p. 341-51, Nov-Dec. 2012.

DEFRONZO, R.A. Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. **Diabetes**, v. 28(12), p. 1095-101, Dec. 1979.

DEFRONZO, R.A.; BERGENSTAL, R.M. "Effective insulin therapy in *International Textbook of Diabetes Mellitus*, **JohnWiley & Sons**, v. 3, p. 995–1015, 2004.

DÖRNER, G; PLAGEMANN, A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. **Horm Metab Res**, v 26, p 213-221, May, 1994.

DURNWALD, C.P. Insulin Analogues in the Treatment of Gestational Diabetes Mellitus. **Clin Obstet Gynecol.**, Sep. 2013.

EL BABA, K.; AZAR, S.T. Low testosterone and diabetes. **Curr Diabetes Rev.**, v. 9(5), p. 418-21, Sep. 2013.

EURODIAB ACE STUDY GROUP. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. **Lancet**, v. 11, p. 873-6. Mar 2000.

ERIKSSON, U.J. Congenital anomalies in diabetic pregnancy. **Semin Fetal Neonatal Med.**, v. 14(2), p. 85-93, Apr. 2009.

FONTBONNE, A.; ESCHWÈGE, E.; CAMBIEN, F.; RICHARD, J.L.; DUCIMETIÈRE, P.; THIBULT, N.; WARNET, J. M.; CLAUDE, J.R.; ROSSELIN, G.E. Hypertriglyceridaemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. **Diabetologia**, v. 32, p. 300-4, May. 1989.

GARCÍA-PATTERSON, A.; ERDOZAIN, L.; GINOVART, G.; ADELANTADO, J.M.; CUBERO, J.M.; GALLO, G.; DE LEIVA, A.; CORCOY, R. In human gestational diabetes mellitus congenital malformations are related to pre-pregnancy body mass index and to severity of diabetes. **Diabetologia**, v. 47(3), p. 509-14, Mar. 2004.

GOBBO, M.G.; TABOGA, S.R.; RIBEIRO, D.L.; GÓES, R.M. Short-term stromal alterations in the rat ventral prostate following alloxan-induced diabetes and the influence of insulin replacement. **Micron**, v. 43(2-3), p. 326-33, Feb. 2011.

GODFREY, K.M.; GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 21(4), p. 199-205, Apr. 2010.

GOODYEAR, L.J.; KAHN, B.B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annu Rev Med.**, v.49, p. 235-61, Feb. 1998.

HALE, S.A.; CAPUCO, A.V.; ERDMAN, R.A. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. **J Dairy Sci.**, v. 86(6), p. 2061-71, Jun. 2003.

HANDELSMAN, D.J.; CONWAY, A.J.; BOYLAN, L.M.; YUE, D.K.; TURTLE, J.R. Testicular function and glycemic control in diabetic men. A controlled study. **Andrologia**, v. 17(5), p. 488-96, Sep. 1985.

HAWTHORNE, G.; ROBSON, S; RYALL, E.A.; SEN, D.; ROBERTS, S.H; WARD PLATT, M.P. Prospective population based survey of outcome of pregnancy in diabetic women: results of the Northern Diabetic Pregnancy Audit, 1994. **BMJ.**, v. 315(7103), p. 279-81, Aug. 1997.

HAYASHI N, SUGIMURA Y, KAWAMURA J, DONJACOUR AA, CUNHA GR. HAYASHI, N. *et al.* Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biol Reprod**, v. 45, n. 2, p. 308-21, Aug 1991.

HAYWARD, S. W.; ROSEN, M. A.; CUNHA, G. R. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. **Br J Urol**, v. 79 Suppl 2, p. 18-26, Apr 1997.

HU, W. Y. *et al.* Estrogen-initiated transformation of prostate epithelium derived from normal human prostate stem-progenitor cells. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2150-63, Jun 2011.

HUANG, L.; PU, Y.; HU, WY.; BIRCH, L.; LUCCIO-CAMELO, D.; YAMAGUCHI, T, PRINS, GS. The role of Wnt5a in prostate gland development. **Dev Biol**, v. 328, n. 2, p. 188-99, Apr 2009

HUDSON, D. L. *et al.* Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. **J Histochem Cytochem**, v. 49, n. 2, p. 271-8, Feb 2001.

HUMMEL, S.; PFLÜGER, M.; KREICHAUF, S.; HUMMEL, M.; ZIEGLER, A.G. Predictors of overweight during childhood in offspring of parents with type 1 diabetes: Response to Rodekamp *et al.* **Diabetes Care.**, v. 32(11), p. 139, Nov. 2009.

International Diabetes Federation, Diabetes Atlas. 5th- Edition, 2012. Disponível em: < http://www.diabetes.org.br/images/5E_IDFAtlasPoster_2012_EN.pdf >. Acesso em: 03 Out. 2013.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 12^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAHN, C.R.; CRETZAZ, M. Insulin receptors and the molecular mechanism of insulin action. **Diabetes Metab Rev.**, v. 1(1-2), p. 5-32, 1985.

KING, T.S.; ROHRBACH, D.H. Reduced aminergic synthesis in the hypothalamus of the infertile, genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) male mouse. **Exp Brain Res.**, v. 81(3), p. 619-25, 1990.

KOLODNY, R.C.; KAHN, C.B.; GOLDSTEIN, H.H.; BARNETT, D.M. Sexual dysfunction in diabetic men. **Diabetes.**, v. 23(4), p. 306-9, Apr. 1974.

KOPELMAN, P.G.; ALBON, L. Obesity, non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. **Br Med Bull.**, v. 53(2), p. 322-40, 1997.

KUZUYA, T.; NAKAGAWA, S.; SATOH, J.; KANAZAWA, Y.; IWAMOTO, Y.; KOBAYASHI, M.; NANJO, K.; SASAKI, A.; SEINO, Y.; ITO, C.; SHIMA, K.; NONAKA, K.; KADOWAKI, T. Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 55(1), p. 65-85, Jan. 2002.

LA VIGNERA, S.; CALOGERO, A.E.; CONDORELLI, R.; LANZAFAME, F.; GIAMMUSSO, B.; VICARI, E. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. **Minerva Endocrinol.**, v. 34(1), p. 1-9, Mar. 2009.

LANGLEY-EVANS, S. C.; MCMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. **Med Princ Pract**, v. 19, n. 2, p. 87-98, 2010.

LAWLOR, D.A; LICHTENSTEIN, P; LANGSTROM, N. Association of maternal diabetes mellitus in pregnancy with offspring adiposity into early adulthood: sibling study in a prospective cohort of 280,866 men from 248,293 families. **Circulation**, v. 123, p. 258-265, Jan. 2011.

LEE, C.; SENSIBAR, JA.; DUDEK, SM.; HIIPAKKA, RA.; LIAO, ST. Prostatic

ductal system in rats: regional variation in morphological and functional activities. **Biol Reprod**, v. 43, n. 6, p. 1079-86, Dec 1990.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 40, n. 3, p. 565-75, viii-ix, Sep 2011.

LORENZONI, F.; GIAMPIETRI, M.; FERRI, G.; LUNARDI, S.; MADRIGALI, V.; BATTINI, L.; BOLDRINI, A.; GHIRRI, P. Lutein administration to pregnant women with gestational diabetes mellitus is associated to a decrease of oxidative stress in newborns. **Gynecol Endocrinol.**, v. 29(10), p. 901-3, Oct. 2013.

LUCE, S.; BRIET, C.; BÉCOURT, C.; LEMONNIER, F.; BOITARD, C. The targeting of β -cells by T lymphocytes in human type 1 diabetes: clinical perspectives. **Diabetes Obes Metab.** v. 3, p. 89-97, Sep. 2013.

LUKACS, R. U. *et al.* Isolation, cultivation and characterization of adult murine prostate stem cells. **Nat Protoc**, v. 5, n. 4, p. 702-13, Apr 2010.

MA, R.C.; CHAN, J.C.; TAM, W.H.; HANSON, M.A.; GLUCKMAN, P.D. Gestational diabetes, maternal obesity, and the NCD burden. **Clin Obstet Gynecol.**, v. 56(3), p. 633-41, Sep. 2013.

MAAYAN-METZGER, A.; LUBIN, D.; KUINT, J. Hypoglycemia rates in the first days of life among term infants born to diabetic mothers. **Neonatology**. v. 96(2), p. 80-5, Feb. 2009.

MAJOR, C.A.; HENRY, M.J.; DE VECIANA, M.; MORGAN, M.A. The effects of carbohydrate restriction in patients with diet-controlled gestational diabetes. **Obstet Gynecol.**, v. 91(4), p. 600-4, Apr. 1998.

MARKER, P. C. *et al.* Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. **Dev Biol**, v. 253, n. 2, p. 165-74, Jan 2003.

MCNEAL, J.E. Normal histology of the prostate. **J. Surg Pathol.**, v. 12(8), p. 619-33, Aug. 1988.

METZGER; B.E.; LOWE, L.P.; DYER, A.R.; TRIMBLE, E.R.; SHERIDAN, B.; HOD, M.; CHEN, R.; YOGEV, Y.; COUSTA, D.R.; CATALANO, P.M.; GILES, W.; LOW, J.; HADDEN, D.R.; PERSSON, B.; OATS, J.J. Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations with neonatal anthropometrics. **Diabetes**, v. 58(2), p. 453-9, Feb. 2009.

MIKI, J. Investigations of prostate epithelial stem cells and prostate cancer stem cells. **Int J Urol**, v. 17, n. 2, p. 139-47, Feb 2010.

MORAN, A; JACOBS, D.R.Jr; STEINBERGER, J; HONG, C.P; PRINEAS, R; LUEPKER, R; SINAIKO, A.R. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. **Diabetes**, v. 48(10), p. 2039-44, Oct. 1999.

Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. **Biol Reprod**, v. 45, n. 2, p. 308-21, Aug 1991.

MULHOLLAND, J; MALLIDIS, C; AGBAJE, I; MCCLURE, N. Male diabetes mellitus and assisted reproduction treatment outcome. **Reprod Biomed Online**, v. 22(2), p. 215-9, Feb. 2011.

NEMETH, J.A; LEE, C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. **Prostate**, v. 28(2), p. 124-8, Feb. 1996.

NIVEN, M.J; HITMAN, G.A; BADENOCH, D.F. A study of spermatozoal motility in type 1 diabetes mellitus. **Diabet Med**, v. 12(10), p. 921-4, Oct. 1995.

NOMURA, R.M.Y; COSTA, V.N; SAKAMOTO, K; MAGANHA, C.A; MIYADAHIRA, S; ZUGAIB, M. Cardiocografia computadorizada em gestações complicadas pelo diabete melito pré-gestacional: padrões da frequência cardíaca em fetos grandes para a idade gestacional **Rev. Bras. Ginecol Obstet**, v. 27(12), Dec. 2005.

PADILHA, P.C; SAUNDERS, C; MACHADO, C.R.M; SILVA, C.L; BULL, A; SALLY, E.O.F; ACCIOLY, E. Associação entre o estado nutricional pré-gestacional e a predição do risco de intercorrências gestacional. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, v. 29(10), Oct. 2007.

PEI, L; YANG, G; JIANG, J; JIANG, R; DENG, Q; CHEN, B; GAN, X. Expression of Aquaporins in Prostate and Seminal Vesicles of Diabetic Rats. **J Sex Med**, v. 10(12), p. 2975- 85, Dec. 2013.

PETTITT, D.J; LAWRENCE, J.M; BEYER, J; HILLIER, T.A; LIESE, A,D; MAYER-DAVIS, B; LOOTS, B; IMPERATORE, G; LIU, L; DOLAN, L.M; LINDER, B; DABELEA, D. Association between maternal diabetes in utero and age at offspring's diagnosis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 31(11), p. 2126-30, Nov. 2008.

PETTITT, D.J; NELSON, R.G; SAAD, M.F, Et-al. Diabetes and obesity in the offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. **Diabetes Care**, v. 16, p. 310-314, Jan. 1993.

POCIOT, F; MCDERMOTT, M.F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. **Genes Immun**, v. 3(5), p. 235-49, Aug. 2002.

PORTO, E. M; DOS SANTOS SA; RIBEIRO, L. M; LACORTE, L.M; RINALDI, J.C; JUSTULIN, L.A.Jr; FELISBINO, S.L. Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. **Microsc Res Tech**, v. 74(11), p. 1040-8, Nov. 2011.

PRINS GS, BIRCH L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. **Endocrinology**, v. 136,

n. 3, p. 1303-14, Mar 1995.

PRINS, G.S.; COOKE, P.S.; BIRCH, L.; DONJACOUR, A.A.; YALCINKAYA, T.M.; SIITERI, P.K.; CUNHA, G.R. Androgen receptor expression and 5 alpha-reductase activity along the proximal-distal axis of the rat prostatic duct. **Endocrinology**, v. 130, n. 5, p. 3066-73, May 1992.

PRINS, G. S.; BIRCH, L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. **Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 1303-14, Mar 1995.

PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 641-59, Jul 2008.

QASEM, R. J. *et al.* Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. **Physiol Behav**, v. 105, n. 5, p. 1182-93, Mar 2012.

RAMACHANDRAN, S; SARAF, S; SHETTY, C; CAPPS, N; BAILEY, C. Paradoxical decrease in HDL-cholesterol and apolipoprotein A1 with simvastatin and atorvastatin in a patient with type 2 diabetes. **Ann Clin Biochem**, v. 48(Pt1), p. 75-8, Jan. 2011.

REYNOLDS, A. R.; KYPRIANOU, N. Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 2, p. S144-52, Feb 2006.

RIBEIRO, D.L; CALDEIRA, E.J; CÂNDIDO, E.M; MANZATO, A.J; TABOGA, S.R; CAGNON, V.H. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. **Eur J Histochem**, v. 50(1), p. 51-60, Jan-Mar. 2006.

ROY-BURMAN, P; WU, H; POWELL, W.C; HAGENKORD, J; COHEN, M.B. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development. **Endocr Relat Cancer**, v. 11(2), p. 225-54, Jun. 2004.

RYU, J.K; KIM, D.J; LEE, T; KANG, Y.S; YOON, S.M; SUH, J.K. The role of free radical in the pathogenesis of impotence in streptozotocin-induced diabetic rats. **Yonsei Med J**, v. 44(2), p. 236-41, Apr. 2003.

SAITO, F.H; DAMASCENO, D.C; KEMPINAS, W.G; MORCELI, G; SINZATO, Y.K; TAYLOR, K.N; RUDGE, M.V. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. **Diabetol Metab Syndr**, v. 23, p. 26, Apr. 2010.

SCARANO, W.R; MESSIAS, A.G; OLIVA, S.U; KLINEFELTER, G.R; KEMPINAS, W.G. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. **Int J Androl**, v. 29(4), p. 482-8, Aug. 2006.

SCHAEFER-GRAF, U.M; BUCHANAN, T.A; XIANG, A; SONGSTER, G; MONTORO, M; KJOS, S.L. Patterns of congenital anomalies and relationship to initial maternal fasting glucose levels in pregnancies complicated by type 2 and gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 182(2), p. 313-20, Feb. 2000.

SCHAUER IG, ROWLEY, DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. **Differentiation**, v. 82, n. 4-5, p. 200-10, 2011 Nov-Dec 2011.

SHABSIGH, A.; TANJI, N.; D'AGATI, V.; BURCHARDT, T.; BURCHARDT, M.; HAYEK, O.; SHABSIGH, R.; BUTTYAN, R.; Vascular anatomy of the rat ventral prostate. **Anat Rec**, v. 256, n. 4, p. 403-11, Dec 1999.

STEGER, R.W; KIENAST, S.G. Effect of continuous versus delayed insulin replacement on sex behavior and neuroendocrine function in diabetic male rats. **Diabetes**, v. 39(8), p. 942-8, Aug. 1990.

TABOGA, S. R.; VILAMAIOR, P. S.; GÓES, R. M. [Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structural biology]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 8, p. 946-55, Nov 2009.

TAKEDA, H.; LASNITZKI, I.; MIZUNO, T. Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. **J Endocrinol**, v. 110, n. 3, p. 467-70, Sep 1986.

TAKEDA, H.; SUEMATSU, N.; MIZUNO, T. Transcription of prostatic steroid binding protein (PSBP) gene is induced by epithelial-mesenchymal interaction. **Development**, v. 110, n. 1, p. 273-81, Sep 1990. ISSN 0950-1991

TAM, W.H; MA, R.C; YANG, X; LI, A.M; KO, G.T; KONG, A.P; LAO, T.T; CHAN, M.H; LAM, C.W; CHAN, J.C. Glucose intolerance and cardiometabolic risk in adolescents exposed to maternal gestational diabetes: a 15-year follow-up study. **Diabetes Care**, v. 33(6), p. 1382-4, Jun. 2010.

TANNUS, L.R; OLIVEIRA, D.S; MATHEUS, A.S; CUNHA, E.F; GOMES, M.B. Early infancy onset of type 1A diabetes mellitus in dizygotic twins: association with genetic and environmental factors. [Article in Portuguese] **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 51(1), p. 142-5, Feb. 2007.

TIMMS, B. G.; HOFKAMP, L. E. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. **Differentiation**, v. 82, n. 4-5, p. 173-83, 2011 Nov-Dec 2011.

TIMMS, B. G.; MOHS, T. J.; DIDIO, L. J. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. **J Urol**, v. 151, n. 5, p. 1427-32, May 1994.

TUXHORN, J. A.; AYALA, G. E.; ROWLEY, D. R. Reactive stroma in prostate cancer progression. **J Urol**, v. 166, n. 6, p. 2472-83, Dec 2001

VALKENBURG, K.C.; WILLIAMS, B.O. Mouse models of prostate cancer. **Prostate Cancer**, Feb. 2011.

VIGNON, F; LE FAOU, A; MONTAGNON, D; PRADIGNAC, A; CRANZ, C; WINISZEWSKY, P; PINGET, M. Comparative study of semen in diabetic and healthy men. **Diabete Metab**, v. 17(3), p. 350-4, May-Jun. 1991.

VIKRAM, A; JENA, G.B; RAMARAO, P. Insulin-resistance and benign prostatic hyperplasia: the connection. **Eur J Pharmacol**, v. 641(2-3), p. 75-81, Sep. 2010.

VILAMAIOR, P.S.; FELISBINO, S.L.; TABOGA, S.R.; CARVALHO, H.F.; Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. **Prostate**, v. 45, n. 3, p. 253-8, Nov 2000.

WANG, MC.; VALENZUELA, LA.; MURPHY, GP.; CHU, TM.; Purification of a human prostate specific antigen. **Invest Urol**, v. 17, n. 2, p. 159-63, Sep 1979

WANG, Z.; LUQUE, RM.; KINEMAN, RD.; RAY, V.H.; CHRISTOV, K.T.; LANTVIT, D.D.; SHIRAI, T.; HEDAYAT, S.; UNTERMAN, TG.; BOSLAND, MC.; PRINS, G.S.; SWANSON, S.M.; Disruption of growth hormone signaling retards prostate carcinogenesis in the Probasin/TAg rat. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1366-76, Mar 2008.

WELSH, M.; SAUNDERS, PT.; FISKEN, M.; SCOTT, H.M.; HUTCHISON, G.R.; SMITH, L.B.; SHARPE, R.M.; Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1479-90, Apr 2008.

WHITMORE, T.J; TRENGOVE, N.J; GRAHAM, D.F; HARTMANN, P.E. Analysis of insulin in human breast milk in mothers with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Int J Endocrinol**, v. 2012, Dec. 2011.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 309-CEEA, sobre “Efeito do diabetes sobre a morfologia prostática”, sob a responsabilidade de **Sérgio Luis Felisbino**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “Ad referendum” da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)**, nesta data.

Botucatu, 17 de maio de 2011.

Prof^o Dr^a Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente da CEEA