

AMÉLIA ARCÂNGELA TEIXEIRA TRINDADE

**ALTERAÇÕES TESTICULARES NO DIABETES
ALOXÂNICO NO RATO
ESTUDO MORFOMÉTRICO E ULTRAESTRUTURAL
DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em “Bases Gerais da Cirurgia” – Área de Concentração em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplantes de Tecidos e Órgãos, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Adjunta Célia Sperandéo Macedo

Co-orientador: Prof. Adjunto Cesar Tadeu Spadella

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

2010

AMÉLIA ARCÂNGELA TEIXEIRA TRINDADE

**ALTERAÇÕES TESTICULARES NO DIABETES
ALOXÂNICO NO RATO
ESTUDO MORFOMÉTRICO E ULTRAESTRUTURAL
DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em “Bases Gerais da Cirurgia” – Área de Concentração em Agressão, Reparação, Regeneração e Transplantes de Tecidos e Órgãos, da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Adjunta Célia Sperandéo Macedo

Co-orientador: Prof. Adjunto César Tadeu Spadella

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Trindade, Amélia Arcângela T.

Alterações testiculares no diabetes aloxânico no rato. Estudo morfológico e ultraestrutural dos túbulos seminíferos / Amélia Arcângela Teixeira Trindade. - Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Célia Sperandéo Macedo

Capes: 40101002

1. Diabetes Mellitus - Estudos experimentais 2. Testículos

Palavras-chave: Aloxona; Diabetes Mellitus; Testículos; Túbulos seminíferos

Dedicatórias

Dedico este trabalho a minha mãe Maria do Carmo e ao meu pai Francisco pela eterna presença e pelo enorme carinho com que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

Homenagens

Homenagem - I

A Profa. Célia Sperandéo Macedo cuja firmeza na orientação me fez seguir em frente na realização deste trabalho.

Homenagem - II

Ao Prof. César Tadeu Spadella pelo profissionalismo, apoio na execução do experimento e pela co-orientação deste trabalho.

Agradecimientos

Agradecimentos

Minha profunda gratidão a **todos** que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho. Em especial:

À Bióloga Amanda Natália Lucchesi pelo auxílio constante no seguimento dos animais e procedimentos experimentais.

Ao Prof. Dr. Reinaldo José Silva do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências – UNESP, pela disponibilização do microscópio ótico conectado a sistema computadorizado para o estudo morfométrico do trabalho e sugestões de parte da análise estatística dos dados.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani do Departamento de Estatística do Instituto de Biociências – UNESP, pela análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Luciano Anjos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências – UNESP, pelo auxílio no estudo morfométrico.

A Prof^a. Maria de Fátima Mucheroni, matemática, pelo auxílio nos conceitos matemáticos dos cálculos para o estudo morfométrico.

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FMB – UNESP, em particular a Danilo Chaguri e Danilo César Borsatto pela manutenção do laboratório e dos animais.

À Bióloga do Departamento de Pediatria da FMB – UNESP, Cilmary Suemi Kurokawa pelo auxílio na conservação do material obtido no experimento

Ao funcionário do Departamento de Pediatria da FMB – UNESP, Paulo Cesar Lopes pelo inestimável auxílio na digitalização das fotos e digitação de todo o trabalho.

Às Sras. Maria Helena Moreno e Claudete dos Santos Tardivo, funcionárias do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências – UNESP, pela preparação do material para análise ao microscópio eletrônico.

À Sra. Luciana Pizzani, funcionária da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação do Campus de Botucatu – UNESP, pela orientação quanto à apresentação das referências bibliográficas e à Sra. Selma Maria de Jesus pela confecção da ficha catalográfica.

Índice

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

01

1. Definição 01
2. Aspectos gerais 02
3. Aparelho reprodutor masculino e diabetes 03
4. Estudo das lesões testiculares em animais 06
5. Parênquima testicular 07

OBJETIVO

14

MATERIAL E MÉTODOS

15

1. Animais utilizados 15
2. Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções 15
3. Distribuição e sorteio dos animais 16
4. Grupos experimentais 16
5. Momentos de avaliação e sacrifício 16
6. Parâmetros analisados 17
7. Técnicas utilizadas 18
 - 7.1. Anestesia, coleta de sangue e sacrifício 18
 - 7.2. Obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais 18
 - 7.3. Indução do diabetes experimental 19
 - 7.4. Exames laboratoriais 20
 - 7.5. Exérese dos testículos pós-morte 20
 - 7.6. Exame morfológico e morfométrico à MO 20
 - 7.7. Análise ultraestrutural 22
8. Análise Estatística 24

RESULTADOS

25

1. Achados clínicos e laboratoriais 25
2. Análise morfométrica dos túbulos seminíferos (MO) 28
3. Análise ultraestrutural dos túbulos seminíferos (ME) 37
 - 3.1. Ratos sacrificados com 1 mês de seguimento 37
 - 3.2. Ratos sacrificados com 6 meses de seguimento 37
 - 3.3. Ratos sacrificados com 12 meses de seguimento 38

DISCUSSÃO	45
1- Quanto ao estudo morfométrico	45
2- Quanto ao estudo à microscopia eletrônica	48
CONCLUSÕES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	63

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – O LHRH liberado no hipotálamo age sobre a hipófise que libera FSH e LH que atuam na célula de Sertoli e Leydig, estimulando a síntese e liberação de inibina e testosterona que atuam como feedback negativo na hipófise e hipotálamo. 9
-
- Figura 2** – Representação do túbulo seminífero mostrando o hormônio folículo-estimulante (FSH) e a testosterona (T) agindo nas células de Sertoli que produzem a proteína de ligação do androgênio (ABP) e inibina e, as células germinativas até a liberação de espermatozóides dentro do lúmen. (MacClure, RD. Endocrine investigations and therapy. Urol Clin North AM. 1987; 14:471-88. 10
-
- Figura 3** – Representação de corte transversal de um túbulo seminífero mostrando uma única célula de Sertoli em contato com diferentes tipos de células espermatogênicas. Célula de Leydig no espaço intersticial em contato com vasos sanguíneos. 11
[HTTP://faculty.washington.edu/kepeter/118photos/testes_cells.jpg](http://faculty.washington.edu/kepeter/118photos/testes_cells.jpg)
-
- Figura 4** – Representação do processo de espermatogênese. Inicia-se com espermátide arredondada, ocorre a diferenciação e o resultado final é a formação de um espermatozóide. 12
[HTTP://faculty.washington.edu/kepeter/118photos/sperm-development.jpg](http://faculty.washington.edu/kepeter/118photos/sperm-development.jpg)
-
- Figura 5** - Aparência morfológica dos testículos de ratos normais com 1 mês (**a**) e 6 meses (**d**) de seguimento: nota-se evidência de espermatogênese no lúmen tubular; (**b**) vacuolização do epitélio seminífero (→); epitélio seminífero atrófico (*) em rato diabético com 1 mês de seguimento; (**c**) epitélio germinativo atrófico (*) em rato diabético com 1m de seguimento; (**e**) dois túbulos seminíferos parcialmente atroficos (**), um túbulo totalmente atrófico (*), vacuolização de epitélio seminífero (→) em rato diabético com 6 meses de seguimento; (**f**) quase que completa perda de epitélio germinativo (atrofia tubular) em rato diabético com 6 meses de seguimento. Barra = 100µm. 28
-
- Figura 6** - *Box plot* representando as medidas em micrômetros ao quadrado (μm^2) da área total (AT) de túbulos seminíferos de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios-padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores. 31
-

Figura 7 - *Box plot* representando as medidas em micrômetros ao quadrado (μm^2) da área do epitélio (AE) de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e os círculos representam os valores extremos.

32

Figura 8 - *Box plot* representando as medidas em micrômetros ao quadrado (μm^2) da área do lúmen (AL) de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e os círculos representam os valores extremos.

33

Figura 9 - *Box plot* representando a densidade numérica tubular (D) (número de túbulos/ mm^2) dos animais normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e os círculos representam os valores extremos.

34

Figura 10 - *Box plot* representando a espessura do epitélio (EE) em micrômetros (μm) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e o círculo representa o valor extremo.

35

Figura 11 - *Box plot* representando a porcentagem do lúmen ou proporção da área do lúmen (%) em relação a área total dos túbulos seminíferos de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores.

36

Figura 12 - *Box plot* representando a porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio (%) em relação a área total dos túbulos seminíferos de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores.

37

Figura 13 – Ultraestrutura dos testículos de ratos normais e diabéticos com 1 mês de seguimento, onde observa-se:

13A – Célula de Sertoli (S) de rato diabético com vacúolos (v) no citoplasma (9750x)

13B – Região intermediária de uma espermátide madura (espermatozóide) de rato normal com normalidade na capa de mitocôndrias (23000x).

13C – Espermátides de rato normal em estágio 1 (ESP), com ilhas de espermatozoides (flechas) normais (3250x).

13D – Espermátides de rato diabético em estágio 1 (flechas) com poucos espermatozoides (2450x).

13E – Corpos residuais (CR) de rato diabético com mitocôndrias e depósitos escuros. Corte de flagelo de espermatozóide no lúmen. (42000x).

41

Figura 14 - Ultraestrutura dos testículos de ratos normais e diabéticos com 6 meses de seguimento, onde observa-se:

14A – Cauda de espermatozóide de rato normal com falta de camada completa de mitocôndrias (flechas duplas) (17000x).

14B – Defeito na camada de fibras densas e na de mitocôndrias (flecha) em espermatozoides de rato diabético (23000x).

14C – Espermátides redondas com acrosoma (*) de aspecto normal. Três células germinativas (espermatócitos) (**) de aspecto normal. Membrana basal (mb) do túbulo seminífero. (3250x). Rato normal.

14D – Espermátides redondas em transformação (**) com modificação do acrosoma. Corpo residual (CR) contendo material denso e restos celulares (4350x). Rato diabético.

14E – Região da cauda de espermatozóide com defeito na capa de mitocôndrias (13250x). Rato diabético.

42

Figura 15 – Ultraestrutura dos testículos de ratos normais e diabéticos com 6 meses de seguimento, onde observa-se:

15A – Mitocôndria de rato normal com irregularidades nas membranas (envelope) (57.500x).

15B - Mitocôndrias com forma alterada e diminuição do número de cristas (**) em rato diabético, com acúmulo elétron denso nas membranas. Aumento de (42,000x).

43

Figura 16 – Ultraestrutura dos testículos de ratos diabéticos com 12 meses de seguimento, onde observa-se:

16A – Espermatócito de rato diabético, com vacúolos (v) no núcleo que contém cromatina pouco condensada (3250x).

16B – Espermátide de rato diabético com acrosoma (ESP) e cromatina

44

pouco densa liberada precocemente na luz tubular. Processo de degeneração tubular. Poucos espermatozoides no lúmen (4350x).

16C – Corpos residuais (CR) redondos com vacúolos circulares e substância escura no lúmen. Espermatócito com acrosoma pouco evidente e cromatina pouco densa (ESP) (5750x). Rato diabético.

16D – Duas células germinativas (*) de rato diabético onde notam-se massas de cromatina e depósitos de substância escura em grânulos (flecha) (5750x).

Figura 17 – Ultraestrutura dos testículos de ratos diabéticos com 1 mês de seguimento, onde observa-se:

17A – Espermatogônias degeneradas (flechas duplas). Depósitos escuros. Membrana basal aparentemente espessada (flecha) (5750x).

17B – Dois espermatócitos degenerados (*) com a cromatina muito densa ao lado de espermatócitos normais (N). São observados dois nucléolos de célula de Sertoli e célula mióide (m) abaixo da membrana basal espessada (mb) (4350x).

45

17C – Espermatozoide com grande defeito na camada de fibras densas (flecha) (13250x).

17D – Vacuolização citoplasmática de espermatogônias e células de Sertoli (v). Depósitos grosseiros de substância escura (flecha). Núcleo celular (*) com intensa alteração da cromatina (degeneração nuclear) (7750x).

Figura 18 – Esquema ilustrativo do mecanismo básico de formação de lipofuscina. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biol Med.* 2002; 33:611-9.

53

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Medianas, valores máximos e mínimos da glicemia (mg/dl), glicosuria (mg/24h), ingestão hídrica (ml) e diurese (ml) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1, 6 e 12 meses de seguimento. 26
- Tabela 2** - Médias e desvios-padrão dos valores do peso corporal (g) e ingestão alimentar (g) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados após 1, 6 e 12 meses de seguimento. 26
- Tabela 3** - Médias e desvios-padrão dos valores da insulina ($\mu\text{UI/ml}$) e hemoglobina glicosilada (%), e medianas, valores máximos e mínimos da testosterona (ng/dl) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento. 27
- Tabela 4** - Médias e desvios-padrão da área total (μm^2), área do epitélio (μm^2) e área do lúmen (μm^2) de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. 29
- Tabela 5** - Médias e desvios-padrão da espessura do epitélio (μm), porcentagem do lúmen (%) ou proporção da área do lúmen em relação à área total, porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio em relação total e densidade numérica tubular ($\#/ \text{mm}^2$) de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. 30

Resumo

ALTERAÇÕES TESTICULARES NO DIABETES ALOXÂNICO NO RATO

ESTUDO MORFOMÉTRICO E ULTRA-ESTRUTURAL DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

RESUMO

Objetivo – Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar, no longo prazo, os parâmetros morfométricos e ultraestruturais dos tubulos seminíferos dos testículos de ratos diabéticos aloxânicos. **Material e Métodos** - 60 ratos Wistar, machos, pesando de 250 a 280 gramas foram divididos em 2 grupos experimentais: N ou grupo normal, constituído de 30 animais sadios, não-diabéticos; D ou grupo diabético, constituído de 30 animais diabéticos sem qualquer tratamento da doença. Cada grupo experimental foi posteriormente dividido, por sorteio, em 3 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados com 1, 6 e 12 meses de seguimento. O diabetes experimental foi induzido pela administração endovenosa de aloxana 2%, na dose de 42 mg/kg de peso corporal. Somente animais com sinais clínicos evidentes de diabetes grave e com glicemia >250 mg/dl e glicose urinária > 3000 mg/dl foram utilizados neste experimento. Com 1, 6 e 12 meses de seguimento o peso corporal, a ingestão hídrica, a ingestão alimentar, a diurese e os níveis de glicose sanguínea foram avaliados em todos os animais. Com 1 e 6 meses de seguimento também foram analisados os níveis de insulina plasmática, hemoglobina glicosilada (HbA1C) e de testosterona sérica. Após o sacrifício dos animais, ambos os testículos foram removidos, sendo o testículo esquerdo preparado para a microscopia ótica e o direito para a microscopia eletrônica. As medidas morfométricas à M.O. e M.E. foram realizadas por análise digital de imagens utilizando o software Quin Lite 2.5 -

LEICA . A ultraestrutura dos túbulos seminíferos foi analisada ao microscópio de transmissão PHILIPS, pela análise descritiva comparativa. Neste experimento foram analisados os seguintes parâmetros: a) área total dos túbulos seminíferos; b) espessura do epitélio tubular; c) área do lúmen tubular; d) espessura do epitélio germinativo; e) porcentagem de lúmen tubular ou proporção da área do lúmen em relação a área total; f) porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio em relação a área total; g) número de túbulos por mm^2 . Os resultados dos parâmetros clínicos e laboratoriais foram analisados pelos testes de comparação múltipla de Dunn e de Tukey, no nível de significância de 5% ou $P < 0,05$. Os resultados dos parâmetros morfométricos foram analisados pelo teste ANOVA para um critério, complementado pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de significância $p < 0,05$. **Resultados** – Animais diabéticos apresentaram parâmetros clínicos de diabetes grave, caracterizado por diminuição do peso corporal e aumento significativo da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese quando comparados com ratos normais não-diabéticos ($P < 0,01$). Animais diabéticos também apresentaram níveis significativamente elevados de glicose sanguínea, HbA1C e de glicose urinária, com valores baixos de insulina plasmática quando comparados com ratos controles ($P < 0,01$). Os níveis séricos de testosterona também foram significativamente diminuídos em ratos diabéticos em relação aos seus controles. Em relação aos achados morfométricos dos testículos: a área total, área do epitélio e a espessura do epitélio foram menores ($P < 0,01$) e a densidade numérica tubular maior nos animais diabéticos ($P < 0,05$). A porcentagem do lúmen ou proporção da área do lúmen em relação a área total foi maior e a porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio em

relação a área total menor nos animais diabéticos sacrificados com 1 mês de seguimento, ($P < 0,01$). Esses parâmetros morfométricos não se mostraram alterados nos animais diabéticos sacrificados com 6 meses de seguimento. Ratos diabéticos também apresentaram alterações ultraestruturais das células germinativas e das organelas dos testículos, desde o 1º mês de seguimento, acometendo as espermatogônias, espermatídes maduras, células de Sertoli e mitocôndrias, caracterizadas por vacuolização citoplasmática, acúmulo de material eletrodense e corpúsculos residuais localizados no citoplasma, em membranas celulares e mitocôndrias, e a presença de degeneração e apoptose celular nos estádios finais da agressão celular. Essas alterações também foram observadas em ratos normais não-diabéticos de longo tempo de seguimento, porém, sempre foram menos freqüentes e menos graves neste grupo de ratos.

Palavras-chaves: Diabetes Mellitus. Aloxana. Testículos. Túbulos Seminíferos. Morfometria. Ultraestrutura. Ratos.

Abstract

ABSTRACT

Purpose - This study was conducted to evaluate, in the long term, ultrastructural and morphometric parameters of seminiferous tubules of the testis of diabetic rats alloxan. **Material and Methods** - 60 male Wistar rats weighing 250-280 grams were divided into two groups: group N or normal, consisting of 30 healthy animals, non-daibetics; D or diabetic group, consisting of 30 diabetic animals without in treatment. Each experimental group was then divided in three subgroups of rats with 10 animals each to be evaluated and sacrificed at 1, 6 and 12 months of follow-up. Experimental diabetes was induced by intravenous administration of alloxan 2% at a dose of 42 mg / kg body weight. Only animals with obvious signs of severe diabetes and blood glucose > 250 mg / dl and urine glucose > 3000 mg / dl were used in this experiment. At 1, 6 and 12 months of follow-up body weight, water intake, food intake, diuresis and blood glucose levels were evaluated in all animals. At 1 and 6 months of follow-up were also analyzed the levels of plasma insulin, glycosylated hemoglobin (HbA1C) and serum testosterone after the animal sacrifice, both testis were removed, the left was prepared for light microscopy and the right to the electron microscopy. Morphometric measures at M.Ö. and ME were performed by using digital image analysis software Quin Lite 2.5 - LEICA. The ultrastructure of the seminiferous tubules was analyzed by transmission microscope PHILIPS, by comparative descriptive analysis. In this experiment we analyzed the following parameters: a) total area of seminiferous tubules, b) epithelium area, c) lumen area, d) thickness of the germinal epithelium, e) percentage of tubular lumen or proportion of lumen area in relation to the total area, f) percentage of epithelium or proportion of epithelium area in relation to the total area; g) number of tubules per mm². The results of clinical and laboratory parameters were analyzed by multiple comparison Tukey's and Dunn, the significance level of 5% or $p < 0.05$. The results of the morphometric parameters were analyzed by ANOVA for one criterion, complemented by Tukey test, adopting a significance level of 5% or $p < 0.05$. **Results** - diabetic rats showed clinical parameters of severe diabetes characterized by decreased body weight and significant increase in water

intake, food intake and urine output when compared with normal rats without diabetes ($P < 0.01$). Diabetic animals also had significantly elevated levels of blood glucose, HbA1c and urinary glucose, with low plasma insulin levels compared with control rats ($P < 0.01$). The serum testosterone levels were also significantly decreased in diabetic rats compared to their controls. Regarding the morphometric findings of the testis: the total area, area of the epithelium and the thickness of the epithelium were lower ($P < 0.01$) and the numerical density tubular greater in diabetic animals ($P < 0.05$). The percentage of tubular lumen or proportion of the lumen area in relation to total area was higher and the percentage of epithelium or proportion of epithelial area in relation to total area was lower in diabetic animals sacrificed at 1 month follow-up ($P < 0.01$). These morphometric parameters were not changed in diabetic animals sacrificed at 6 months of follow up. Diabetic rats also showed ultrastructural changes of germ cells and organelles of testis, since the first months of follow up, affecting the spermatogonia, mature spermatids Sertoli cells and mitochondria, characterized by vacuolization, accumulation of electron dense material and waste corpuscles located in the cytoplasm, in cells membranes and mitochondria, and the presence of degeneration and apoptosis in the later stages of cellular injury. These changes were also observed in normal rats without diabetes of long follow-up, but they were less frequent and less severe in this group of rats.

Keywords: Diabetes Mellitus. Alloxan. Testis. Seminiferous Tubules. Morphometry. Ultrastructure. Rats.

Introdução

1. Definição

Diabetes é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não utiliza eficazmente a insulina que produz ¹. A função principal da insulina é promover a entrada de glicose para as células do organismo de forma que ela possa ser aproveitada para as diversas atividades celulares. A falta da insulina ou defeito na sua ação resulta, portanto em acúmulo de glicose no sangue, o que chamamos de hiperglicemia.

Podemos classificar o diabetes em dois grupos: Diabetes tipo 1 e Diabetes tipo 2. O Diabetes tipo 1 é resultado da destruição das células beta das ilhotas pancreáticas por uma apoptose autoimune, acarretando a perda da produção de insulina. O Diabetes tipo 2, também chamado não insulino dependente caracteriza-se pela produção de insulina pela células beta pancreáticas, porém com sua ação dificultada, ocorrendo quadro de resistência insulínica que acarretará aumento da produção de insulina para tentar manter a glicose em níveis normais. Quando isso não é mais possível surge o diabetes. Ao contrário do diabetes tipo 1, há geralmente associação com aumento de peso e obesidade acometendo principalmente adultos a partir dos 50 anos. Contudo observa-se cada vez mais o desenvolvimento o quadro em adultos jovens e até crianças. Isso se deve, principalmente, pelo aumento do consumo de gordura e carboidratos aliados a falta de atividade física. Outros tipos de diabetes são bem mais raros e incluem defeitos genéticos da função a célula beta (MODY 1,2,3), defeitos genéticos na ação da insulina, doença do pâncreas (pancreatite, tumores pancreáticos,

hemocromatose), outras doenças endócrinas (Síndrome de Cushing, hiperparatireoidismo e acromegalia) e uso de certos medicamentos. Diabetes gestacional – Pode ser transitório ou não e, ao término da gravidez, a paciente deve ser investigada e acompanhada. Na maioria das vezes ele é detectado no 3º trimestre da gravidez, através de um teste de sobrecarga de glicose.²

O diagnóstico precoce do diabetes é importante para prevenção da complicações agudas e crônicas.

2. Aspectos Gerais

O diabetes está se tornando a epidemia do século, e já afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. Até 2025 a previsão é de que esse número chegue a 380 milhões.³ No Brasil, de acordo com o Vitigel (Sistema de Monitorização de Fatores de Risco e Proteção de Doença Crônicas e Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18anos) é de 5,2% representando 6.399.187 pessoas, que confirmaram serem portadoras da doença. A prevalência aumenta com a idade: o diabetes atinge 18,6% da população com idade superior a 65anos.

O aumento da incidência do diabetes mellitus entre crianças e adolescentes é observado em diversas comunidades. Nos últimos anos, tem-se observado aumento crescente na prevalência do diabetes tipo 2 entre jovens. Nos Estados Unidos, essa forma correspondia a 1-2% dos casos de diabetes na juventude e atualmente, observa-se que 8% a 45% dos casos novos de diabetes diagnosticados nessa faixa etária não tem etologia auto-imune demonstrada.⁴ Este aumento em jovens foi observado

inicialmente em certas minorias étnicas, como os índios Pima, habitantes do estado do Arizona (EUA). Nestes, observou-se a frequência acima de 1% de indivíduos diabéticos na população com idade entre 15 e 24 anos, em sua maioria não dependentes de insulina exógena, apresentando significativa associação com obesidade.⁵ Na região metropolitana de Cincinnati (EUA), em 1994, o diabetes mellitus tipo 2 já correspondia a 33% dos casos de diabetes recém-diagnosticados em indivíduos com idade entre 10 e 19 anos. O aumento do diabetes mellitus tipo 2 na juventude não é fato exclusivo da América do Norte. Entre os japoneses em idade escolar, a incidência elevou-se, em vinte anos, de 0,2 para 7,6 por 100 mil indivíduos.⁶ O aumento na prevalência da obesidade na adolescência registrado nos últimos anos explicaria, em grande parte o avanço do diabetes mellitus tipo 2 em populações jovens.^{7,8}

Segundo a Organização Mundial da Saúde em 2005 faleceram mais de 1,1 milhão de pessoas por diabetes mellitus e que 80% das mortes são registradas em países em desenvolvimento médio ou baixo; a Organização Mundial da Saúde faz a previsão de que as mortes por diabetes se multipliquem entre 2005 e 2030.

3. Aparelho reprodutor masculino e diabetes

Os efeitos do sistema reprodutor masculino no diabetes incluem impotência resultante de complicações neurovasculares e alterações testiculares determinante de espermatogênese alterada.^{9,10}

Pesquisas iniciais indicavam menores volumes dos testículos e de sêmen que não se confirmaram posteriormente^{11,12}; com a realização de biopsias de pacientes com oligospermia foram verificadas importantes anormalidades que afetavam as células de Sertoli, o tecido tubular, as estruturas vasculares e o interstício.^{13,14} Faerman e cols (1972)¹⁵ estudando serie de 7 biopsias testiculares de pacientes diabéticos insulino dependentes encontraram hipoespermatogene e esfoliação do epitélio germinativo.

Cameron e cols¹³ estudaram por microscopia ótica e eletrônica, biopsias testiculares de 10 pacientes adultos diabéticos insulino dependentes portadores de impotência por períodos variáveis comparando-os com controles normais. O quadro histológico constou de depleção de células germinativas nos túbulos, túbulos de diâmetros diminuídos, parede tubular espessada, e esfoliação de células germinativas no lúmen indicando espermatogênese alterada. A microscopia eletrônica identificou vacuolização intensa das células de Sertoli e perda do processo juncional intercelular especializado nessas células. O interstício demonstrava invasão de matriz extra celular rico em colágeno e as paredes vasculares eram espessadas.

Para esses autores essas alterações microvasculares nos pacientes impotentes podem afetar a função da célula de Leydig e a espermatogênese da mesma forma como ocorre nos testículos senescentes.^{16,17}

Em relação a estudos referentes à qualidade de sêmen, Dinulovic & Radonjic¹⁸ estudando 54 pacientes diabéticos comparando-os com 38 normais com estratificação quanto a idade e duração da doença, encontraram diminuição da motilidade de espermatozóides.

Ambos os tipos de diabetes, tipo 1 e tipo 2 são causas bem reconhecidas de disfunção sexual e da função reprodutiva masculina em vários níveis, incluindo controle endócrino da espermatogênese, a espermatogênese, a ereção peniana e a ejaculação^{19,20,21}

O diabetes mellitus é considerado um problema de saúde pública mundial (WHO 2009).¹

O diabetes é usualmente acompanhado pela produção aumentada de radicais livres ou pela diminuição de antioxidantes; as mitocôndrias são a fonte principal das espécies reativas de oxigênio nas células e a diminuição de sua função está intrinsecamente relacionada ao diabetes.^{22,23}

Atualmente tem sido proposto que os radicais livres de oxigênio são um mediador comum de várias patologias que afetam a função reprodutiva e que a função mitocondrial está diminuído na infertilidade.^{24,25}

O esperma de mamíferos tem específica composição lipídica consistindo de alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, plasmalogenos e esfingomiélinas; os lipídios nos espermatozoides são o principal substrato para a peroxidação. Aitken e cols. (1989)²⁶ demonstraram que o excesso de espécies reativas de oxigênio e radicais livres produzem um efeito adverso sobre a motilidade dos espermatozoides e na fertilidade. Sabe-se que o processo oxidativo nos lípidos e no DNA dos espermatozoides é associado com o declínio na motilidade e fertilidade do esperma humano.^{27,28,29} Foi demonstrado que espermatozoides apresentando defeitos nas mitocôndrias não apenas produzem ATP de forma menos eficiente, mas também geram estresse oxidativo elevado,

levando a declínio na fertilidade.³⁰ Embora atualmente avanços importantes em alguns mecanismo celulares já ocorreram, os mecanismos da espermatogênese alterada em homens diabéticos são pouco entendidos.

Considerando que as projeções indicam aumento da prevalência do Diabetes mellitus em todo o mundo e como consequência mais pacientes serão afetados em fase pré-reprodutiva e reprodutiva,³¹ torna-se relevante o estudo das alterações testiculares em modelos de diabetes no rato o qual produz algumas similaridades relacionadas ao diabetes tipo I.

4. Estudos das lesões testiculares em animais

Animais diabéticos por pancreatectomia³², por indução com aloxana^{33,34}; ou induzidos pela streptozotocina^{35,36} demonstraram lesões testiculares relacionadas ao nível da glicemia e tempo de exposição à condição hiperglicêmica, e constaram principalmente de redução do epitélio germinativo e das células de Leydig, e de alterações no processo da espermatogênese.

SEETHALAKSHMI e cols. (1987)³⁷ encontraram contagem de espermatozóides e mobilidade significativamente diminuídas em ratos diabéticos e Scarano e cols. (2006)³⁸, disfunção reprodutora duas semanas após o diabetes.

Ratos normais apresentam alterações dos túbulos seminíferos com o aumento da idade, aparecendo túbulos regredidos com frequência variável e, em ratos Brown Norway este processo se manifesta aos 18 meses³⁹. Em hamsters normais não foram detectadas alterações histológicas aos 6 meses

de idade mas com 12 meses era evidente uma diminuição da altura do epitélio do túbulo seminífero, hipoespermatogênese e a presença de descamação celular^{40,41}. Aos 2 anos de idade 40% dos túbulos seminíferos era anormal.

À microscopia eletrônica células germinativas de túbulos regredidos de ratos Brown Norway normais de 2 anos demonstraram alterações citoplasmáticas, predomínio da células de Sertoli ou de sustentação e grande lisossomos que apresentavam composição heterogênea e inclusões semelhantes a lipofucsina⁴².

Camundongos diabéticos não obesos (NOD), animais que se tornam obesos na 30ª semana de vida, estudados por Gondos & Bevier (1995)⁴³ aos 3 meses de idade com glicemia entre 238 e 543mg/ apresentavam depleção de células espermatogênicas, atrofia tubular e degeneração das células germinativas.

Nesse grupo de animais (NOD) em fase de insulite e pré-diabetes, Sainio-Pöllänen et al (1997)⁴⁴ em estudo à microscopia eletrônica, encontraram apoptose das células germinativas espermatogônia, espermatócitos e espermatides.

Estudos ultra estruturais de túbulos seminíferos em animais diabéticos são escassos, a maioria tem como objetivo o estudo da célula de Leydig intersticial^{45,46,47}.

5. Parênquima testicular

O parênquima testicular consiste de túbulos seminíferos que são os maiores componentes dos testículos e do tecido intersticial. Os túbulos

seminíferos são compostos por células espermatogênicas: espermatogonia, espermatócitos e espermatídeos entremeados por células de suporte, as células de Sertoli.

O espaço entre os túbulos seminíferos contém tecido frouxo onde se encontram nervos, células de Leydig e outras células como fibroblastos, mastócitos, macrófagos⁴⁸.

Os testículos têm função dupla, espermatogênese que ocorre nos túbulos seminíferos e secreção de hormônios esteróides ou androgênicos pelas células de Leydig; a síntese de testosterona é necessária para a produção dos espermatozoides e para o comportamento sexual normal.

A hipófise anterior controla estas funções pela secreção de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). A hipófise anterior é regulada através da secreção hipotalâmica de hormônio liberador de gonadotrofina (LHRH). Este eixo hipotálamo-hipófise-gonada consiste de mecanismo controlado por feedback⁴⁹. A figura 1 abaixo representa essas relações:

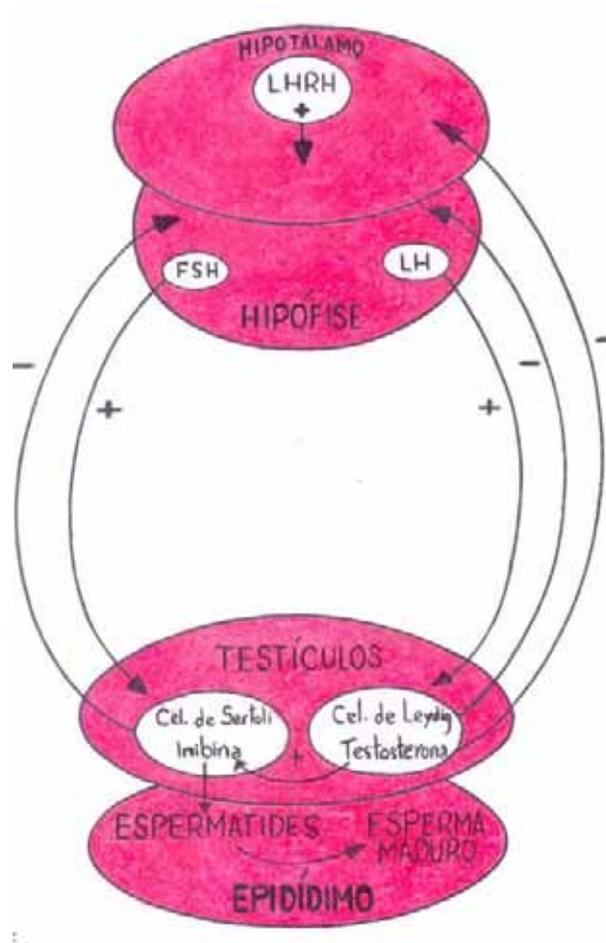


Fig. 1 – O LHRH liberado no Hipotálamo, age sobre a Hipófise que libera FSH e LH que atuam na célula de Sertoli e Leydig, estimulando a síntese e liberação de inibina e testosterona que atuam como feedback negativo na Hipófise e Hipotálamo.

O hormônio luteinizante (LH) produzido pela hipófise afeta a espermatogênese indiretamente, estimulando a produção de testosterona endógena.

As células de Sertoli tem afinidade para o FSH por possuir receptores específicos; a Testosterona e o FSH são os hormônios direcionados para o epitélio do túbulo seminífero.

A proximidade das células de Leydig e o túbulo seminífero e a produção de proteína ligadora de androgênio pelas células de Sertoli fazem

com que seja mantido alto nível de androgênio necessário no microambiente dos espermatozoides em desenvolvimento.

Na figura 2 está representado esquematicamente o túbulo seminífero contendo espermatogonia, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides.

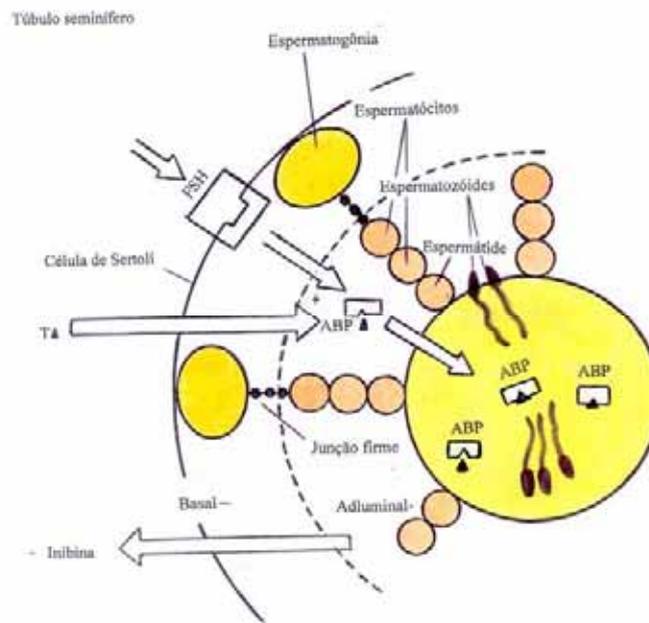


Fig. 2 – Representação do Túbulo Seminífero mostrando o hormônio folículo-estimulante (FSH) e testosterona (T) agindo nas células de Sertoli que produzem proteína de ligação do Androgênio (ABP) e inibina e, as células germinativas até a liberação de espermatozoides dentro do lúmen. (MacClure, RD: Endocrine investigations and therapy. Urol. Clin. North. AM. 14:471-488, 1987.

Os túbulos seminíferos contém células germinativas em vários estágios de maturação e células de Sertoli; estas constituem 85 a 90% do volume testicular.

As células de Sertoli são células de sustentação, não se dividem, são uma população fixa e parecem estar envolvidas na nutrição das células germinativas bem como na fagocitose de células lesadas. A relação entre as células de Sertoli e as células germinativas inclui os seguintes componentes: receptores para o FSH nas células de Sertoli; produção de uma proteína de

ligação ao androgênio, encontrado no túbulo seminífero que serve como reservatório do hormônio androgênico no túbulo; produção pelo túbulo seminífero de macromolécula que inibe a secreção do FSH - inibina e a conversão da testosterona em desitrotestosterona com maior potencia biológica que a testosterona nas células de Sertoli⁵⁰.

As células espermatogênicas são dispostas de forma ordenada desde a membrana basal até a luz do túbulo seminífero. Heller e Clermont (1964)⁵¹ revelaram 13 diferentes células germinativas representantes dos diferentes estágios no processo de desenvolvimento e o seu desenvolvimento conta com íntima associação com as células de Sertoli, de forma que múltiplos tipos de células espermatogênicas estão em contato com uma única célula de Sertoli, conforme fica demonstrado na figura 3 abaixo.

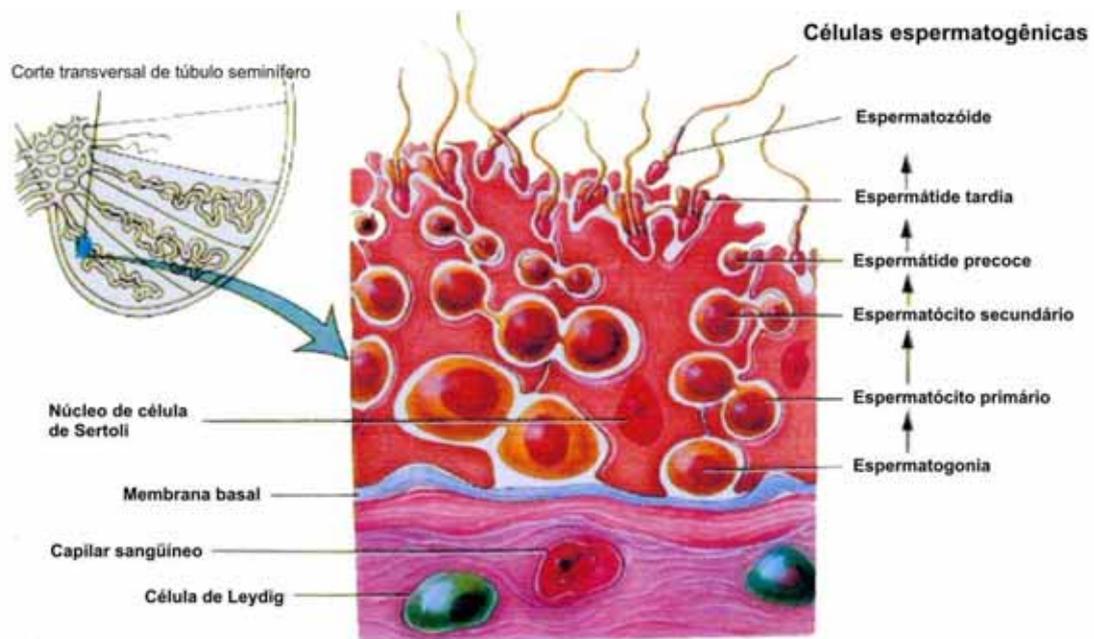


Figura 3- Corte transversal de um túbulo seminífero mostrando uma única célula de Sertoli em contato com diferentes tipos de células espermatogênicas.

Note a célula de Leydig, no espaço intersticial, em íntimo contato com os vasos sanguíneos. (Fonte: http://faculty.washington.edu/kepeter/118/photos/testes_cells.jpg).⁴⁹

Quando o desenvolvimento das células germinativas se completa, as espermátides maduras são liberadas pelas células de Sertoli dentro do lumen, e estas passam por um sistema de duto coletor ou “rete-testes” antes de entrarem no epidídimo via dutos eferentes. A transformação das espermátides em espermatozóides nos túbulos seminíferos se faz em processo denominado espermiogênese e inclui condensação do núcleo celular, formação de acrossomo, perda da maior parte do citoplasma, desenvolvimento de uma cauda e disposição das mitocôndrias na porção média do espermatozóide. O ciclo espermatogênico no rato é de 12 dias^{52,53}. Na figura 4 abaixo está esquematizado o processo de espermiogênese.

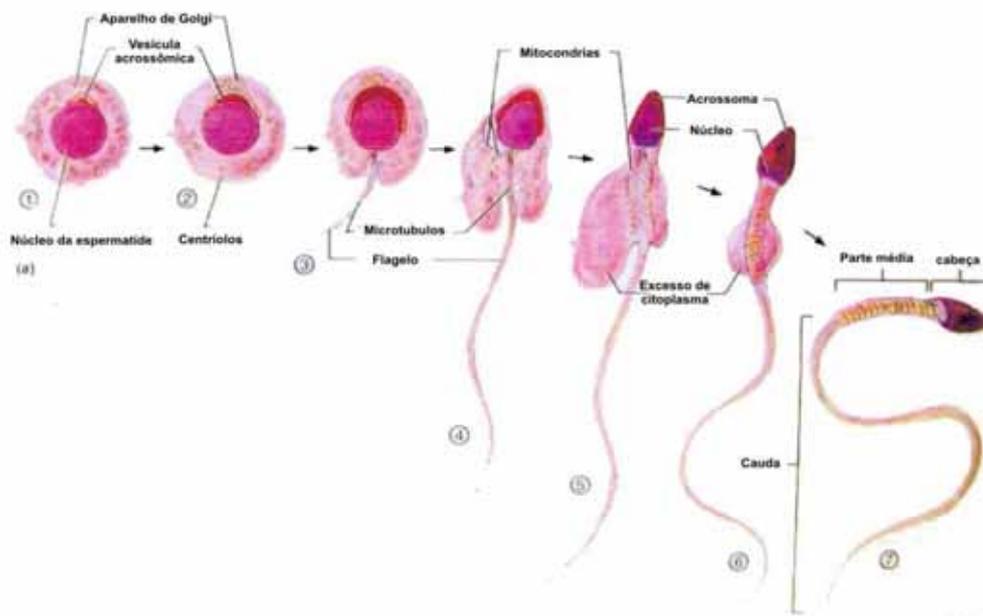


Figura 4 - Processo de espermiogênese. Inicia-se com espermátide arredondada, ocorre a diferenciação e tem-se como resultado final a formação de um espermatozóide.

Fonte: <http://faculty.washington.edu/kepeter/118/photos/sperm-development.jpg>⁴⁹

Por muitos anos se presumiu que as células de Sertoli eram o maior fator que controlava o desenvolvimento das células germinativas, porém estudos recentes demonstraram que as células germinativas controlam o

seu desenvolvimento⁵⁴.

Para Ozaki - Kuroda et al (2002)⁵⁵ as junções celulares entre as células de Sertoli e células germinativas desempenham papel crucial na morfogenese e diferenciação das células germinativas, além do papel mecânico de adesão entre as células.

A decomposição e a recomposição das junções aderentes é um evento essencial durante a espermatogenese porque as células germinativas precisam se deslocar da região basal para o compartimento ad luminal do epitélio seminífero para completar a espermatogenese. Esta dinâmica é regulada por ampla rede de moléculas incluindo, fatores de crescimento, quinases e fosfatases⁵⁶.

Objetivo

Nosso objetivo foi o de avaliar os parâmetros morfométricos: área total, área do epitélio, área do lúmen, espessura do epitélio germinativo, densidade numérica tubular, porcentagem do lúmen ou proporção da área do lúmen em relação a área total e porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio em relação a área total nos túbulos seminíferos de ratos diabéticos induzidos pela aloxana e de ratos não-diabéticos sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento, e as alterações ultraestruturais dos túbulos seminíferos dos animais sacrificados com 1, 6 e 12 meses de seguimento.

Material e Métodos

1. Animais utilizados

No presente estudo foram utilizados 60 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, sadios ao exame clínico, pesando aproximadamente 250-280 gramas, oriundos do Biotério Central do Campus da Unesp de Botucatu. O estudo apresentado, de protocolo nº 650, foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA), da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, no dia 10 de janeiro de 2008.

2. Ambiente de experimentação, profilaxia e tratamento de infecções

Os animais foram mantidos em gaiolas de poliuretano, forradas com palha autoclavada, em grupos de 4 animais/caixa, colocadas em “containers”, com temperatura, exaustão e iluminação controladas. O controle de insetos foi feito utilizando dispositivos foto-eletrônicos.

Na semana que antecedeu a indução do diabetes experimental, os animais foram vermifugados com mebendazol (Abbott – Cifarma, São Paulo – SP), administrado por via oral e adicionado à água de beber, e tratados profilaticamente de pediculose com fipronil/metoprene (Merial Saúde Animal Ltda., Paulínia –SP), colocado na superfície da pele. Na evidência de sinais clínicos de piodermite e/ou pneumonia no seguimento, os animais foram tratados, respectivamente, com cuidados locais das lesões com solução degermante de digluconato de clorohexedina (NeoQuimica, São Paulo – SP) e administração de cloridrato de tetraciclina, na dose de 100mg/kg (Bristol – M – Squibb, São Paulo – SP) colocada na água de beber, durante 7-10 dias.

3. Distribuição e sorteio dos animais

Oriundos do biotério, os animais foram inicialmente sorteados em dois grupos de ratos; o primeiro, destinado aos animais que permaneceram como controles (normais não-diabéticos) e o segundo, aos animais que foram submetidos à indução do diabetes experimental (animais diabéticos). Decorridos 14 dias após a indução do diabetes ou de seguimento normal, os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais, como abaixo discriminados:

4. Grupos experimentais

N - Grupo normal: constituído de 30 animais normais, sadios, não-diabéticos;

D - Grupo diabético: constituído de 30 animais diabéticos aloxânicos, não-tratados;

Animais que evoluíram para o óbito no período pós-indução do diabetes, e no seguimento precoce ou tardio, foram repostos, de modo a não comprometer o número final de ratos de cada grupo ou subgrupo estudado.

5. Momentos de avaliação e sacrifício

Cada um dos 2 grupos experimentais foi dividido, por sorteio, em 3 subgrupos de ratos, com 10 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados, respectivamente, em 3 momentos do experimento, a saber:

M1 – animais sacrificados com 1 mês de seguimento normal ou com diabetes;

M2 – animais sacrificados com 6 meses de seguimento normal ou com diabetes;

M3 – animais sacrificados com 12 meses de seguimento normal ou com diabetes.

Todos os animais do estudo também tiveram uma avaliação inicial (M0), realizada no 14º dia pós-indução do diabetes ou de seguimento normal, para obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais de confirmação do estado diabético ou de normalidade.

6. Parâmetros analisados

No presente estudo foram avaliados os seguintes parâmetros:

Clínicos: controles do peso corporal (g), ingestão hídrica (ml/24h), ingestão alimentar (g/12h) e diurese (ml/24h);

Laboratoriais: dosagens de glicose sanguínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática e testosterona sérica;

Morfologia dos testículos (M.O.): análise dos aspectos histopatológicos dos túbulos seminíferos, com ênfase à presença/ausência de: espermatogênese, vacuolização, degeneração, perda do epitélio germinativo e atrofia tubular;

Morfometria dos túbulos seminíferos (MO), com avaliação das seguintes variáveis: área tubular total (μm^2), área do epitélio germinativo (μm^2), espessura do epitélio germinativo (μm), porcentagem de lúmen tubular (%) ou proporção da área do lúmen em relação à área total e densidade de túbulos seminíferos/ mm^2 ;

Ultraestrutura dos testículos (ME): com ênfase aos aspectos elétronicos microscópicos das espermatogônias, espermátides, células de Sertoli e mitocôndrias, em relação à presença/ausência de: vacuolização citoplasmática; acúmulo de materiais anômalos e corpúsculos residuais no citoplasma e/ou membranas celulares; alterações na cromatina nuclear; degeneração e morte celular.

7. Técnicas utilizadas

7.1. Anestesia, coleta de sangue e sacrifício

O sacrifício dos animais foi realizado sob efeito de anestesia geral, utilizando ketamina, na dose de 100 mg/Kg de peso corporal, associada à xilazina, na dose de 25 mg/Kg de peso corporal, administradas por via intramuscular. Ambas as drogas foram fabricadas pela Rhobifarma Ind. Farmacêutica Ltda, Hortolândia – SP. A coleta de sangue no sacrifício foi feita por punção cardíaca, com o tórax aberto. A eutanásia foi feita por exsanguinação volêmica, seguida da secção da veia cava infradiafragmática.

7.2. Obtenção de parâmetros clínicos e laboratoriais

No início do experimento (14º dia após a indução do diabetes ou de seguimento nos animais normais) e, no dia anterior, a cada um dos momentos definidos para o sacrifício (1, 6 e 12 meses), os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, durante um período de 24 horas, sendo oferecida, ao final da tarde, quantidade padronizada de ração e água. Ao término de um período noturno de 12 horas a ração consumida foi registrada (ingestão alimentar em g/12h) e ao término de 24 horas, foram

registrados: o volume de água ingerido (ingestão hídrica em ml/24h), a quantidade de urina coletada (diurese em ml/24h) e o peso corporal (g). Um volume de 10 ml da urina coletada foi armazenado para a dosagem de glicose urinária de 24h.

Para obtenção dos parâmetros laboratoriais iniciais e no seguimento tardio, os animais ficaram de jejum por 12h noturnas, sendo o sangue coletado por secção da cauda. Para tanto, os mesmos foram colocados em uma caixa com luzes incandescentes, por um período de 10 minutos, visando aquecê-los e promover a vasodilatação da cauda. A seguir, a cauda foi seccionada em sua extremidade distal, sendo obtidos, por gotejamento, 1,5 ml de sangue para as dosagens bioquímicas. A seguir, a extremidade da cauda seccionada foi amarrada com fio de algodão 2-0, com finalidade hemostática.

7.3. Indução do diabetes experimental

O diabetes foi induzido pela administração de uma solução aquosa de aloxana a 2% (5,6 dioxiuracil monohidrato – Sigma Co, USA), injetada por via endovenosa, em dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando-se uma das veias da cauda do animal.

No presente estudo somente foram utilizados animais com sinais clínicos de diabetes grave, glicemia de jejum >250mg/dL e glicose urinária \geq 3000mg/dL, em duas determinações sucessivas (7 e 14 dias após a indução). Animais diabéticos cujos critérios descritos não foram preenchidos foram excluídos do experimento.

7.4. Exames laboratoriais

As dosagens de glicose sangüínea e urinária foram realizadas em animais sacrificados com 1, 6 e 12 meses de seguimento pelo método da glicose oxidase com utilização do equipamento Vitro^R da Johnson & Johnson. As dosagens de hemoglobina glicosilada, insulina plasmática e testosterona foram realizadas em animais sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento, sendo quantificadas, respectivamente, por eletroforese, em sangue total, utilizando “kits” da marca Sebia^R; por radioimunoensaio, em fase sólida, pelo método “coat-a-coat insulun” (DPC-Medlab – São Paulo); e pela técnica de quimioluminescência, aferida pelo equipamento da marca Architect – modelo i2000 SR.

7.5. Exérese dos testículos pós-morte

Após a exsanguinação, ratos dos 2 grupos experimentais, tiveram os seus testículos removidos. O testículo esquerdo foi colocado em solução de Bouin e preparado para estudo à microscopia óptica, em processador automático. O testículo direito foi pré-fixado em glutaraldeído a 2,5%, em tampão fosfato 0,1M no pH 7,3 e posteriormente preparado para o estudo à microscopia eletrônica de transmissão.

7.6. Exame morfológico e morfométrico à MO

Escolhidos por sorteio, os testículos de 10 ratos de cada subgrupo de estudo, sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento, em cada grupo experimental, foram mantidos imersos em Bouin, por um período de 48h, para a completa fixação. Após este período, fragmentos representativos de

toda a gônada foram seccionados, incluídos em parafina e processados para análise à MO, utilizando a coloração pela hematoxilina-eosina.

Após o preparo das lâminas, estas foram examinadas em um microscópio ótico, o qual era conectado a um sistema computadorizado de análise digital de imagens, utilizando o software Qwin Lite 2.5 – LEICA. Para o estudo morfométrico dos túbulos seminíferos foram analisados apenas os túbulos com contornos bem definidos e completos, em toda sua extensão, tendo sido avaliados os parâmetros mencionados no item 6 deste capítulo.

Para a realização das medidas morfométricas de interesse deste estudo foi seguida a seguinte metodologia: 1) A lâmina contendo o corte transversal do testículo era percorrida no microscópio, tendo sido captadas as imagens de 6 a 15 secções da lâmina; estas imagens foram tomadas ao acaso, em toda extensão do testículo, e continham de 4 a 25 túbulos seminíferos completos por secção; 2) As imagens dos túbulos seminíferos eram projetadas na tela do computador e com o auxílio do “mouse” era delineada a superfície tubular, obtendo-se a área total do túbulo; o mesmo procedimento era repetido para a superfície do lúmen, obtendo-se a área total do lúmen.

Da diferença entre a área do túbulo e a área do lúmen era obtida a área do epitélio germinativo. Foram feitas medidas das áreas de 101 a 195 túbulos seminíferos por animal.

A espessura do epitélio foi obtida tomando-se as secções de túbulos que haviam sido captadas e arquivadas no computador. Para tanto, procedeu-se a medida do túbulo na região do seu menor diâmetro, em cada

uma das secções, o que resultou em uma média de 68 a 135 medidas por animal. As médias e desvios - padrão foram calculados após obtenção dos dados.

A densidade tubular foi obtida pela contagem numérica dos túbulos seminíferos com contornos bem definidos, nas 10 primeira secções por animal previamente arquivadas no computador tendo sido contados de 60 a 130 túbulos por rato.

A porcentagem do lúmen ou proporção da área do lúmen em relação a área total foi calculada multiplicando-se a área do lúmen por 100, e dividindo-se o resultado pela soma do lúmen e do epitélio germinativo. Os cálculos foram feitos em 101 a 195 túbulos seminíferos por animal. A porcentagem do epitélio ou proporção do epitélio germinativo em relação a área total foi calculada utilizando-se os mesmo critérios para obtenção da porcentagem do lúmen.

7.7. Análise ultraestrutural

Para a análise ultraestrutural dos túbulos seminíferos, os testículos pré-fixados de 4 animais/ grupo experimental foram cortados em fragmentos cilíndricos de 1mm de espessura, fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, pH 7,4 por 2 horas (0°C), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, lavados em água destilada, incubados em acetato de uracila, desidratados em soluções de acetona e embebidos em resina. Cortes semifinos (1µm) foram cortados com um micrótomo e corados com azul de toluidina e examinadas ao microscópio de luz. Cortes finos (75nm) foram cortados com

ultramicrotomo e corados com citrato de chumbo e uranila e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão.

Foram estudados 3 blocos de 3 animais de cada grupo; de cada bloco foram obtidas 3-4 preparações para exame.

Com aumento de 5 – 7 mil vezes foram obtidas 5 – 10 micrografias eletrônicas panorâmicas, identificando-se as células de Sertoli, as espermatogonias, os espermatocitos e as espermatides. Nestas células foram pesquisadas a presença de alterações citoplasmáticas: vacuolização, aspecto das mitocôndrias e presença de substância eletrodensa; nos núcleos celulares foram observadas as características da cromatina, quanto a densidade e uniformidade.

Utilizando a magnificação (10 – 20 mil vezes)) das imagens previamente observadas no aumento menor, as mesmas estruturas foram reexaminadas, sendo obtidas de 10 – 20 micrografias para posterior análise e comparação. Espermatides maduras foram fotografadas com aumentos entre 20 e 40 mil vezes.

Foram obtidas micrografias de 2 a 3 túbulos de cada subgrupo de animais, sendo examinadas e documentadas várias regiões de cada túbulo, resultando em um estudo descritivo inicial. Após a descrição inicial e a documentação microfotográfica passou-se à descrição comparativa entre os grupo de ratos normais e diabéticos nos 3 períodos de seguimento (1, 6 e 12 meses). Todas as análises foram feitas pelo mesmo pesquisador, sem o conhecimento prévio do grupo experimental, do qual provinha o material examinado.

8. Análise Estatística

O estudo das variáveis clínicas (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese), laboratoriais (glicose sangüínea, glicose urinária, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática e testosterona), segundo os grupos, normal e diabético, e os seus respectivos momentos de sacrifício, foi realizado através da Análise de Variância, não paramétrica com dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn⁵⁷, sendo que para as variáveis paramétricas foi o utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey⁵⁷. O nível de significância adotado foi de 5% ou $P < 0,05$.

Os parâmetros morfométricos: área total, área do epitélio, área do lúmen, espessura do epitélio, porcentagem do lúmen ou proporção da área do lúmen em relação a área total, porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio em relação a área total e densidade numérica tubular, foram analisados pelo teste ANOVA para um critério complementado pelo teste de Tukey⁵⁷, adotando-se o nível de 5% de significância ou $p < 0,05$.

Resultados

1. Achados clínicos e laboratoriais

Ratos controles (N) apresentaram parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com os observados em animais de mesma linhagem, em todos os períodos de avaliação do experimento. Em contraste, ratos diabéticos (D), sem qualquer tratamento da doença, evoluíram com perda acentuada de peso corporal e aumento significativo ($P<0,01$) da ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, quando comparados com animais controles – N, nas avaliações efetuadas com 1, 6 e 12 meses de seguimento. Os níveis de glicose sanguínea e glicose urinária também foram significativamente elevados nestes períodos, o mesmo ocorrendo com os valores da hemoglobina glicosilada, nas avaliações realizadas com 1 e 6 meses de seguimento. Em contraste, ratos diabéticos apresentaram níveis de insulina e testosterona séricos significativamente baixos em relação aos ratos controles, com 1 e 6 meses de seguimento ($P<0,001$). Os valores obtidos constam das tabelas 1, 2 e 3, com as respectivas análises estatísticas e comentários.

Tabela 1 - Medianas, valores máximos e mínimos da glicemia (mg/dl), glicosuria (mg/24h), ingestão hídrica (ml) e diurese (ml) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1, 6 e 12 meses de seguimento.

		Glicemia (mg/dl)	Glicosuria (mg/24h)	Ingestão hídrica (ml)	Diurese (ml)
1mês	N	122,50 (80,00;130,00)	10,00 (0,00;59,00)	40,00 (10,00;50,00)	22,50 (5,00;30,00)
	D	640,00 (564,00;795,00)	8.072,00 (3.471;9.947,00)	250,00 (125,00;250,00)	125,00 (75,00;145,00)
<i>Valor p</i>		< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
6meses	N	108,00 (80,00;125,00)	14,00 (0,00;52,00)	30,00 (10,00;60,00)	22,00 (10,00;37,00)
	D	601,00 (498,00;963,00)	7.199,00 (4.001,00;8.829)	195,00 (105,00;230,00)	65,00 (60,00;140,00)
<i>Valor p</i>		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
12meses	N	136,50 (100,00;168,00)	9,50 (8,00;17,00)	25,00 (15,00;35,00)	8,00 (1,00;18,00)
	D	379,50 (254,00;616,00)	4.823,50 (3.455,00;5813,00)	112,5 (53,00;165,00)	75,00 (42,00;111,00)
<i>Valor p</i>		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Comentários: Os valores de glicemia, glicosúria, ingestão hídrica e diurese mantiveram-se significativamente aumentados durante o experimento nos animais diabéticos.

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão dos valores do peso corporal (g) e ingestão alimentar (g) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados após 1, 6 e 12 meses de seguimento.

		Peso (g)	Ingestão alimentar (g)
1mês	N	382,50 ± 35,84	24,50 ± 4,97
	D	178,11 ± 28,32	44,44 ± 6,35
<i>Valor p</i>		< 0,01	< 0,01
6 meses	N	517,27 ± 41,25	18,64 ± 6,36
	D	294,50 ± 64,14	45,50 ± 6,85
<i>Valor p</i>		<0,01	<0,01
12 meses	N	410,40 ± 101,31	20,30 ± 5,58
	D	232,00 ± 58,40	25,80 ± 6,91
<i>Valor p</i>		<0,01	>0,05

Comentários: O peso corporal do grupo diabético foi significativamente menor que o observado no grupo normal, nos 3 momentos estudados; a ingestão alimentar foi maior nos diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento.

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão dos valores da insulina ($\mu\text{UI/ml}$) e hemoglobina glicosilada (%), e medianas, valores máximos e mínimos da testosterona (ng/dl) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento.

		Insulina sérica ($\mu\text{IU/ml}$)	Hemoglobina glicada (%)	Testosterona (ng/dl)
1 mês	N	40,78 \pm 2,02	3,24 \pm 0,97	192,40 (34,51;669,00)
	D	20,72 \pm 2,25	9,54 \pm 1,33	28,52 (2,79;186,1)
<i>Valor p</i>		<i><0,01</i>	<i><0,01</i>	<i>< 0,01</i>
6 meses	N	42,49 \pm 2,64	3,63 \pm 0,66	65,53 (37,48;404,50)
	D	18,56 \pm 6,75	8,53 \pm 3,21	23,20 (8,62;36,10)
<i>Valor p</i>		<i><0,01</i>	<i><0,01</i>	<i>< 0,01</i>

Comentários: A insulinemia e os níveis séricos da testosterona foram significativamente diminuídos e a hemoglobina glicosilada significativamente aumentada nos ratos diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento.

2. Análise Morfométrica

Na figuras 5, estão representadas as microfotografias do grupo normal e diabético com 1 e 6 meses de seguimento nas quais se observam as alterações dos túbulos seminíferos em graus variados que constaram de: evidente diminuição do diâmetro e do epitélio germinativo, que por vezes se mostrava totalmente atrófico. Nos ratos diabéticos foi observada vacuolização do epitélio em várias áreas.

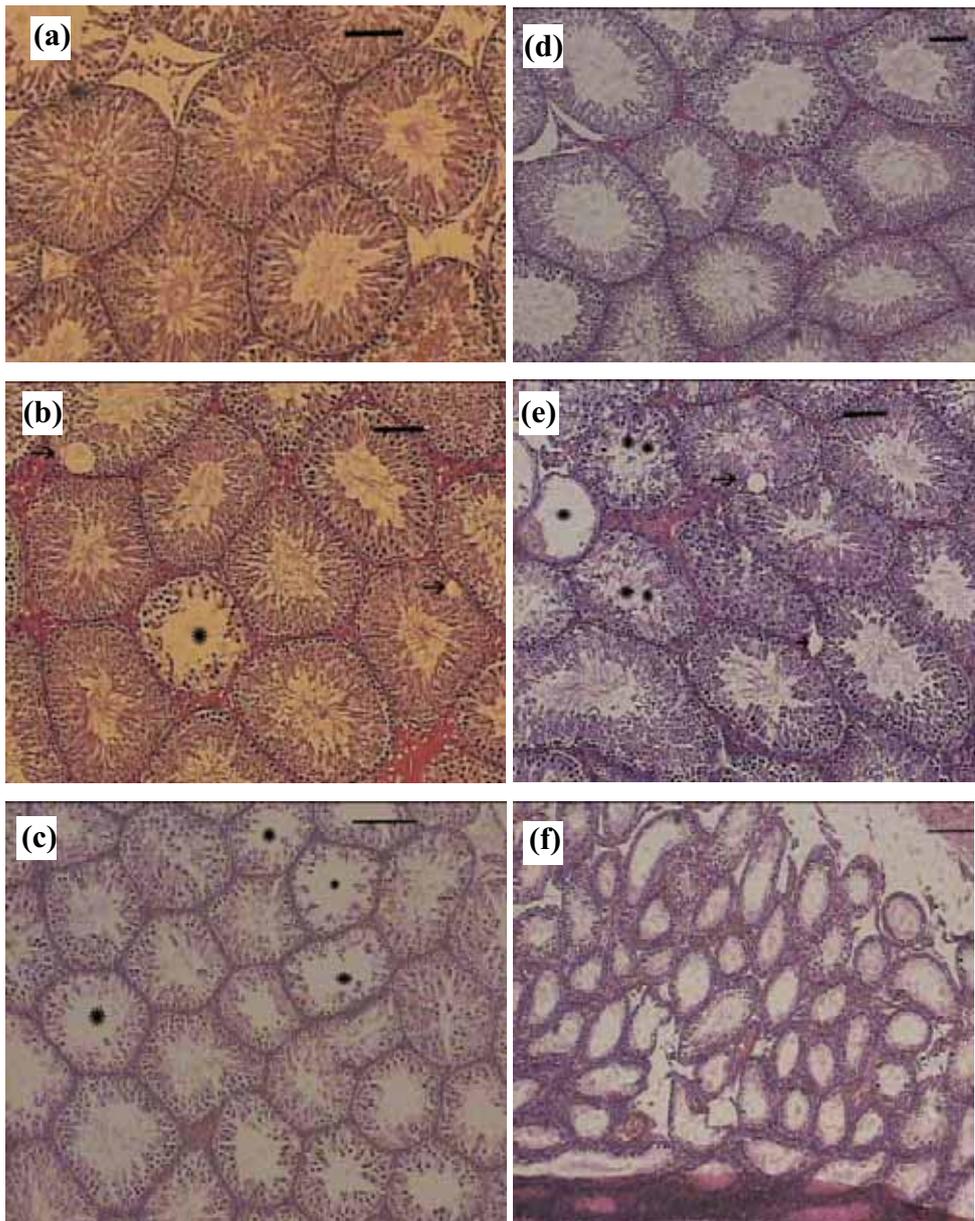


Figura 5: Aparência morfológica de testículos de ratos normais com 1 mês (a) e 6 meses (d) de seguimento: nota-se evidência de espermatogênese no lúmen tubular; (b) vacuolização do epitélio seminífero (→); epitélio seminífero atrófico (*), rato diabético com um mês de seguimento; (c) epitélio germinativo atrófico (*), rato diabético com 1m de seguimento; (e) dois túbulos seminíferos parcialmente atroficos (*), 01 túbulo totalmente atrófico (*), vacuolização de epitélio seminífero (→), rato diabético com 6 meses de seguimento; (f) quase completa perda de epitélio germinativo (atrofia tubular), rato diabético com 6 meses de seguimento. Barra = 100µm.

Os valores obtidos no estudo morfométrico da área total dos túbulos seminíferos (μm^2), área do epitélio(μm^2) e área do lúmen(μm^2) dos animais normais e diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento, constam da tabela 4 com os comentários da análise estatística, e das figuras 6-8.

Tabela 4 - Médias e desvios-padrão da área total (μm^2), área do epitélio (μm^2) e área do lúmen de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento.

		Área total (μm^2)	Área do epitélio (μm^2)	Área do lúmen (μm^2)
1M	N	84434,60±27400,90	61073,00±18723,10	22858,20±12246,70
	D	67265,70±29403,50	47890,90±20743,70	18879,50±11233,50
<i>Valor p</i>		<0,01	<0,01	<0,01
6M	N	86070,20±27433,60	58732,50±18779,30	26823,30±12445,40
	D	60632,10±33721,30	43225,60±25368,40	16890,00±10438,80
<i>Valor p</i>		<0,01	<0,01	<0,01

Comentários: A área dos túbulos seminíferos foi significativamente menor nos ratos diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento. A área do epitélio germinativo foi menor nos ratos diabéticos com 1 mês e 6 meses de seguimento. A área do lúmen foi significativamente maior nos ratos normais com 1 mês e 6 meses de seguimento.

Os valores obtidos da espessura do epitélio, porcentagem de lúmen ou proporção da área de lúmen em relação a área total, porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio em relação a área total e da densidade numérica tubular dos animais normais e diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento constam da tabela 5 com os comentários da análise estatística e das figuras de 9-12.

Tabela 5 - Média e desvio padrão da espessura do epitélio (μm), porcentagem (%) do lúmen ou proporção da área do lúmen em relação a área total, porcentagem (%) do epitélio ou proporção da área do epitélio em relação a área total e densidade numérica tubular ($\#/\text{mm}^2$) de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento.

		Espessura do epitélio (μm)	% lúmen	% epitélio	Densidade numérica tubular ($\#/\text{mm}^2$)
1M	N	77,74 \pm 15,34	26,75 \pm 7,85	73,23 \pm 7,87	6,67 \pm 0,6
	D	59,50 \pm 15,78	28,12 \pm 7,75	71,87 \pm 7,75	8,47 \pm 2,39
<i>Valor p</i>		<0,01	<0,01	<0,01	<0,05
6M	N	74,96 \pm 15,92	31,13 \pm 7,62	68,86 \pm 7,82	6,16 \pm 0,59
	D	50,79 \pm 19,05	30,35 \pm 9,98	69,62 \pm 9,86	8,56 \pm 3,18
<i>Valor p</i>		<0,01	>0,05	>0,05	<0,05

Comentários: A espessura do epitélio germinativo foi significativamente menor nos animais diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento. A porcentagem do lúmen ou proporção da área do lúmen em relação a área total foi maior nos ratos diabéticos com 1 mês de seguimento. Não foi observada alteração significativa desta variável nos ratos diabéticos com 6 meses de seguimento. A porcentagem do epitélio ou proporção da área do epitélio em relação a área total foi menor nos ratos diabéticos com 1 mês de seguimento. Não foi observada alteração significativa nos ratos diabéticos com 6 meses de seguimento. A densidade numérica tubular foi significativamente maior nos animais diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento.

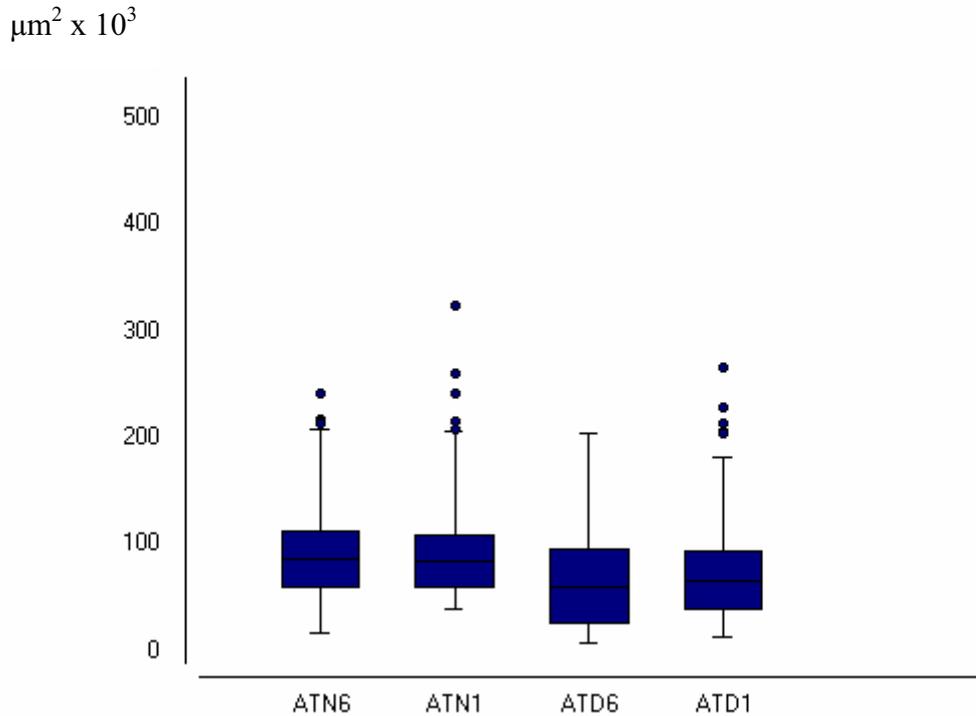


Figura 6 - *Box plot* representando as medidas em micrômetros ao quadrado (μm^2) da área total (AT) de túbulos seminíferos de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios-padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores.

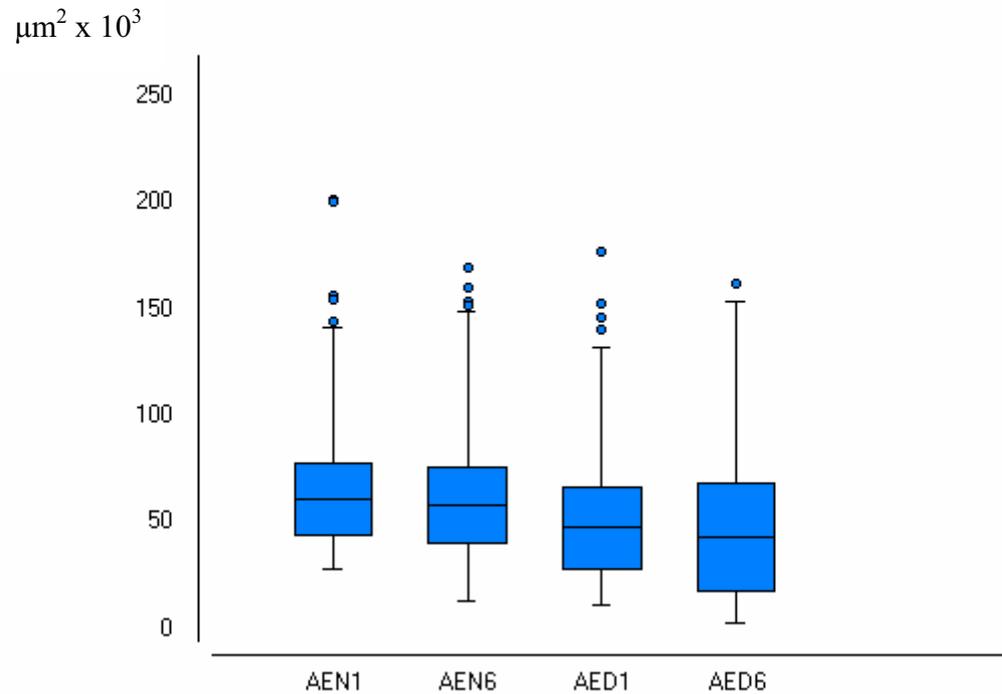


Figura 7- *Box plot* representando as medidas em micrômetros ao quadrado (μm^2) da área do epitélio (AE) de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e os círculos representam os valores extremos.

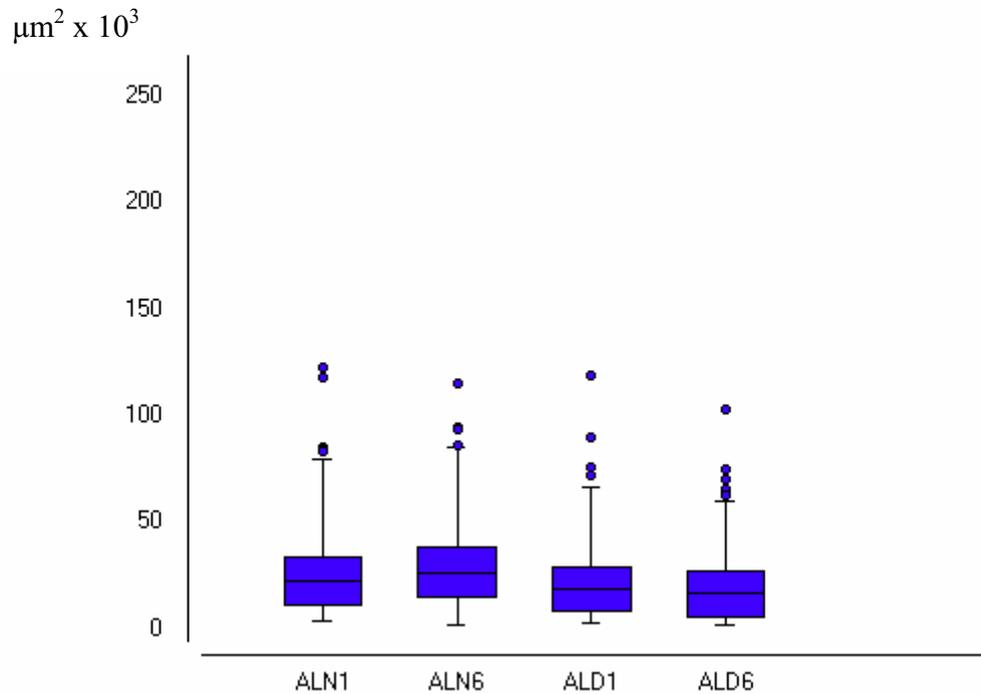


Figura 8- *Box plot* representando as medidas em micrômetros ao quadrado (μm^2) da área do lúmen (AL) de túbulos seminíferos de ratos normais e diabéticos sacrificados após 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e os círculos representam os valores extremos.

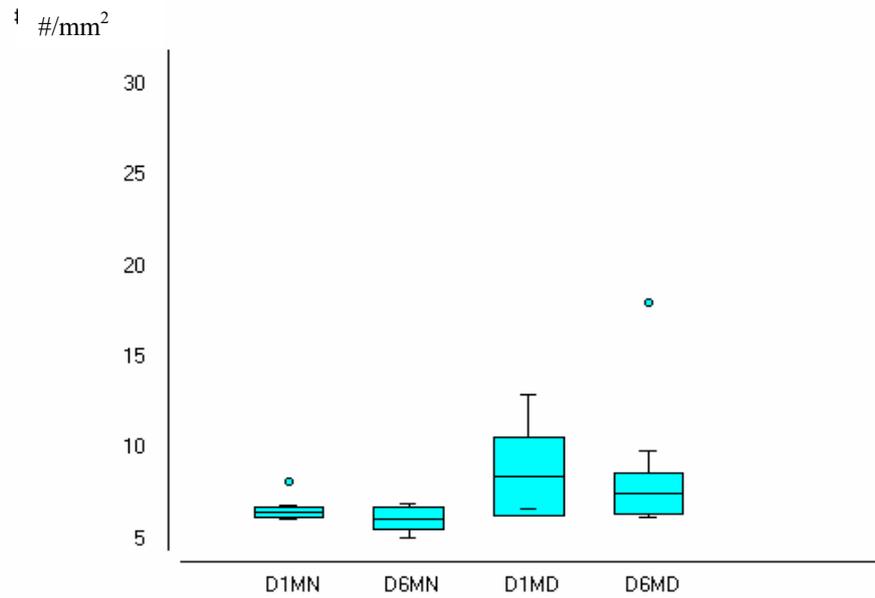


Figura 9 - *Box plot* representando a densidade numérica tubular (D) (número de túbulos/mm²) dos animais normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e os círculos representam os valores extremos.

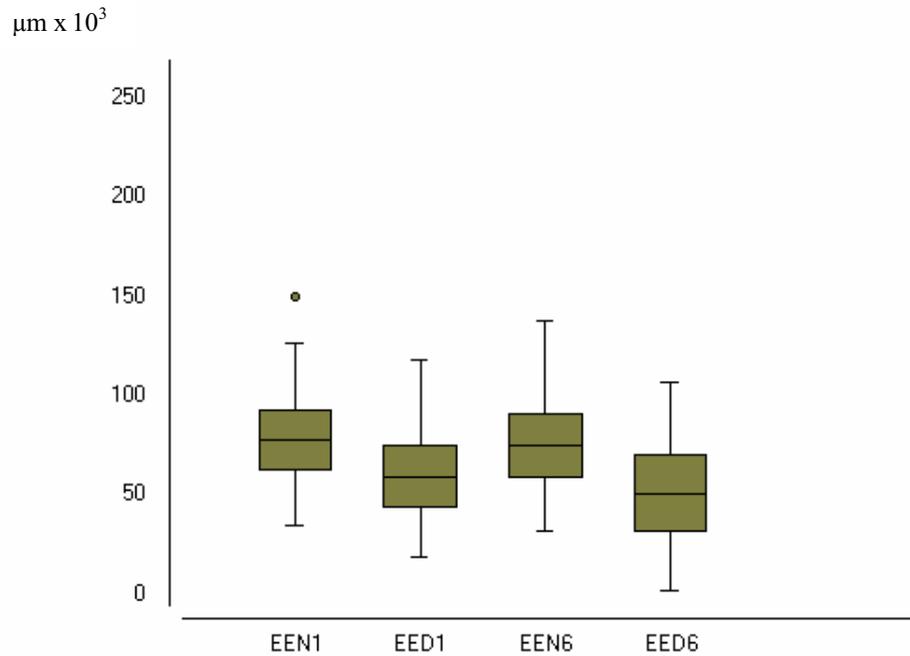


Figura 10- *Box plot* representando a espessura do epitélio (EE) em micrômetros (μm) de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores, e o círculo representa o valor extremo.

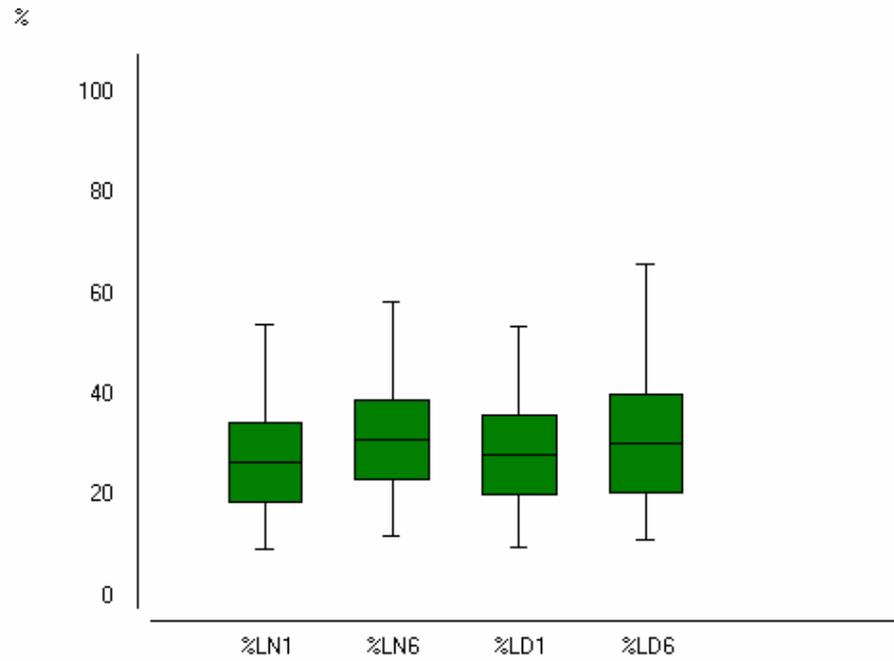


Figura 11 - *Box plot* representando a porcentagem (%L) de lúmen ou proporção da área do lúmen em relação a área total dos túbulos seminíferos de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios- padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores.

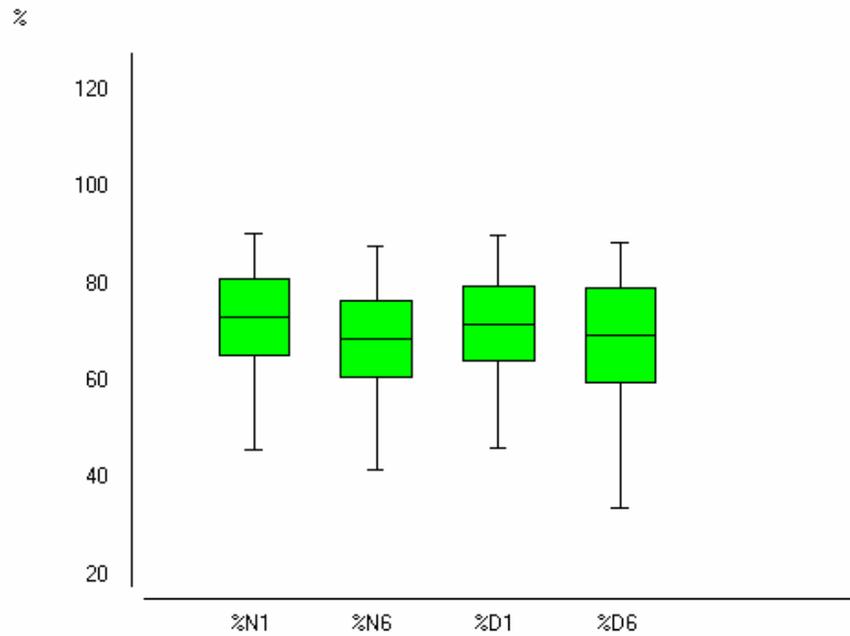


Figura 12 - *Box plot* representando a porcentagem (%) de epitélio ou proporção da área do epitélio em relação a área total dos túbulos seminíferos de ratos normais (N) e diabéticos (D) sacrificados com 1 e 6 meses de seguimento. No *Box*, a linha horizontal central representa a média aritmética dos dados e as linhas horizontais, superior e inferior, os desvios-padrão. As linhas verticais representam os menores e maiores valores.

3. Resultados de Microscopia Eletrônica

3.1 Grupo de ratos com 1 mês de seguimento

Nos animais normais as espermatides redondas apresentavam cromatina nuclear de aspecto normal. As células de Sertoli apresentavam o característico núcleo edentado e nucléolo evidente observando-se grande quantidade de estruturas de espermatozóides de aparência normal.

Nos ratos diabéticos foram observados vacúolos no citoplasma de células de Sertoli e de espermatogonias; e foi detectado, em 1 animal, espermatozóide com alterações no cinturão mitocondrial.

3.2 Grupo de ratos com 6 meses de seguimento

Nos animais normais foi observado grande número de espermatozóides normais, e poucos com defeito no cinturão mitocondrial e múltiplos depósitos de substância escura intracitoplasmática nas células que poderiam ser de lipofucsina.

Nos Ratos diabéticos as mitocôndrias em algumas células apresentavam-se em processo degenerativo, com forma alterada, menor número de cristas e com acúmulo elétron denso nas membranas.

Nesses animais havia vacuolização no citoplasma de espermatogonias, as espermatides redondas apresentavam alteração da forma sendo ovaladas e com cromatina mais rarefeita. Nas células de Sertoli foram detectados vacúolos no citoplasma.

Foram observados com maior frequência nos ratos diabéticos espermatozóides com alterações no cinturão mitocondrial, ou na camada de

fibras densas. Corpos densos com depósitos de substancia escura existiam em maior quantidade do que no grupo controle normal.

O lúmen tubular apresentava menor quantidade de espermatídes em relação ao grupo normal.

3.3 Grupo de ratos com 12 meses de seguimento

O grupo normal apresentava maior quantidade de, depósitos de substancia escura no citoplasma celular de espermatogonia; bem como depósitos maiores, mais densos e mais grosseiros; as espermatides redondas eram de aparência normal.

A maioria dos espermatozóides observados era normal, mas observou-se com maior freqüência do que no grupo normal aos 6 meses alterações nas fibras densas dos espermatozóides ou na camada de mitocôndrias.

Nos ratos diabéticos foram detectados núcleos apoptóticos em espermatogonias e espermatócitos configurando morte celular caracterizada pela cromatina nuclear formando uma massa densa. Com maior freqüência foram observados espermatozóides com defeitos na camada de fibras densas na de mitocôndrias ou no complexo axonêmico e menor quantidade intra luminal de espermatozóides. Algumas espermatídes redondas apresentavam vacúolos no núcleo.

Um aspecto característico nos animais diabéticos de 12 meses, foi o acumulo de substância escura provavelmente lipofucsina formando depósitos densos nas células em maior quantidade do que a observada nos ratos normais de 12 ou nos diabéticos de 6 meses de seguimento; outro

aspecto característico foi a formação de vacúolos no citoplasma das células. Não foram observados núcleos apoptóticos nos ratos normais de 12 meses, mas substância escura com lipofucsina em quantidade menor do que a encontrada nos diabéticos.

As figuras de 13 a 17 demonstram estas alterações.

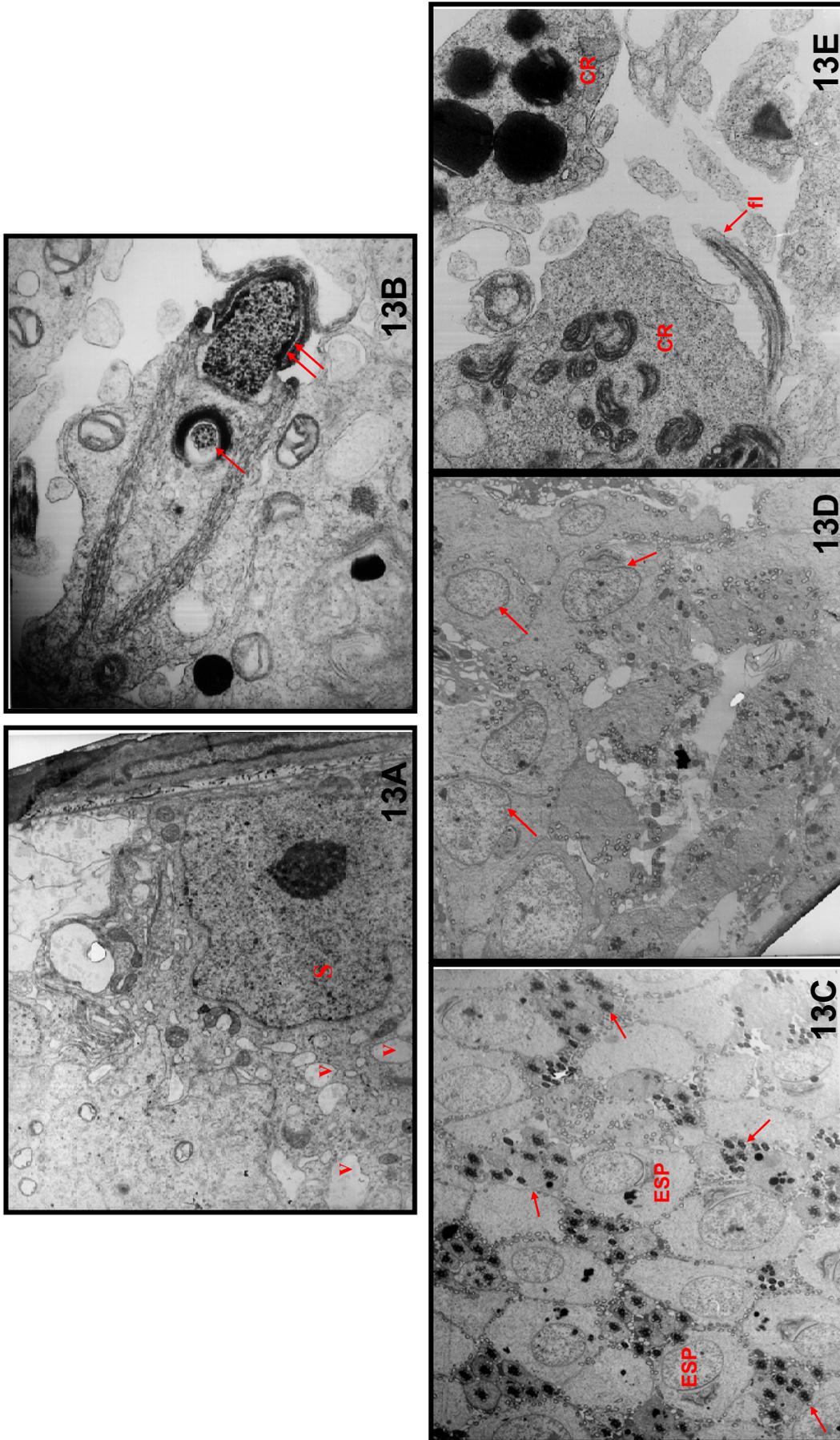


Figura 13 – Ratos normais e diabéticos com 1 mês de seguimento

13A – Célula de Sertoli (S) com vacúolos (V) no citoplasma (9750x). Rato diabético.

13B – Região intermediária de uma espermatíde madura (espermatozóide) com a normalidade na capa de mitocôndrias (23000x).

13C – Espermatídes em estágio 1 (ESP) e ilhas de espermatozóides (flechas) normais (3250x). Rato normal.

13D – Espermatídes em estágio 1 (flechas) com poucos espermatozóides (2450x). Rato diabético.

13E – Corpos residuais (CR) com mitocôndrias e depósitos escuros. Corte de flagelo de espermatozóide no lúmen. (42000x) Rato diabético.

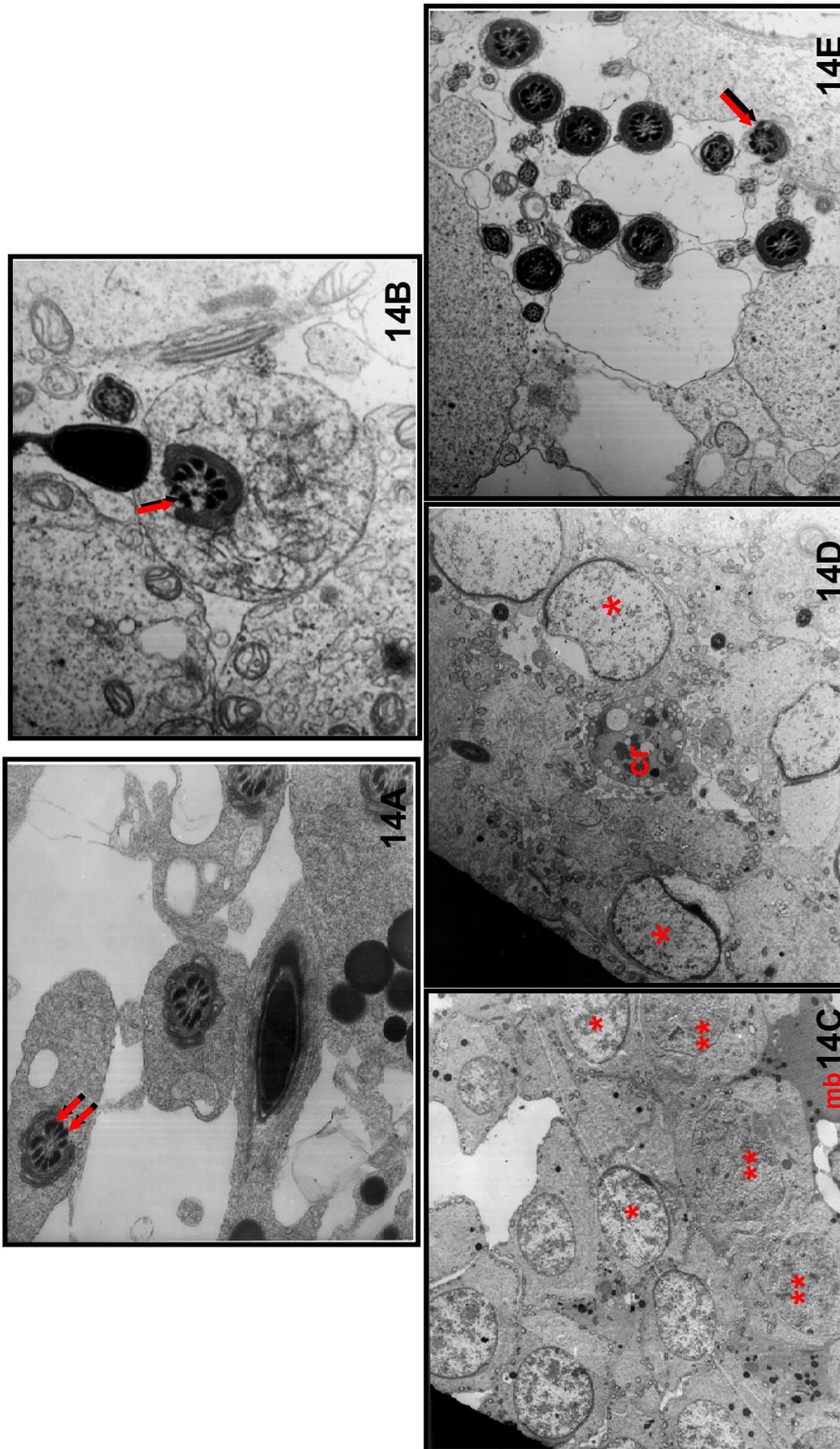


Figura 14 – Ratos normais e diabéticos com 6 meses de seguimento

- 14A** – Cauda de espermatozóide com falta de camada completa de mitocôndrias (flechas duplas) (17000x). Rato normal.
14B – Defeito na camada de fibras densas e na de mitocôndrias (flecha) em espermatozóides (23000x). Rato diabético.
14C – Espermatídes redondas com acrosoma (*) de aspecto normal. 3 células germinativas (espermatócitos) (***) de aspecto normal. Membrana basal (mb) do túbulo seminífero. (3250x). Rato normal.
14D – Espermatídes redondas em transformação (*) com modificação do acrosoma. Corpo residual (CR) contendo material denso e restos celulares (4350x). Rato diabético.
14E – Região da cauda de espermatozóide com defeito na capa de mitocôndrias (13250x). Rato diabético.

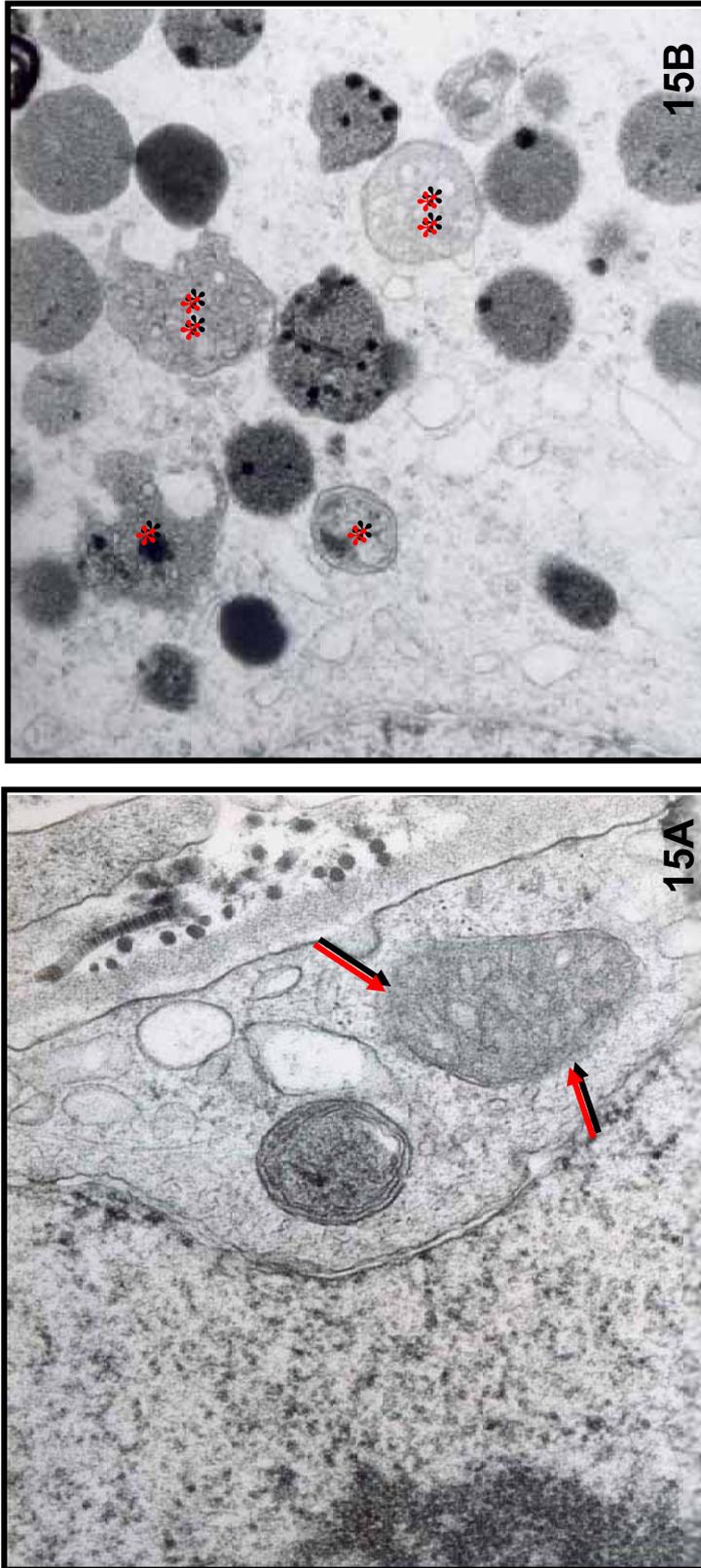


Figura 15 – Ratos normais e diabéticos com 6 meses de seguimento.

15A - Mitocôndria com irregularidade nas membranas (envelope) (57.500x). Rato normal.

15B - Mitocôndrias com forma alterada e diminuição do número de cristas (**); e com acúmulo elétron denso nas membranas. Aumento de (42.000x). Em rato diabético.

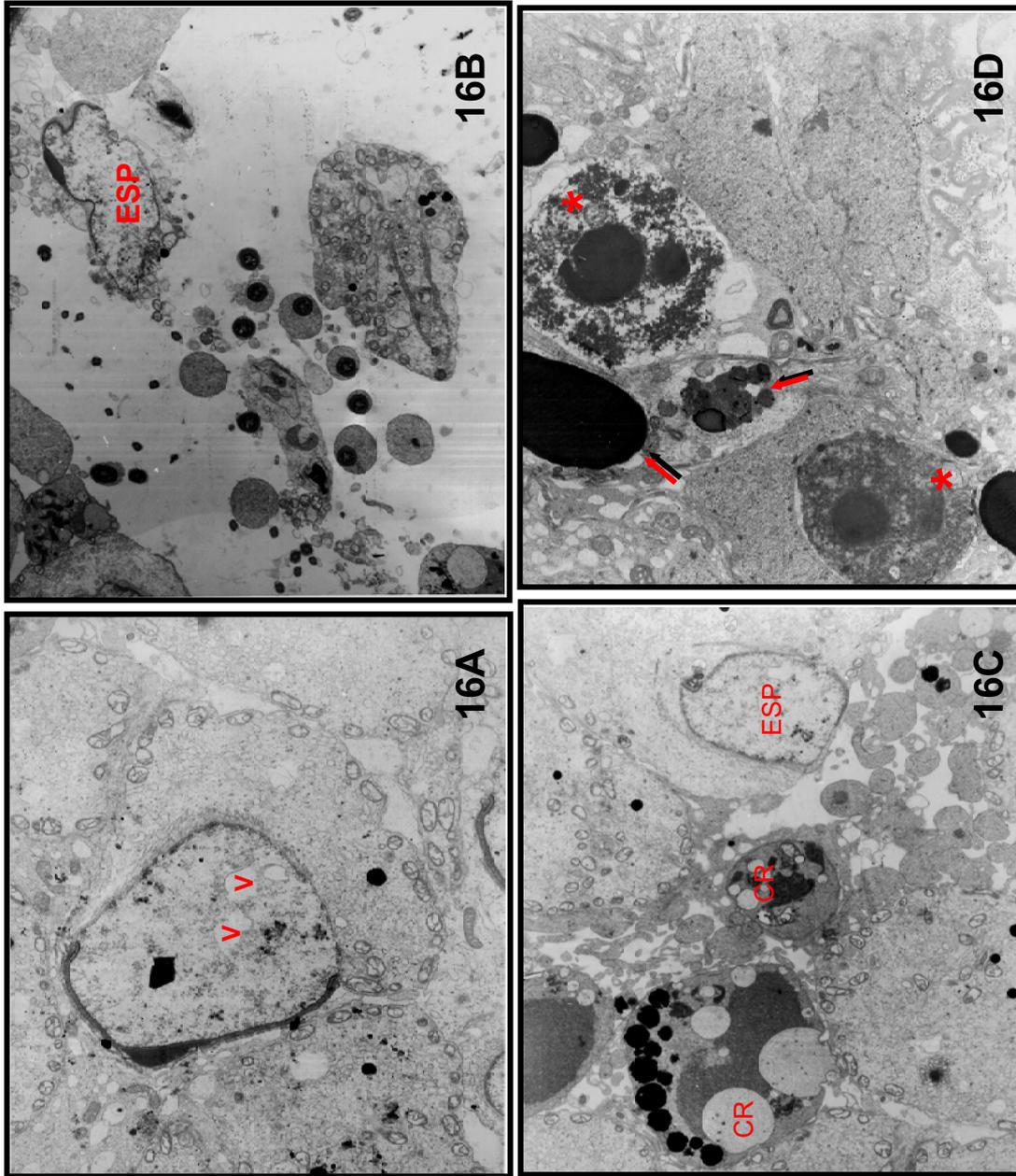


Figura 16 - Ratos normais e diabéticos com 12 meses de seguimento

16A – Espermatócito com vacúolos (v) no núcleo que contém cromatina pouco condensada (3250x). Rato diabético.

16B – Espermátide com acrosoma (ESP) e cromatina pouco densa liberada precocemente na luz tubular. Poucos espermatozoides no lúmen (4350x). Rato diabético.

16C – Corpos residuais (CR) redondos com vacúolos circulares e substância escura no lúmen. Espermátide com acrosoma pouco evidente e cromatina pouco densa (ESP) (5750x). Rato diabético.

16D – Duas células germinativas (*) notam-se massas de cromatina e depósitos de substância escura em grânulos (flecha) (5750x). Rato diabético.

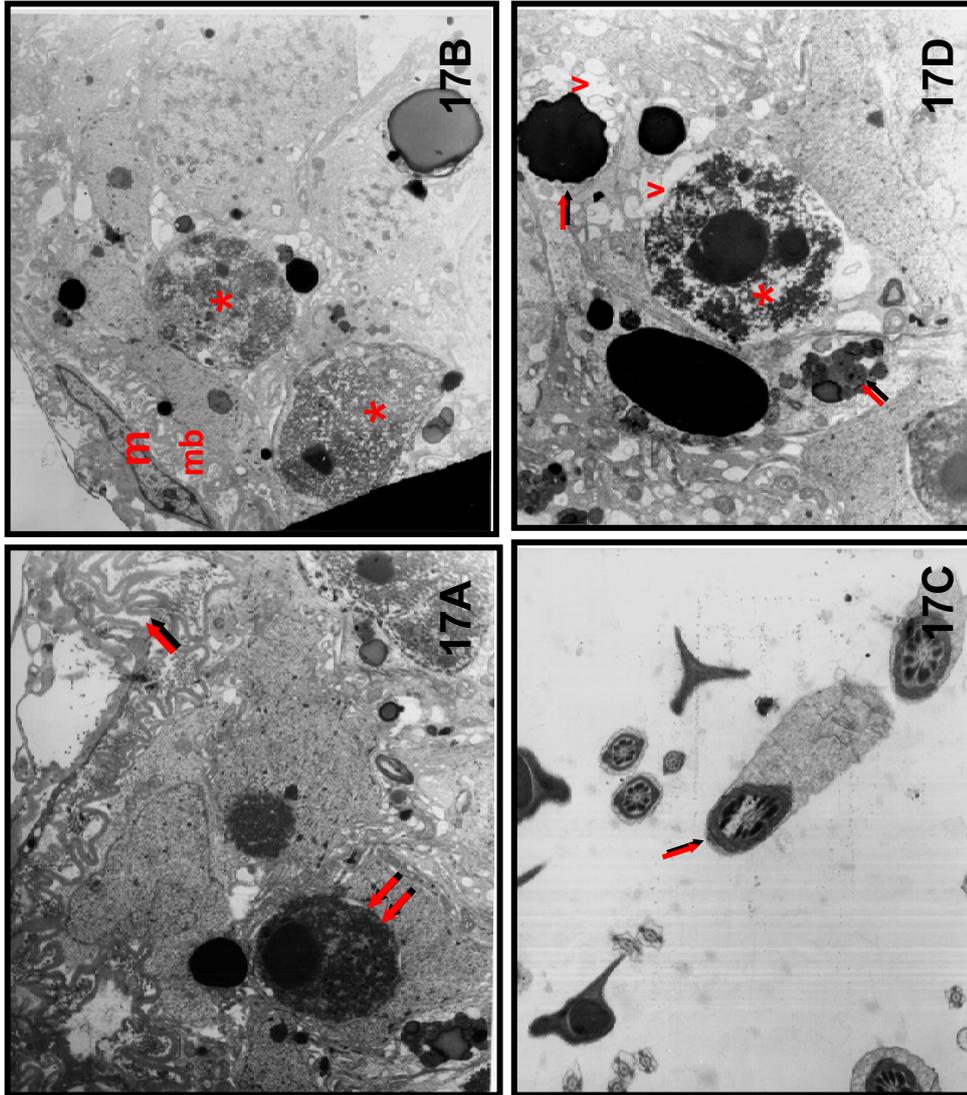


Figura 17 - Ratos diabéticos com 12 meses de seguimento

- 17A** – Espermatogonias degeneradas (flechas duplas). Depósitos escuros (flechas duplas). Membrana basal aparentemente espessada (flecha) (5750x).
17B – Dois espermatócitos degenerados (*) com a cromatina muito densa ao lado de espermatócitos normais (N). São observados dois núcleos de célula de Sertoli e célula mióide (m) abaixo da membrana basal espessada (mb) (4350x).
17C – Espermatozóide com grande defeito na camada de fibras densas (flecha) (13250x).
17D – Vacuolização citoplasmática de espermatogonias e células de Sertoli (v). Depósitos grosseiros de substância escura (flecha). Núcleo celular (*) com intensa alteração da cromatina (degeneração nuclear) (7750x).

Discussão

1- Quanto ao Estudo Morfométrico

O critério adotado neste estudo para obtenção da área tubular e epitelial do tecido testicular de ratos normais e diabéticos baseou-se no estudo de Chen ET AL⁵⁸ que estudaram o efeito do transplante pancreático duodenal sobre as lesões testiculares em ratos diabéticos aloxânicos. Os autores calcularam a área tubular após obterem soma de pontos correspondentes ao epitélio germinativo, lúmen tubulares, usando ocular com uma rede de 121 pontos acoplada ao microscópio. Neste estudo a área tubular foi registrada pelo sistema computadorizado acoplado ao microscópio. Os cálculos da densidade numérica tubular e da porcentagem do lúmen dos túbulos seminíferos foram determinados de acordo com o estudo de Chen e cols⁵⁸. Quanto ao número de túbulos analisados adotou-se número 100 ou próximo de 100 estabelecido por Anderson & Thliveris⁴⁷ que pesquisaram o diâmetro tubular, a histologia e o estágio da espermatogênese dos túbulos seminíferos de ratos diabéticos pela streptozotocina. Para o estudo da espessura do epitélio adotou-se o critério desses autores que mediram o diâmetro tubular em túbulos seminíferos mais redondos ao acaso tomando-se 5 regiões de todo testículo. Neste estudo, mediu-se a menor distância entre a membrana e o lúmen dos túbulos seminíferos escolhendo-se os mais arredondados ao acaso, tomando-se todo o testículo.

Utilizando esta metodologia observamos que a área tubular, a espessura e área epiteliais são menores nos animais diabéticos e que a

densidade numérica tubular é maior; esta redução do tamanho dos túbulos seminíferos esta de acordo com várias observações da literatura.

Toda a área dos túbulos nos ratos diabéticos é menor; a área do lúmen nos ratos diabéticos também foi menor do que a dos ratos normais e a obtenção dos valores da proporção da área do lume em relação à área total (ou porcentagem do lúmen) foi feita para demonstrar o tamanho relativo do lúmen nos túbulos.

Não foi observado aumento significativo da porcentagem de lúmen nos animais diabéticos sacrificados após 6 meses; este resultado também foi obtido por Chen e cols⁵⁸.; enquanto que Schöffling ET AL³⁴ em ratos aloxanicos observaram aumento do lumen tubular e diminuição do epitélio.

A densidade tubular aumentada nos ratos diabéticos é explicada pelo menor tamanho dos túbulos proporcionando maior número de túbulos por campo microscópico.

O presente estudo demonstrou diminuição da altura do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos após indução do diabetes, dados que estão de acordo com a maioria das publicações anteriores^{34,36,59} e com a de Oksanen e cols.³⁵ que descreveram esta alteração desde o 1º mês após indução. Ricci G. e cols.⁶⁰ e Gunelli E e cols.⁶¹ encontraram diâmetro reduzido dos túbulos seminíferos também precocemente após indução: 2 e meio e 3 e meio meses após.

O nível de testosterona diminuído desde 1 mês após o diabetes, devido aos efeitos da hiperglicemia e stress oxidativo sobre as funções das células de Leydig é uma alteração precoce em animais diabéticos e seus

níveis se correlacionam com a intensidade de túbulos seminíferos lesados.^{61,38,60}; ratos diabéticos pela Streptozotocina 3 semanas após indução apresentaram diminuição da testosterona, alteração do comportamento copulatório, diminuição da fertilidade, das espermátides e da mobilidade dos espermatozóides³⁸. Em ratos normais em experimento com células de Leydig isoladas, demonstrou-se que a perda da capacidade esteroidogênica resulta da menor atividade das enzimas antioxidantes destas células, com o aumento da idade havendo peroxidação lipídica nas células de Leydig nos ratos mais velhos (20 meses)^{62,63}. Nos animais com 6 e 12 meses de seguimento diabéticos a microscopia eletrônica evidenciou maior quantidade de espermátides com defeitos na capa de mitocôndrias ou na de fibras densas do que nos animais normais.

Essas são alterações encontradas em ratos normais com o dobro da idade dos animais deste estudo: 22 meses e em hamsters com 24 meses^{64,65}. Essas anormalidades provavelmente refletem a disfunção da espermatogênese causada pelo diabetes.

Espermátides com mitocôndrias com defeitos não só produzem ATP de forma menos eficiente como também geram stress oxidativo maior e declínio da fertilidade⁶⁶.

Considera-se que as mitocôndrias são a fonte principal de radicais livres de oxigênio nas células e sua disfunção se relaciona intrinsecamente às alterações provocadas pelo diabetes^{17,67}.

As mitocôndrias compreendem em média 15-22% do total do volume celular e produção de 90% da energia necessária que é gerada por fosforilação oxidativa resultando na formação de ATP⁶⁸.

Tem sido encontrada menor produção de ATP nos testículos de ratos diabéticos após 3 meses de diabetes,⁶⁹ estudo de função mitocondrial com isolamento dessas organelas não indicou alterações graves de função que expliquem a espermatogênese alterada; entretanto esses estudos não foram realizados em fases mais tardias da indução do diabetes^{70,71}.

2. Quanto ao Estudo à Microscopia Eletrônica

O exame à microscopia eletrônica baseou-se no estudo de Richardson e cols⁷² que estudaram o efeito da idade sobre a membrana basal nos testículos de ratos normais dos 6 aos 32 meses de idade. Os autores fotografaram 3 a 4 túbulos e examinaram várias regiões de cada túbulo seminífero. Em nosso estudo foram obtidas micrografias de 2 a 3 túbulos de cada subgrupo de animais, sendo várias regiões de cada túbulo examinadas.

As graves alterações da espermatogênese resultando em espermatídes anormais no 6º e 12º meses pós indução, se devem a disfunção mitocondrial progressiva provocada pelo diabetes provavelmente.

Detectou-se degeneração e morte celular em espermatogônias e espermatócitos aos 12 meses após indução do diabetes; o aspecto destas células em apoptose tardia são semelhantes as encontradas em camundongos não obesos diabéticos de 4 – 5 meses na fase de insulite⁴⁴.

Em ratos diabéticos pela streptozotocina utilizando-se ensaio que envolve a deoxinucleotidiltransferase (técnica Tunel) a apoptose celular pode ser detectada em 3 - 6 meses pós indução^{73,61}.

São condições de morte com apoptose celular em testículos de ratos o nível baixo de testosterona, irradiação e substâncias tóxicas^{74,75,76}. em algumas cepas de ratos diabéticos, a regulação alterada dos hormônios luteinizante e folículo estimulante^{77,78}.

Outro fator implicado é o stress oxidativo determinado pela hiperglicemia causando redução dos antioxidantes endógenos e elevação da formação de superóxido, hidroxila, peroxila com lesão de proteínas e do DNA celular^{79,80}. O emprego de melatonina com propriedades antioxidantes diminui a apoptose de células germinativas e a peroxidação lipídica em ratos diabéticos pela estreptozotocina^{81,61,82}.

O processo apoptótico decorre do aumento da permeabilidade da membrana interna das mitocôndrias e liberação de fatores como o citocromo C que ativa a cascata apoptótica: caspase e protease intracelular resultando em morte celular^{83,84}. A apoptose foi provavelmente desencadeada pela associação da privação da testosterona associada ao stress oxidativo de longo período nas células germinativas; neste estudo foram observadas desde os 6 meses de seguimento, comprometimento das mitocôndrias à ultraestrutura.

As células de Sertoli apresentaram vacuolização a partir do 1º mês após indução do diabetes. Estas células são necessárias a espermatogênese por produzirem substâncias necessárias a sobrevivência

das células germinativas e formam um meio essencial no compartimento ad luminal para a adequada espermatogênese⁸⁵.

A Ocludina uma das proteínas da junção celular firme Sertoli-Sertoli, formando a barreira sangue testículo que é fundamental para a espermatogênese está diminuída ou ausente em túbulos seminíferos 4 meses e meio após indução do diabetes^{86,60}.

As células de Sertoli produzem glicoproteínas, citocinas e proteases necessárias a espermatogênese⁸⁵.

Pode-se especular que a importante vacuolização dessas células comprometeram sua função de proporcionar fatores nutrientes e regulatórios às células germinativas tendo como consequência uma espermatogênese alterada com maior número de espermatozóides com defeitos e menor número de espermatozóides.

O acúmulo de substância escura eletrodensa no citoplasma celular e corpos residuais pode ser lipofucsina, pigmento insolúvel composto de polímeros de lipídios, metais e fosfolipídios complexados com proteína resultante da peroxidação de lipídios, que aumenta nas células com a idade, principalmente nos neurônios e músculo cardíaco, fibras de músculos esqueléticos e células pigmentares da retina^{87,88}.

Acumulo semelhante de lipofucsina foi descrito por Calvo & colaboradores em epidídimo de hamsters normais com 24 meses de idade⁸⁹. Nesse estudo detectou-se nos animais diabéticos, deposição mais intensa e densa de lipofucsina, principalmente após 12 meses. A lipofucsina se origina de grande variedade de estruturas celulares e habitualmente se acumula nos

lisossomas com a idade; os lisossomos que embora tenham as enzimas lisossomiais não a degradam por ser esta uma substância indegradável⁹⁰.

A autofagocitose de mitocôndrias parece ser o maior fator que contribui para a formação de lipofucsina⁹⁰.

A capacidade degradativa diminui com a idade em todas as células, mas o acúmulo de lipofucsina é primariamente observado nas células pós mitóticas⁹¹.

O stress oxidativo tem evidentes efeitos sobre a lipofucsinogênese⁹². O mecanismo proposto por Brunk & Terman⁹³ indica que o superóxido (O₂), produto gerado da respiração mitocondrial é convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela superóxido dismutase mitocondrial (SOD2) e então na presença de ferro ferroso (Fe²⁺⁺) se transforma no radical hidroxila (HO) que altamente reativo, ataca as macromoléculas ao redor causando sua modificação oxidativa enquanto o H₂O₂ difunde amplamente na célula. As macromoléculas oxidadas entram no lisossoma e neste local há formação de radicais hidroxila (HO) que causam outra lesão oxidativa do material resultando em lipofucsina que não é degradável.

A figura 18 abaixo ilustra esse mecanismo.

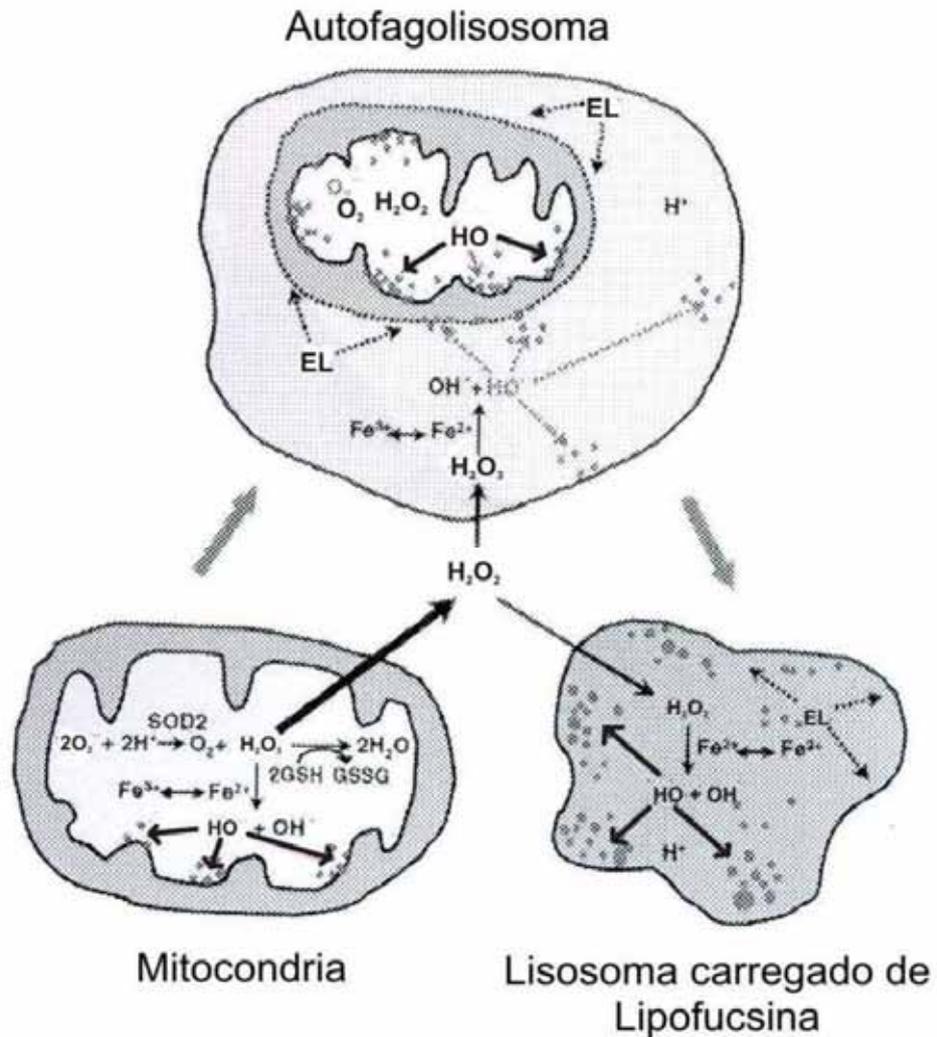


Figura 18 -Esquema ilustrativo do mecanismo básico de formação de Lipofuscina
SOD2 – Superóxido Dismutase, EL – Enzimas Lisosomiais. Adaptado de Brunk & Terman⁹³

A lesão celular pelo acúmulo de lipofuscina decorre devido a grande quantidade de ferro, a qual facilita a geração de radicais livres de oxigênio desestabilizando os lisossomas que lesam a célula por liberação dos radicais livres ou das enzimas hidrolases⁹³.

Seu efeito tóxico foi demonstrado em cultura de fibroblastos a qual com adição de lipofuscina e seu acúmulo causava morte das células

rapidamente. Sugeriu-se que este acúmulo diminui o turnover protéico celular e a meia vida das mitocôndrias ocasionando degeneração e morte celular⁹⁴.

Consideradas em conjunto nossas observações indicam que o diabetes causa direta ou indiretamente comprometimento progressivo das células de Sertoli e das células germinativas, queda dos níveis de testosterona e espermatogênese alterada evidenciada por defeitos nos espermatozóides e menor número que se acentua com a duração do estado diabético, culminando com morte celular e depósitos intensos e grosseiros de polímeros de lipídios e fosfolípidos (lipofucsina) nas células os quais aceleram a degeneração celular.

Evidente morte celular foi detectada ultra estruturalmente 12 meses após indução do diabetes neste modelo de diabetes aloxânico.

Podemos afirmar que o estado diabético determinou alterações estruturais significativas do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos e queda da síntese de testosterona precocemente e que a permanência do estado diabético por período de 12 meses associado à deposição de lipofucsina determinaram alterações celulares graves culminando com apoptose celular.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, concluímos que:

- 1- A aloxana a 2% na dose de 42mg/kg de peso corporal, induziu o quadro de diabetes experimental no rato, diagnosticado por hiperglicemia, hipoinsulinemia e aumento da hemoglobina glicada, alterações clínicas evidentes quanto ao peso, ingestão hídrica e diurese.
 - 2- Os túbulos seminíferos dos animais diabéticos com 1 e 6 meses de seguimento demonstraram menor espessura do epitélio germinativo e atrofia do epitélio germinativo.
 - 3- Os animais diabéticos demonstraram redução dos níveis da testosterona sanguínea.
 - 4- O estado diabético determinou apoptose de células germinativas.
 - 5- O estudo morfométrico e ultraestrutural, mostraram-se de grande valia para caracterização das lesões testiculares no diabetes.
-

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization Diabetes. Genova. 2009. [Fact Sheet, 312].
 2. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. [Internet] Cuidado com a Saúde. O que é Diabetes? www.endocrinologia.com.br. [Acesso 02 de dezembro de 2010].
 3. Ministério da Saúde. Portal Saúde. Dia Mundial do Diabetes. Unidos pelo diabetes. [Internet]. www.saude.gov.br. [Acesso em 02 de dezembro de 2010.]
 4. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engeugau MM, Rios-Burrows N, Geiss LS, Valdez R. Type 2 diabetes among North American children and adolescents. *J Pediatr*. 2000; 136:664-72.
 5. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescent. *Diabetes Care*. 2000; 23: 381-9.
 6. Kitagawa T, Owada M, Urakami T, Tajima N. Epidemiology of type 1 diabetes mellitus (insulin-dependent) and type 2 diabetes mellitus (non-insulin dependent) in Japanese children. *Diabetes Res Clin Prat*. 1994; 24 (suppl): s7-13.
 7. Gortmaker SL; Dietz WH, Sobol AM, Weber CA. Increasing pediatric obesity in the United States. *Am J Dis Child*. 1987;141: 535-40.
 8. Campaigne B N, Morrison JAS, Schumann BC, Falkner F, Lakatos E, Sprecher D et al. Indexes of obesity and comparisons with previous national survey data in 9-and 10-year old black and white girls. *J Pediatr*. 1995;124:675-80.
 9. Rubin A. Studies in human reproduction: IV. Diabetes mellitus and seminal deficiency. *Am J Obstet Gynecol*; 1962; 83: 20-2.
 10. Schoffling K. Federlin K, Ditschuneit N, Pfeiffer, EF. Disorders of sexual function in male diabetics. *Diabetes*. 1963;12:519-27.
 11. Rodrigues-Rigau L.J. Diabetes and male reproductive function. *J Androl*. 1980;1:105-10.
 12. Fairburn C G, McCulloch DK, WU FC. Diabetes and male sexual function. *Clin Endocrinol Metab*. 1982;11: 749-67.
 13. Cameron D F, Murray FT, Drylie D D. Interstitial compartment pathology and Spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec*. 1985; 213:53-62.
-

14. Handelman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Yue DK, Turtle JR. Testicular function and glycemic control in diabetic men. A controlled study. *Andrologia*. 1985; 17: 488-96.
 15. Faerman I, Vilar O, Rivarolo MA, Rosner JM, Jadzinsky MM, Fox D, Lloret AP, Berstein-Hahn S D. Impotence and Diabetes. Studies of androgenic function in diabetic impotent males. *Diabetes*. 1972; 21:23-30.
 16. Suoranta H. Changes in the small blood vessels of the adult human testis in relation to age and to some pathological conditions. *Virchows Arch (A)*. 1971; 352:165-181.
 17. Vermeulen A, Rubens R, Verdonk L. Testosterone secretion and metabolism in male senescence. *J Clin Endocrinol Metab*. 1972; 34:730-735.
 18. Dinulovic D, Radonjic G. Diabetes mellitus/ male infertility (review). *Arch Androl*. 1990; 25:277-293.
 19. Sexton W J, Jarow J P. Effect of Diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology*. 1997; 49: 508-513.
 20. Rehman K, Beshay E, Carrier S Diabetes and Male Sexual function. *J Sex Reprod Med*. 2001; 1:29-33.
 21. Musickl B, Burnett AL. Endothelial dysfunction diabetic erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2007; 19:129-138.
 22. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003; 26:1589-96.
 23. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: 813-820.
 24. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy M A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003; 79:829-843.
 25. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue S, Yonekawa H, Hayashi J. Mitochondria-related male infertility. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103:15148-53.
 26. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod*. 1989; 41:183-97.
-

27. Chen C S, Chao HT, Pan RL, Wei YH. Hidroxyl radical induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. *Biochem Mol Biol Int.* 1997; 43:291-303.
 28. Kao SH, Chao HT, Wey YH. Multiple detection of mitochondrial DNA associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Rep.* 1998; 4:657-66.
 29. Kaemmerer H, Mitzkat HJ. Ion change chromatography of aminoacids in ejaculate of diabetes. *Andrologia.* 1985; 17:485-87.
 30. Wei JH, Kao SH. Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and motility of human sperm. *Zool Stud.* 2000; 39:1-12.
 31. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, Lewis SE. Insulino dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod.* 2007; 22:1871-7.
 32. Foglia VG, Rosner JM, Ramos MCP, Lema BE. Sexual disturbances in the male diabetic rat. *Horm Metab Res.* 1969; 1:72-7.
 33. Hunt EL, Bailey DW. The effects of alloxan diabetes on the reproductive system of young male rats. *Acta endocr.* 1961; 38:432-40.
 34. Schöffling K, Federlin K, Schmidt W, Pfeiffer EF. Histometric investigations on the testicular tissue of rats with alloxan diabetes and chinese hamsters with spontaneous diabetes. *Acta Endocr.* 1967; 54:335-46.
 35. Oksanen A. Testicular lesions of streptozotocin diabetic rats. *Horm Res.* 1975; 6:138-44.
 36. Rossi GL, Aeschlimann M. Morphometric studies of pituitary glands and testes in rats with streptozotocin – induced diabetes. *Andrologia.* 1982; 14:535-42.
 37. Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrino-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol.* 1987; 138:190-4.
 38. Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin – induced hyperglycemia in rats. *J Androl.* 2006; 29:482-8.
 39. Wright WW, Fiore C, Zirkin BR. The effect of Aging on the Seminiferous Epithelium of the Brown Norway Rats. *J Androl.* 1993; 14:110-7.
-

-
40. Horn R, Pastor LM, Moreno E, Calvo A, Canteras M, Pallares J. Morphological and morphometric study of early changes in the ageing golden hamster testis. *J Anat.* 1996;188:109-17.
 41. Calvo A, Pastor LM, Martinez E, Vasquez JM, Roco J. Age-related changes in the Hamster Epididymus. *Anat Rec.* 1999; 256:335-46.
 42. Levy S, Serre V, Hermo L, Robaire B. The effect of ageing on the seminiferous epithelium and the blood-testes barrier of the Brown-Norway. *Rat J Androl.* 1999;20: 356-65.
 43. Gondos B, Bevier W. Effect of Insulin on Testicular alterations in the nonobese diabetic mouse. *Ann Clin Lab Science.* 1995; 25:272-6.
 44. Sainio-Pollanen S, Henriksen K, Parvinen M, Simell O, Pollanen P. Stage specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice. *Int J Androl.* 1997; 20:243-53.
 45. Orth JM, Murray FT, Bardin CW. Ultrastructural changes in Leydig cells of streptozotocin – induced diabetic rats. *Anat Rec.* 1979;195:415-30.
 46. Paz G, Homonnai ZT. Leydig cell function in streptozotocin induced diabetic rats. *Experientia.* 1979; 35:412-3.
 47. Anderson JE, Thliveris JA. Morphometry and Cytochemistry of Leydig cells in experimental diabetes. *Am J Anat.* 1987; 180:41-8.
 48. DaDoune J, Demoulin A. Structure and functions of testis In: Thibault C, Lévassieur MC, Hunter RHF. *Reproduction in mammals and man Paris.*: Ellipses. 1993; cap 13 p227-255.
 49. Mello FPS. Endocrinologia da reprodução do macho – Seminário – PG Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004; p 1-17.
 50. McClure RD. Endocrine investigation and therapy. *Urol Clin North Am.* 1987;14:471-88.
 51. Heller CG, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium. *Recent Horm Res.* 1964; 20:545-75.
 52. Stabenfeldt GH, Edqvist L. Processos reprodutivos do macho. In: Swenson MJ; Reece W-O. *Dukes - fisiologia dos animais domésticos.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA. 1996; cap 35: pg 603-14.
 53. Johnson L. Spermatogenesis. In: Cupps PT. *Reproduction in domestic animals.* San Diego: Academic Press Inc. 1991; Cap 5: p174-220.
-

-
54. O'Donnel L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001; 22(3): p289-318.
 55. Ozaki-Kuroda K, Nakanishi H, Otha H et al. Nectin couples cell-adhesion and the ctin scaffold at heterotypic testicular junctions. *Curr Biol.* 2002; 12:1145-50.
 56. Mruk D, Cheng CY. Sertoli cell proteins in testicular paracrine. In: Jegou B, Pineau C, Salz Jeds. *Testes Epididymis and Technologies in the year 2000.* Heidelberg Germany: Springer-Verlag. 2000; 197-228.
 57. ZAR JH. *Biostatistical analysis.* 4th ed Prentice Hall New Jersey 1999; 663.
 58. Chen C, Scott MH, Wolf PL, Moossa AR, Haghghi P, Lee S. Effects of Pancreaticoduodenal allografts on Diabetic Testicular Lesions in the Rat. *J Clin Lab Analysis.* 1988; 2:7-15.
 59. Anderson JE, Thliveris JA. Testicular histology in streptozotocin – Induced Diabetes. *Anat Rec.* 1986; 214:378-82.
 60. Ricci G, Catizone A, Esposito R, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia.* 2009; 41:361-8.
 61. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaber S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res.* 2008; 40:354-60.
 62. Luoi L, Chen H, Trush MA, Show MD, Anway MD, Zirkin BR. Ageing and Brown Norway Rat Leydig Cell Antioxidant Defense System. *J Androl.* 2006; 27:240-7.
 63. Cao LC, Leers – Sucheta S, Azhar S. Aging alters functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 2004; 88:61-7.
 64. Sintin P, Robaro B. Sperm, structural and mobility changes during aging in Brown Norway Rat. *J Androl.* 2001; 22:235-44.
 65. Calvo A, Pastor LM, Gallego-Hvidobro J, Horn R, Pallares J. Abnormal spermatozoa in the cauda epididymidis of adult and aged hamsters (*Mesocricetus auratus*): a study by electron microscopy. *Acta Anat* 1995; 154:186-95.
 66. Wei YH, Kao SH. Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and mobility of human sperm. *Zool Stud.* 2000; 39: 1-12.
-

-
67. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 212: 167-78.
 68. Meinhardt A, Wilhelm B, Seitz J. Expression of mitochondrial marker protein during spermatogenesis. *Hum Reprod Update.* 1999; 5:108-19.
 69. Amaral S, Moreno AJ, Santo MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of goto-kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology.* 2006; 66: 2056-67.
 70. Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J. Diabetes and impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev.* 2008; 4:46-54.
 71. Amaral S, Mota PC, Lacerda B, Alves M, Pereira ML, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J. Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rats. *Mitochondrion.* 2009; 9:41-50.
 72. Richardson LL, Kleinman HK, Dym M. The effects of aging on Basement Membrane in the Testis. *J Androl.* 1995; 16:118-26.
 73. CAI L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res.* 2000; 28:342-7.
 74. Henriksen K, Hakovira H, Parvonen M. In situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl.* 1995; 18:256-262.
 75. Henriksen K, Kulmala J, Toppari J, Mehrotra K, Parvonen M. Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects. *J Androl.* 1996; 17:394-402.
 76. KU WW, Wine RN, Chae BY, Ghanayem BI, Chapin RE. Spermatocyte toxicity of 2 – Methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995; 134:100-19.
 77. Tapainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cells survival factors. *Molec Endocrinol.* 1993; 7:643-50.
 78. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cells apoptosis in the testis. *Rev Reprod.* 1999; 4:38-47.
 79. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 173:932-9.
-

80. Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*. 1990; 39:1420-4.
 81. Armagan A, Yilmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J Androl*. 2006; 8:595-600.
 82. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res*. 2002; 32:225-30.
 83. Leon J, Acuna-Castro Viejo D, Escames G, Tan D X, Reiter R J. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res*. 2005; 38:1-9.
 84. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem*. 1998; 252:1-15.
 85. Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*. 1995; 52:211-6.
 86. Lui W-Y, Lee WM, Cheng CY. Transforming growth factor β 3 perturbs the inter Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occluding zonula occludens-1 and claudin-11. *Endocrinology* 2001; 142:1865-77.
 87. Junqueira LC, Carneiro J. Ocitoplasma. In: Juqueira LC, Carneiro J. (editores) *Histologia Básica – Rio de Janeiro*. Guanabara Koogan. 2008; p46.
 88. Kumar V, ABBAS AK, Fausto N (editores). Adaptação, dano e morte celular. In: Fausto N (editores), Abbas AK. *In Pathologic Basis of Disease*. Rio de Janeiro. Elsevier 2005; p 3-48.
 89. Calvo A, Pastor LM, Martinez E, Vásquez JM, Roca J. Age-Related changes in the hamster epididymis. *Anat Rec*. 1999; 256:335-46.
 90. Collins VP, Arbogh B, Brunk U, Schellens JP. Phagocytosis and degradation of rat liver mitochondria by cultivated human glial cells. *Lab Invest*. 1980; 42:209-16.
 91. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS*. 1998; 106:265-76.
 92. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of ageing matures. *Physiol Rev*. 1998; 78:547-81.
-

93. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function Free Radical. Biol Med. 2002; 33:611-9.

94. Zglinicki T, Nilsson E, Döcke WD, Brunk UT. Lipofuscin accumulation and ageing of fibroblasts. Gerontology. 1995; 41 (2):95-108.

Anexos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



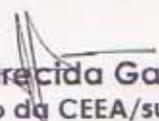
Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 650 sobre o Projeto de Pesquisa "**Diabetes aloxânica no rato: estudo ultra-estrutural de túbulos seminíferos e células de Leydig testiculares**", a ser conduzido pela Dr.ª Amélia Arcângela Teixeira Trindade, orientada pela Prof.ª Dr.ª Célia Sperandeo Macedo, co-orientador Prof. Dr. César Tadeu Spadella, com a participação dos Drs. Érica Veruska Ortolan, Mauro Masson Lerco, José Lúcio Martins Machado, Elisa Aparecida Gregório e da aluna de iniciação científica Amanda Natália Luchesi, relatado pelo Prof. Florian José Fontana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) com a ressalva que os "**ratos**" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 10 de janeiro de 2008


Prof. Dr.ª Regina Helena G. Martins
Presidente da CEEA


Sueli Aparecida Garcia
Secretário da CEEA/subst.



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



Botucatu, 20 de dezembro de 2010.

*Ilustríssima Senhora
Profª Drª Regina Helena Garcia Martins
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
Faculdade de Medicina de Botucatu.*

Solicito alteração do título do Projeto de Pesquisa, aprovado em 10 de janeiro de 2008 "DIABETES ALOXÂNICA NO RATO: ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DE TÚBULOS SEMINIFEROS E CÉLULAS DE LEYDIG TESTICULARES" para o título: "ALTERAÇÕES TESTICULARES NO DIABETES ALOXÂNICO NO RATO. ESTUDO MORFOMÉTRICO E ULTRAESTRUTURAL DOS TUBULOS SEMINIFEROS. A Justificativa desta solicitação baseia-se no fato de ter-se optado pelo estudo mais completo dos túbulos seminíferos realizando-se estudo morfométrico e ultraestrutural não incluindo as células de Leydig testiculares. Informamos que a pesquisa já foi desenvolvida com êxito e a Tese de Doutorado da aluna Amélia A. Trindade deverá ser defendida no início de 2011.

Reiterando os mais elevados protestos de estima e consideração, subscrevo,

Atenciosamente,

Célia Sperandio Macedo
Profª. Adjunta Célia Sperandio Macedo
Orientadora do Projeto de Tese de Doutorado

*Al. Azevedo - Amadeo
R. V. - 20/12/2010*



Faculdade de Medicina de Botucatu – Departamento de Pediatria
Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP: 18618-970 Botucatu São Paulo Brasil
Tel /Fax: 55 14 - 3811 6274 / 3811 6083 e-mail: pediatri@fmb.unesp.br



Tabela 01 – Valores dos parâmetros clínicos dos ratos normais e diabéticos sacrificados após 1, 6 e 12 meses de seguimento.

Momento do sacrifício (mês)	Característica do animal	Ingestão			
		Peso (g)	hídrica (ml)	Alimentar (ml)	Diurese (ml)
1	Normal	350	30	25	10
1	Normal	390	50	30	5
1	Normal	340	20	25	25
1	Normal	390	10	30	30
1	Normal	410	10	25	30
1	Normal	370	50	20	20
1	Normal	325	40	15	15
1	Normal	440	40	30	30
1	Normal	400	40	25	20
1	Normal	410	40	20	30
6	Normal	490	20	15	10
6	Normal	500	20	25	30
6	Normal	470	40	20	10
6	Normal	485	40	15	37
6	Normal	585	10	10	22
6	Normal	485	20	10	25
6	Normal	500	30	15	15
6	Normal	560	60	25	15
6	Normal	495	25	20	25
6	Normal	540	35	20	20
6	Normal	580	40	30	30
12	Normal	465	22	15	9
12	Normal	475	18	16	9
12	Normal	515	34	22	18
12	Normal	475	34	19	8
12	Normal	285	15	33	7
12	Normal	509	25	16	8
12	Normal	457	25	18	13
12	Normal	270	35	17	6
12	Normal	260	29	21	6
12	Normal	398	16	26	1
1	Diabético	140	170	35	132
1	Diabético	190	250	45	135
1	Diabético	230	250	50	120
1	Diabético	200	250	45	145
1	Diabético	148	125	50	75
1	Diabético	180	150	50	80
1	Diabético	155	250	50	140
1	Diabético	170	190	40	125
1	Diabético	190	250	35	100
6	Diabético	200	200	50	95
6	Diabético	340	200	50	65
6	Diabético	240	190	50	60
6	Diabético	235	230	40	60
6	Diabético	360	105	30	140
6	Diabético	290	180	40	80

6	Diabético	380	120	45	75
6	Diabético	230	170	50	65
6	Diabético	320	210	50	65
6	Diabético	350	220	50	65
12	Diabético	234	165	29	111
12	Diabético	205	165	30	97
12	Diabético	252	120	25	105
12	Diabético	202	105	24	73
12	Diabético	340	84	23	53
12	Diabético	300	140	40	95
12	Diabético	130	100	30	50
12	Diabético	250	53	15	47
12	Diabético	200	70	23	42
12	Diabético	207	122	19	78

Tabela 02: Valores dos parâmetros laboratoriais de ratos normais e diabéticos sacrificados após 1, 6 e 12 meses de seguimento.

Momento do sacrifício (mês)	Característica do animal	Glicemia (mg/dl)	Glicosuria (mg/24h)	Testosterona (ng/dl)	Insulina (µIU/ml)	Hemoglobina glicada (%)
1	Normal	116	24	234,00	38,8	3,6
1	Normal	80	0	158,70	40,0	1,2
1	Normal	125	59	262,20	42,5	3,1
1	Normal	130	17	50,38	38,5	4,0
1	Normal	121	20	669,00	38,2	4,5
1	Normal	126	8	34,51	42,6	2,2
1	Normal	121	0	61,97	44,3	3,8
1	Normal	129	12	503,70	40,4	3,8
1	Normal	124	0	149,60	40,5	2,7
1	Normal	117	0	226,10	42,0	3,5
6	Normal	108	14	59,67	45,0	4,5
6	Normal	110	0	41,65	46,4	3,9
6	Normal	99	0	86,45	40,8	4,3
6	Normal	97	26	65,53	40,2	4,0
6	Normal	97	15	39,68	44,0	3,9
6	Normal	86	28	196,00	45,0	4,1
6	Normal	124	0	51,64	38,0	3,6
6	Normal	117	52	68,77	42,0	3,1
6	Normal	116	10	404,50	40,6	2,9
6	Normal	80	5	147,80	40,8	2,3
6	Normal	125	16	37,48	44,6	3,3
12	Normal	134	8			
12	Normal	168	9			
12	Normal	150	11			
12	Normal	165	11			
12	Normal	135	17			
12	Normal	149	10			
12	Normal	127	8			
12	Normal	138	9			
12	Normal	100	9			
12	Normal	115	10			
1	Diabético	673	8401	2,79	18,0	11,8
1	Diabético	564	5677	167,90	18,8	11,1
1	Diabético	649	6399	186,10	22,4	8,5
1	Diabético	684	3471	48,78	20,6	8,4
1	Diabético	795	8385	155,80	22,5	10,2
1	Diabético	620	9947	8,25	18,8	9,0
1	Diabético	635	7900	4,22	24,0	8,3
1	Diabético	758	8072	8,08	18,6	10,3
1	Diabético	631	8404	2,79	22,8	8,3
6	Diabético	550	7293	25,13	20,6	8,3
6	Diabético	601	7704	34,86	20,2	9,7
6	Diabético	Nãodosado	Não dosado	Não dosado	Não dosado	Não dosado
6	Diabético	963	7199	10,47	18,8	9,4
6	Diabético	811	8829	36,10	19,5	7,2

6	Diabético	498	8672	26,62	20,6	10,6
6	Diabético	602	5051	23,20	22,4	10,3
6	Diabético	563	4001	20,85	24,5	8,6
6	Diabético	512	4857	21,55	18,6	10,8
6	Diabético	676	5058	8,62	20,4	10,4
12	Diabético	360	4602			
12	Diabético	595	4999			
12	Diabético	500	5813			
12	Diabético	616	3455			
12	Diabético	366	3900			
12	Diabético	448	4908			
12	Diabético	290	4991			
12	Diabético	393	4739			
12	Diabético	254	5082			
12	Diabético	363	4009			

Tabela 03 – Médias da área total, área do lúmen, área do epitélio, espessura do epitélio e densidade tubular dos ratos normais e diabéticos sacrificados após um e seis meses de seguimento.

Momento do sacrifício (mês)	Característica do animal	Animal	Médias Das Áreas totais	Média das áreas do lúmen	Média das Áreas do Epitélio	Média das Espessuras do Epitélio	Média da densidade tubular	% lúmen
1	Normal	333	85243,51	24352,54	60890,97	75,57	6,1	28,50
1	Normal	334	80484,02	21420,06	59063,97	80,77	6,2	26,61
1	Normal	335	93240,67	27769,40	65471,27	75,96	6,8	29,78
1	Normal	336	89417,44	22023,47	67393,97	79,31	6,5	24,63
1	Normal	337	89070,74	25020,30	64050,45	77,78	6,5	28,09
1	Normal	364	84268,96	22653,65	61615,32	72,69	6,9	26,88
1	Normal	365	77259,06	21769,92	55489,14	75,52	6,5	28,10
1	Normal	366	86256,53	22626,12	63630,41	82,16	6,2	26,23
1	Normal	373	86540,01	25511,37	61028,64	79,60	6,8	29,48
1	Normal	374	76937,90	20753,90	56184,00	78,10	8,2	26,97
6	Normal	287	84973,74	26312,27	58661,47	74,56	5,6	30,97
6	Normal	288	86233,65	23385,77	62847,89	82,73	6,6	27,12
6	Normal	289	75068,21	20387,65	54680,56	75,69	7,0	27,16
6	Normal	290	89529,51	31007,71	58521,80	71,30	6,3	34,63
6	Normal	291	91039,72	32271,90	58767,81	71,94	6,1	35,45
6	Normal	292	87841,19	27485,49	60355,70	78,70	5,1	31,29
6	Normal	298	81077,36	24482,47	56594,89	78,64	6,8	30,20
6	Normal	299	93720,49	29569,20	64151,23	74,15	5,5	31,55
6	Normal	300	87290,58	28377,00	58913,58	72,41	6,3	32,51
6	Normal	301	84385,80	27138,62	57247,18	73,61	6,6	32,16
6	Normal	302	92660,52	31330,06	61330,46	69,23	5,9	33,81
1	Diabético	306	52521,78	11778,05	40743,73	57,17	9,6	22,43
1	Diabético	323	78055,78	19487,33	58568,45	66,38	6,9	24,97
1	Diabético	326	79825,07	22271,00	57554,07	65,77	7,8	27,90
1	Diabético	327	73106,36	19720,27	53386,09	66,28	7,6	26,97
1	Diabético	328	84411,98	26879,30	57532,68	60,06	6,7	31,84
1	Diabético	344	84030,05	27089,76	56940,29	68,91	7,5	32,24
1	Diabético	349	39377,00	12594,49	26778,51	40,36	13,0	31,98
1	Diabético	357	82765,84	24859,67	57906,17	68,84	6,8	30,04
1	Diabético	362	50822,69	14479,98	36342,71	50,16	10,4	28,49
6	Diabético	278	71934,54	19173,06	52761,48	63,12	7,1	26,65
6	Diabético	279	74664,13	19042,78	55621,35	63,88	7,8	25,50
6	Diabético	283	17377,56	6897,40	10480,16	14,45	18,0	39,69
6	Diabético	286	56239,55	13601,23	42638,32	45,74	8,4	24,18
6	Diabético	313	77218,84	21095,55	56123,29	57,37	7,1	27,32
6	Diabético	316	82777,08	24707,72	58069,35	50,30	6,4	29,85
6	Diabético	339	85772,56	23764,29	62008,27	56,77	6,2	27,71
6	Diabético	341	79300,00	21694,55	57605,58	56,97	7,4	27,36
6	Diabético	399	89572,21	29524,68	60047,53	55,98	7,3	32,96
6	Diabético	401	84929,15	21352,82	63576,33	61,87	9,9	25,14