

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO DIABETES SOBRE O CRESCIMENTO PUBERAL DA PRÓSTATA
DE RATO: AVALIAÇÃO HORMONAL, IMUNOCITOQUÍMICA E
BIOQUÍMICA**

Larissa Mayumi Ribeiro

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Biociências, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO DIABETES SOBRE O CRESCIMENTO PUBERAL DA PRÓSTATA
DE RATO: AVALIAÇÃO HORMONAL, IMUNOCITOQUÍMICA E
BIOQUÍMICA**

Larissa Mayumi Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

Co-orientadora: Profa. Elaine Manoela Porto Amorim

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Biociências, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ribeiro, Larissa Mayumi.

Efeito do diabetes sobre o crescimento puberal da próstata de rato:
avaliação hormonal, imunocitoquímica e bioquímica / Larissa Mayumi
Ribeiro. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biomédicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Sérgio Luis Felisbino

Co-orientadora: Elaine Manoela Porto Amorim

1.Diabetes - Estudos experimentais 2.Hormônios - Avaliação 3.Próstata

Palavras-chave: DHT; IGF-1; Insulina; Próstata ventral; Receptor de
andrógeno

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Joãozinho e Midori,
pelo eterno exemplo de dedicação e responsabilidade, e
ao meu namorado, Alexandre, pela inesgotável ajuda e
atenção. Todo amor, carinho e paciência dedicados a mim
engrandecem ainda mais essa conquista.*

“Se hora de encontros pode haver desencontros, que a hora de separação seja, tão somente, a hora de um verdadeiro, profundo e coletivo encontro. De tudo ficaram três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro”.

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter me dado força e coragem durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino, pela oportunidade e pela contribuição no meu crescimento e amadurecimento profissional. Obrigada pelo estímulo, pelo carinho e pela amizade durante todo o tempo em que convivemos e trabalhamos juntos. Serei sempre grata!

“Excelente é o mestre que ensinando faz nascer no espírito do discípulo um grande desejo de aprender”.

Aos amigos e colegas que fiz no laboratório: Justu, Lívia, Jaque, Flávia, Carol e Alexandre, por toda a colaboração e pelos momentos felizes que me proporcionaram. Em especial agradeço à Elaine Manoela, pela imensa ajuda e dedicação, e também pela agradável convivência durante esse tempo.

Ao Wellerson, que me iniciou na carreira científica, agradeço pelos ensinamentos, sugestões, disponibilidade em sempre me ajudar e toda a sua colaboração nos meus trabalhos.

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Morfologia pela ajuda em todos os momentos desse trabalho, principalmente, à secretária Luciana, pela eterna prontidão e simpatia.

Aos amigos do curso da XLIII turma de Ciências Biomédicas, pelos momentos inesquecíveis.

Aos animais de experimentação, que tão nobremente contribuíram com suas vidas para a realização desse trabalho.

E, finalmente, aos anticorpos, que não me abandonaram e funcionaram com perfeita reatividade nas técnicas utilizadas.

“Agradecer é reconhecer que não alcançamos nossos sonhos sozinhos. A todos vocês que me ajudaram de alguma forma durante a minha trajetória, muito obrigada!”

Esse trabalho foi organizado na forma de um artigo científico escrito em língua portuguesa, seguindo as normas do periódico **Microscopy Research and Technique**.

Efeito do diabetes sobre o crescimento puberal da próstata de rato: avaliação hormonal, imunocitoquímica e bioquímica

Larissa M. Ribeiro; Elaine M. Porto; Sérgio A. A. Santos; Sérgio L. Felisbino

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista

Palavras chaves: próstata ventral, receptor de andrógeno, IGF-1, IGF-1R, DHT, insulina

Correspondência:

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências – UNESP

Distrito de Rubião Jr., S/N – CxP: 510

CEP: 18618-000

Botucatu/SP

Fone/Fax: (14) 3811 6264 - ramal 125

RESUMO

A função reprodutiva é extremamente sensível às mudanças no estado metabólico e reservas energéticas do organismo e, como consequência, condições metabólicas adversas, como ocorre no *Diabetes Mellitus*, são comumente associadas a sérios problemas reprodutivos no homem. Um dos efeitos mais diretos da hiperglicemia no sistema reprodutor masculino é a redução nos níveis plasmáticos de testosterona (T). Entretanto, pouca atenção tem sido dada aos níveis plasmáticos de diidrotestosterona (DHT) e para a expressão tecidual do receptor de andrógeno (AR), do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e seu receptor (IGF-1R). O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do *Diabetes Mellitus* tipo I, induzido experimentalmente pela estreptozotocina (STZ; 40mg/kg) em animais pré-púberes (40 dias de idade pós-natal), assim como os efeitos da reposição de insulina (simultânea, 3 dias após a indução, e tardia, 20 dias após a indução), sobre as concentrações plasmáticas de T e DHT e sobre a expressão do AR, IGF-1 e IGF-1R no lobo ventral da próstata de rato durante o crescimento puberal. Foram realizadas análises de glicemia, peso corporal, peso do lobo ventral prostático, dosagens de T e DHT plasmáticas, reação imunocitoquímica para o AR, IGF-1 e IGF-1R, além de Western Blotting para avaliar a especificidade dos anticorpos primários utilizados na imunocitoquímica, bem como, para obter dados semiquantitativos da expressão destas proteínas presentes nos lobos ventrais prostáticos dos diferentes grupos experimentais. A indução de um quadro hiperglicêmico aos 40 dias de idade pós-natal bloqueou o ganho de peso corporal, reduziu em 80% a concentração plasmática de T e diminuiu em 50% o ganho de peso da próstata ventral, porém sem alterar a concentração plasmática de DHT. As reposições de insulina simultânea e tardia restauraram o padrão normal de ganho de peso corporal e glandular, mas não a concentração plasmática de T, que ficou em 90% abaixo do controle. A reação imunocitoquímica para o AR demonstrou que não houve alteração na expressão deste receptor nas células epiteliais prostáticas e nem do IGF-1 e seu receptor IGF-1R e os resultados da imunocitoquímica foram confirmados pelo Western Blotting. Estes resultados sugerem que, apesar do diabetes reduzir em 80% os níveis de T, os níveis constantes de DHT sustentam o crescimento glandular, embora menor, e a expressão do AR prostático. Além disso, mesmo sem restaurar os níveis de T, a reposição com insulina foi capaz de restaurar o crescimento glandular. Entretanto, não é possível afirmar se este crescimento glandular ocorreu por um efeito direto da insulina sobre a próstata ou indireto via restauração de vários parâmetros fisiológicos do organismo.

ABSTRACT

Adequate testosterone levels are necessary for the development, growth and maintenance of the male reproductive system. Testosterone deficiency is common in men with diabetes in whom it may contribute to impaired performance, with consequent reduction of the activity of the androgen regulated organs, such as the prostate. However, little attention has been given to the plasma dihydrotestosterone (DHT) level, the most potent androgen, nor to the expression of the androgen receptor (AR), insulin-like growth factor type I (IGF-1) and receptor (IGF-1R) in target tissues. Here, we investigated the effect of type I diabetes mellitus on DHT plasma levels and on prostate AR, IGF-1 and IGF-1R expression during rat pubertal growth. Diabetes was induced in prepubertal male rats through administration of streptozotocin (STZ; 40 mg/kg). Diabetic, diabetic treated with insulin, and age-matched control animals were killed by overdoses of pentobarbital. The ventral prostatic lobe (VP) was dissected, weighed and processed for immunohistochemistry for AR, IGF-1 e IGF-1R; plasma T and DHT levels were also determined. Hyperglycemia at puberty reduced VP weight gain to about 50% and plasma T level to about 80% of the control levels. In contrast there were no changes in plasma DHT levels. Insulin replacement restored the VP weight gain, but not the plasma T levels, which remained 90% below the ones of controls. Immunohistochemistry showed that AR, IGF-1 and IGF-1R expression in the prostate epithelial cells did not change with hyperglycemia or insulin replacement. Thus, the AR expression in the prostate epithelial cells appears to be regulated by DHT, and to a minor extent it also controls glandular growth.

Keywords: ventral prostate, androgen receptor, IGF-1, IGF-1R, DHT, insulin

INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus é uma síndrome clínica heterogênea, causada pela falta de produção de insulina pelas células beta (β) pancreáticas ou pelo defeito nos receptores para insulina nas células-alvo, resultando em doença metabólica hiperglicêmica (ADA, 2005). É uma das mais importantes doenças da sociedade moderna e representa não apenas um problema de saúde pública, mas também um problema social devido ao prejuízo na qualidade de vida dos indivíduos afetados (Mokdad, 2001).

A função reprodutiva é altamente sensível ao status metabólico e reservas energéticas do organismo (Schneider, 2004). Assim, uma condição metabólica adversa, como no *Diabetes Mellitus*, está frequentemente associada com severos danos nas funções reprodutivas (Cunningham et al., 1999). Neste contexto, o diabetes está associado a uma série de disfunções sexuais e reprodutivas nos indivíduos do sexo masculino. Disfunções no trato genitourinário, tais como: distensão da bexiga, retenção urinária, disfunção erétil, obstrução dos ductos ejaculatórios, calcificação da vesícula seminal, infertilidade e redução nas concentrações plasmáticas de testosterona são frequentemente associadas com o diabetes, no homem e em animais experimentais (Yono et al., 2005; Altay et al., 2003; Baccetti et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que o diabetes induzido experimentalmente em animais de laboratório causa profundas alterações estruturais e funcionais na próstata, como uma diminuição do peso absoluto da glândula, além da atrofia das células epiteliais e lúmen glandular (Ribeiro et al., 2006; Carvalho et al., 2003; Cagnon et al., 2000). Desai and Kondaiah (2000) demonstraram que o diabetes induz modificações na expressão de fatores de crescimento em ratos castrados sugerindo que a diminuição nas concentrações plasmáticas de T e uma expressão diferencial de fatores de crescimento contribuam para as alterações prostáticas de ratos diabéticos.

Entretanto, poucos estudos têm avaliado o impacto do diabetes sobre a idade da puberdade. Estudos recentes têm demonstrado um aumento dos casos de obesidade infantil e do diabetes entre crianças e adolescentes (Malecka-Tendera et al., 2005). Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto do diabetes sobre o crescimento prostático na puberdade, período em que a glândula é estimulada a crescer consideravelmente por um segundo pico de testosterona, com especial atenção para os níveis plasmáticos de T e DHT e para a expressão tecidual do receptor de andrógeno, do IGF-1 e do IGF-1R.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos da variedade Wistar, pré-púberes (40 dias de idade), fornecidos pelo Centro Multi-disciplinar para Investigação Biológica da Universidade de Campinas, CEMIB - UNICAMP. Os animais foram adaptados e mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sendo acomodados individualmente, sob condições controladas de temperatura mantida entre 22° e 25°C, umidade relativa próxima de 55% e luminosidade fotoperíodo de 12 horas (período de luz 7:00~19:00h). Após o período de adaptação, os ratos foram distribuídos de maneira aleatória para compor os grupos experimentais. Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (Protocolo nº 42/07).

Indução do diabetes

A estreptozotocina (STZ; SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO), foi a droga escolhida para indução do diabetes nos ratos pré-púberes (40 dias de idade). Os animais foram tratados com uma única dose de STZ, via intravenosa, na dose de 40mg/Kg de peso corporal, (40mg de STZ dissolvido em 1ml de tampão citrato 0,1M, pH 4,5). Após três dias de tratamento foi determinada a glicemia dos animais, colhendo-se uma gota de sangue por punção com agulha na parte distal da cauda, por leitura da glicofita (Blood Glucose Monitoring Teste Prestige HDI Home Diagnostics, Inc., Flórida, USA) contendo o sangue, utilizando glicosímetro específico (Blood Glucose Monitoring Prestige), expressa os valores em miligramas por decilitro (mg/dl). Apenas os animais que apresentaram os níveis glicêmicos iguais ou superiores a 250mg/dl, foram incluídos no estudo sendo considerados diabéticos, mimetizando um quadro clínico típico do diabetes tipo I no humano. Os animais do grupo controle receberam, de acordo com o mesmo protocolo experimental, a solução veículo.

Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em 6 grupos: grupo controle, composto de 10 animais, mortos aos 61 e 81 dias de idade (5 animais em cada período); grupo diabético (animais mortos aos 61 dias, $n = 6$, e 81 dias de idade, $n = 7$); grupo diabético com reposição simultânea de insulina, composto por animais diabéticos ($n=10$), que após um período de 3 dias após a indução pela STZ, começaram a receber a terapia com insulina (3U/100g de peso corporal/dia), subcutaneamente, conforme descrito em Soudamani et al. (2005), em dose única diária, ajustada de acordo com a glicosúria (níveis de glicose na urina) através da leitura semi-quantitativa da fita Keto-Diabur Test®, medida duas vezes ao dia (8:00 e 16:00h). Os animais foram sacrificados aos 61 dias de idade; e grupo diabético com reposição tardia de insulina, composto por animais diabéticos ($n = 7$), que após um período de 20 dias após a indução pela STZ, começaram a receber a terapia com insulina. Os animais foram sacrificados aos 81 dias de idade.

Para a avaliação indireta da toxicidade sistêmica, os animais, em todos os grupos experimentais, foram pesados em dias alternados para controle de ganho de peso e observados quanto ao comportamento, ingestão hídrica e consumo de ração semanalmente.

Ao final de cada período experimental, os animais foram pesados, tiveram determinada a glicemia e foram sacrificados utilizando-se alta dose de pentobarbital sódico, injetado intraperitonealmente. Os lobos ventrais prostáticos foram dissecados e reservados para uso nas técnicas histológicas e análises bioquímicas.

Dosagens hormonais

As amostras de sangue foram coletadas dos animais sacrificados aos 61 e 81 dias de idade. O sangue foi coletado por punção cardíaca no momento do sacrifício, transferido para um tubo heparinizado e em seguida centrifugado a 2500rpm, 4°C, para separação do plasma, que foi congelado até o momento dos ensaios hormonais. Os níveis de testosterona plasmáticos foram determinados pela técnica de radioimunoensaio de duplo-anticorpo, utilizando-se o Kit Coat-A-Count Total Testosterone, DPC, Los Angeles, CA, no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu. As concentrações de diidrotestosterona foram determinadas pelo método de quimiluminescência, realizada no Laboratório Álvaro de Análises Clínicas de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Obtenção de cortes em Paraplast

Os lobos ventrais prostáticos foram fixados em paraformaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 48 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes de 5µm foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

Imunocitoquímica para receptor de andrógeno AR, IGF-1 e IGF-1R

Cortes em Paraplast (com recuperação antigênica por tratamento com tampão citrato de sódio 10mM, pH 6,0 em banho-maria a 96°C por 5 minutos - IGF-1/IGF-1R e 45 minutos na panela de pressão - AR) foram mergulhados em solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e embebidos em solução contendo 3% de albumina de soro bovino para o bloqueio das interações proteína-proteína não-específicas.

Após o bloqueio os cortes foram incubados com anticorpo primário contra os antígenos de interesse, com as seguintes diluições em BSA 1%: 1:100 AR (Sta Cruz, N-20, sc-816); 1:100 IGF-1R (Abcam, ab39675); e 1:150 IGF-1 (Upstate Biotechnology, Lake Placid NY). Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho biotilado a 1:100 (IGF-1R, AR) e anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase a 1:300 (IGF-1). A marcação foi revelada pela diaminobenzidina e os cortes foram contracolorados pela hematoxilina. Os resultados foram analisados ao microscópio convencional e fotodocumentados.

Western Blotting para as proteínas AR, IGF-1 e IGF-1R

Para a extração das proteínas, uma proporção de 30mg de tecido para cada 0,1 ml de uma solução de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 foi triturada em um homogeneizador do tipo Politron por três ciclos de 5 segundos cada um. O homogeneizado foi incubado por 2 horas a 4°C para aumentar a eficiência da extração. Após este período, o homogeneizado foi centrifugado a 2.000 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o conteúdo de proteínas quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA - SIGMA) como proteína de referência.

Para iniciar a técnica de Western Blotting, foi realizada a eletroforese em gel SDS-PAGE 10% para as proteínas AR e IGF-1R e 14% para IGF-1 (0,75mm de espessura) utilizando-se 80ug de proteínas totais. Após a eletroforese, foi realizada a transferência das

proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences), durante 60 minutos a 300mA.

Para impedir as interações não específicas entre a membrana de nitrocelulose e o anticorpo utilizado para a detecção da proteína alvo, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos. A membrana de nitrocelulose foi incubada durante 1 hora com uma solução de bloqueio de proteínas contendo a seguinte constituição: soro fetal bovino 8%, leite em pó desnatado 2%, BSA 2,5%, glicina 2% diluídos em 10ml de PBS. As proteínas dessa solução de bloqueio ligam-se à membrana nos locais onde não há proteínas-alvo. Quando o anticorpo é adicionado, ele liga-se apenas às proteínas-alvo, melhorando os resultados e eliminando os falsos positivos.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight com 10 mL de solução de anticorpo primário (1:500; 1:1000 e 1:1000) que foi diluído em solução de bloqueio de proteínas a 1% em PBS. Os anticorpos primários utilizados no Western Blotting foram os mesmos utilizados na imunocitoquímica, mas nas respectivas diluições citadas acima.

No dia seguinte, a membrana foi lavada durante 3X de 15 minutos cada em Solução Basal (Trisma Base 1M, pH 7.5 e Tween 20). Após a lavagem, a membrana foi incubada durante 60 minutos com 10mL de solução de anticorpo secundário (1:1000) diluído em solução de bloqueio de proteínas a 1% em PBS. O anticorpo secundário utilizado para as proteínas AR e IGF-1R foi o “Goat anti-rabbit IgG HRP (Horseradish peroxidase) conjugated” (SIGMA, sc-2004), enquanto que o “anti-mouse IgG HRP” (SIGMA, A5278) foi utilizado para IGF-1. Após essa incubação, a membrana foi lavada durante 3X de 10 minutos cada em Solução Basal.

Para a revelação das proteínas marcadas (bandas) foi utilizada a diaminobenzidina. O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular.

Forma de análise dos resultados

Os cortes foram observados em luz normal em microscópio Leica DMLB e as imagens foram digitalizadas em analisador de imagens no software Leica Q-win versão 3.1 para Windons TM.

As análises semiquantitativas por densitometria (densidade ótica integrada – IOD) das bandas obtidas no Western Blotting foram realizadas utilizando-se Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

Para análise dos dados numéricos com a dosagem hormonal e com a densitometria das bandas foram utilizados o teste estatístico para análise de variância - ANOVA, com teste “a posteriori” de Tuckey-Kramer ou o teste não paramétrico de Kruskall-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn, de acordo com a característica de cada variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas serão realizadas no programa Instat (versão 3.0; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Glicemia

As médias das concentrações sanguíneas de glicose foram superiores a 250mg/dl, em todos os períodos avaliados, nos animais que receberam tratamento diabetogênico, sem reposição de insulina. A reposição simultânea e/ou tardia de insulina foi eficaz em reduzir os níveis de glicose no sangue a valores próximos aos dos animais dos grupos controle. As médias das concentrações sanguíneas de glicose dos grupos controle foram sempre inferiores ao limite máximo de normalidade (120mg/dl) (Tabela 1). Um animal do grupo diabético e dois repostos com insulina morreram ao longo do período experimental (dados não mostrados).

Glicosúria

Os animais controles apresentaram valores negativos para a glicosúria (0mg/dl). Os animais diabéticos, sem tratamento com insulina, apresentaram valores de glicosúria permanentemente elevados ($>250\text{mg/dl}$), avaliados em leitura de fitas de acordo com uma escala de coloração (Figura 1). Além disso, alguns animais diabéticos foram positivos para cetonúria no dia da avaliação. No grupo de ratos diabéticos tratados com insulina, os valores de glicosúria variavam ao longo do tratamento, refletindo assim a atuação fisiológica e o clearance do hormônio exógeno do corpo dos animais (dados não mostrados).

Consumo de água e ração

O consumo hídrico, assim como o consumo de ração foi maior nos animais do grupo diabético, comparados aos dos grupos controle. Os animais diabéticos, após terem iniciado a

reposição exógena de insulina (simultânea e/ou tardia), apresentaram padrões de consumo de água e ração semelhante aos animais controle (Figuras 2 a 5).

Evolução do peso corporal e glandular

Os animais diabéticos mostraram uma significativa redução do peso corporal comparado aos animais controle. O tratamento com insulina, iniciado 3 (simultâneo) ou 20 dias (tardio) após a administração de STZ, significativamente aumentou o peso corporal dos animais (Figuras 6 e 7). Os pesos absolutos e relativos do lobo ventral apresentaram-se diminuído, ao final de cada período experimental, nos animais diabéticos tratados com STZ. Os animais diabéticos que receberam reposição exógena de insulina (tanto simultânea quanto tardia) apresentaram expressiva recuperação dos pesos absolutos e relativos, sem diferença estatisticamente significativa dos animais controle (Tabela 2 e Figura 8).

Concentrações plasmáticas de diidrotestosterona e testosterona

Os valores para as concentrações plasmáticas de DHT não diferiram entre os grupos experimentais idade-emparelhados. Por outro lado, o tratamento diabetogênico com STZ, reduziu em 80% as concentrações de T no plasma dos animais e as reposições de insulina, simultânea e tardia, não elevou a concentração de T para os níveis normais ficando em 90% dos níveis controle (Tabela 3).

Imunocitoquímica para o AR, IGF-1 e IGF-1R

A expressão tecidual dos receptores de andrógeno nos lobos da próstata foi avaliada por imunocitoquímica com dois clones diferentes obtidos da empresa Santa Cruz Biotechnology. Os resultados mostraram forte marcação positiva nos núcleos e marcação menos intensa no citoplasma das células epiteliais de todos os grupos experimentais (Figura 9). Aparentemente, houve uma menor marcação para o AR nas próstatas dos animais diabéticos sem reposição com insulina (Figuras 9c-d). Entretanto, uma análise mais quantitativa desta imunomarcação não foi possível devido a uma grande heterogeneidade na marcação, mesmo entre os túbulos/ácinos de um mesmo lobo prostático (dados não mostrados). Desta forma, decidimos não fazer análises quantitativas do tipo contagem de núcleos positivos e negativos ou por meio de uma observação subjetiva de intensidade de reação (ausente, fraca, média e forte).

A expressão tecidual do fator de crescimento semelhante à insulina e de seu receptor foi avaliada por imunocitoquímica com dois clones diferentes obtidos das empresas Santa Cruz Biotechnology e Upstate Biotechnology, respectivamente. Os resultados mostraram forte marcação positiva para o IGF-1 e IGF-1R principalmente no citoplasma das células epiteliais e marcação menos intensa no estroma e na camada muscular de vasos nos lobos ventrais prostáticos de todos os grupos experimentais (Figura 10 e 11). Aparentemente, houve alteração na intensidade da marcação para os dois diferentes anticorpos (IGF-1 e IGF-1R) nas próstatas dos animais diabéticos sem reposição com insulina (Figuras 10c-d e 11c-d).

Western Blotting para o AR, IGF-1 e IGF-1R

A técnica de Western Blotting foi utilizada para avaliar a especificidade dos anticorpos primários utilizados na imunocitoquímica, bem como, para obter dados semiquantitativos da expressão destas proteínas presentes nos lobos ventrais prostáticos dos diferentes grupos experimentais. Os resultados revelaram bandas específicas para os pesos moleculares esperados, no caso, 110kDa para AR, 6kDa para IGF-1 e 155kDa para IGF-1R. A análise densitométrica das bandas não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (dados não mostrados), confirmando as observações das reações imunocitoquímicas (Figuras 12, 13, e 14).

DISCUSSÃO

Muitos estudos têm demonstrado que o diabetes interfere com as funções reprodutivas e com a morfofisiologia da próstata (Ikeda et al., 2000; Carvalho et al., 2003; Cagnon et al., 2000; Ribeiro et al., 2006; Fávaro et al., 2008). Entretanto, poucos estudos abordaram o efeito do diabetes no período da puberdade, momento em que os órgão reprodutivos masculinos sofrem um grande crescimento, influenciados por um pico na produção de testosterona.

No presente estudo, os animais que receberam STZ apresentaram hiperglicemia (glicemia >250mg/dl) cerca de 48h após a administração da droga e mantiveram este padrão hiperglicêmico, na ausência de insulina, durante todo o período experimental. O aumento no consumo de água e ração pelos ratos dos grupos diabetogênicos, quando comparados aos controle, confirmou resultados da literatura (Ribeiro et al., 2006; Al Ghaflí et al., 2004). Assim, a verificação de polifagia, polidipsia e poliúria (observado no aumento da umidade na

forragem das caixas dos ratos diabéticos) confirmaram os sinais clássicos da síndrome diabética (ADA, 2005). A reposição contínua com insulina, iniciada três dias após a administração da STZ, foi efetiva em reduzir os níveis de glicose sanguínea nos animais tratados, em valores bem próximos ao dos grupos controle. Os animais que receberam a terapia de reposição de insulina exógena apresentaram padrões de ingestão hídrica e alimentar semelhante aos animais controle, demonstrando assim a eficácia do tratamento com o hormônio.

Os animais diabéticos apresentaram um menor ganho de peso corporal quando comparado aos animais controle, mesmo ingerindo grandes quantidades de ração, revelando assim um prejuízo no crescimento somático. Desta forma, este resultado está relacionado com a condição do estado diabético, demonstrando que esta doença metabólica compromete o metabolismo orgânico destes animais. O baixo ganho de peso corporal associado à hiperglicemia é uma das características clássicas do diabetes tanto no homem como nos animais experimentais (ADA, 2005; Ribeiro et al., 2006; Steger et al., 1989). Os animais que receberam reposição exógena de insulina, ao final dos períodos experimentais, apresentaram peso corporal semelhante ao dos grupos controle, confirmando assim os efeitos anabólicos da insulina e corroborando com outros estudos experimentais (Öztürk and Aydin, 2006; Steger and Kienast, 1990).

No presente estudo, houve uma redução das concentrações plasmáticas de T em todos os animais que receberam tratamento diabetogênico com a STZ, mas a redução foi menor nos animais que receberam reposição com insulina, principalmente, na reposição simultânea. Porém, as concentrações plasmáticas de DHT não foram reduzidas. Esta diminuição acentuada dos níveis de T plasmáticos, sem uma consequente diminuição significativa dos níveis de DHT, pode ser explicada pela manutenção da conversão da T em DHT.

Em um experimento com ratos castrados nos quais foram feitas reposição de T, em doses crescentes, foi demonstrado que níveis plasmáticos de T a partir 20ng/dl já são capazes de proporcionar uma máxima concentração intraprostática de DHT (Marchetti et al., 1988). Como em nosso experimento, os menores níveis plasmáticos de T foram de 22,7ng/dl nos animais diabéticos de 80 dias, este valor possivelmente sustentou os níveis plasmáticos e intraprostáticos de DHT. Além disso, na vida adulta, a concentração tecidual de DHT é mantida elevada quando comparada com os níveis plasmáticos. Ambos os andrógenos são capazes de manter a atividade prostática, porém a DHT apresenta 1,6 a 1,9 maior potência que a T (Rittmaster et al., 1991). Desta forma, apesar da redução dos níveis plasmáticos de T, os

animais diabéticos apresentaram crescimento glandular, embora em uma menor proporção em relação aos grupos controle, provavelmente devido aos níveis constantes de DHT. Já a reposição com insulina foi capaz de restaurar o crescimento glandular, mas não os níveis plasmáticos de T, provavelmente por um efeito direto adicional da insulina através de receptores (Saucier et al., 1981) ou por vias indiretas, por meio da restauração de vários parâmetros fisiológicos e hormonais (Sudha et al., 1999).

Tanto a T como a DHT atuam sobre o receptor de andrógeno (AR), que promove a transcrição de genes andrógeno-dependentes (Heinlein e Chang, 2002). No presente estudo, todas as próstatas ventrais dos diferentes grupos apresentaram reação positiva, nuclear e citoplasmática, para o AR. Assim, os resultados encontrados para a expressão do AR tanto na imunocitoquímica, quanto na técnica de Western Blotting, podem ser sustentados pelos níveis constantes de DHT em todos os grupos experimentais, uma vez que as reduções nos níveis plasmáticos de T e DHT não se refletem nas mesmas proporções de reduções dos níveis intraprostáticos destes hormônios.

Além do papel indispensável dos hormônios esteróides para o desenvolvimento e manutenção da fisiologia da próstata, o desenvolvimento prostático normal também é regulado por fatores de crescimento secretados localmente pelo epitélio e pelo estroma, que atuam de maneira autócrina e parácrina, ligando-se a receptores específicos nas células-alvo e ativando genes específicos. O desequilíbrio desta interação entre o epitélio e o estroma está associado à alteração de expressão gênica e protéica tanto no compartimento epitelial como no estroma que está associado ao desenvolvimento e progressão de lesões na próstata (Koga et al., 2007). Dentre esses fatores destacam-se: epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factors (IGF)–I e –II, fibroblast growth factors (FGF), keratinocyte growth factor (KGF), and hepatocyte growth factor (HGF) (Lopaczynski et al., 2001), que regulam diferentes funções das células epiteliais e do estroma prostático.

Insulin-like growth factor-I ou fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é considerado o principal fator de crescimento que regula positivamente a proliferação e a diferenciação do compartimento epitelial, sendo tão necessário quanto à testosterona para o desenvolvimento e crescimento prostático normal (Kleinberg et al., 2007; Ruan et al., 1999). Na próstata, o estroma é a maior fonte de IGF-1, que é secretado e se liga ao seu receptor (IGF-1R) na membrana plasmática das células epiteliais, induzindo a expressão de genes-alvo (Ohlson et al., 2007).

No presente estudo, não foram observadas alterações na expressão prostática do IGF-1 e do IGF-1R, analisados por imunocitoquímica e por Western Blotting. Estes resultados podem refletir que, ou o diabetes não altera a expressão prostática do IGF-1 e seu receptor IGF-1R, ou que os níveis constantes de DHT também sustentaram a expressão desse fator de crescimento e seu receptor na próstata ventral do rato. Liu et al. (2008) demonstraram que, em cultura celular, a DHT estimula a produção de IGF-1 por células epiteliais prostáticas normais em co-culturas com células do estroma reativo de câncer de próstata.

Estudos têm demonstrado que o diabetes induzido experimentalmente em ratos adultos causa profundas alterações estruturais e funcionais na próstata, caracterizada tanto por uma diminuição do peso absoluto da glândula quanto pela atrofia das células epiteliais e lúmen glandular (Ribeiro et al., 2006; Carvalho et al., 2003; Cagnon et al., 2000), muito semelhante aos efeitos observados na próstata de animais castrados (Justulin et al., 2006; Vilamaior et al., 2006). Entretanto, nossos resultados demonstraram que o diabetes induzido em animais pré-púberes não causou uma atrofia glandular, mas apenas diminuiu a velocidade de crescimento da próstata. Assim, pode-se concluir que o padrão de resposta da próstata frente à hiperglicemia depende também do estado fisiológico em que o órgão se encontra.

Em conjunto, os resultados presentes neste estudo sugerem que as modificações fisiológicas e morfológicas induzidas pelo diabetes experimental na próstata de ratos púberes, não envolva alteração no padrão de expressão do AR, IGF-1 e IGF-1R na próstata, mas por outros mecanismos não totalmente definidos. Desta forma, mais estudos são necessários para se distinguir entre os efeitos diretos da ausência do hormônio insulina sobre a próstata e os efeitos indiretos do quadro hiperglicêmico e suas consequências para o organismo como um todo.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, processo: 2008/57959-0).

REFERÊNCIAS

ADA. 2005. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28:537-542.

Al Ghaflı MHM, Padmanabhan R, Kataya HH, Berg B. 2004. Effects of α -lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. *Molecular and cellular biochemistry* 261:123-135.

Altay B, Cetinkalp S, Doganavsargil B, Hekimgil M, Semerci B. 2003. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertility and Sterility* Sep;80 Suppl 2:828-31.

Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V. 2002. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Human Reproduction* 17(10): 2673-2677.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-2454.

Cagnon VHA, Camargo AM, Rosa RM, Fabiani R, Padovani CR, Martinez FE. 2000. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes (C BL/6J). *Tissue&Cell* 32(4):275-283.

Carvalho CAF, Camargo AM, Cagnon VHA, Padovani CR. 2003. Effects of experimental diabetes on the structure and ultrastructure of the coagulating gland of C57BL/6J and NOD mice. The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology 270A:129-136.

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner, RA. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology and Reproduction* 60:616–622.

- Desai KV, Kondaiah P. 2000. Androgen ablation results in differential regulation of transforming growth factor- β isoforms in rat male accessory sex organs and epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology* 24:253–260.
- Fávaro WJ, Padovani CR, CagnonaSuthagar VHA. 2008. Ultrastructural and proliferative features of the ventral lobe of the prostate in non-obese diabetic mice (NOD) following androgen and estrogen replacement associated to insulin therapy. *Tissue and Cell* Apr;41(2):119-32.
- Heinlein CA, Chang C. 2002. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Molecular endocrinology* 16:2181-2187.
- Ikeda K, Wada Y, Foster HE, Wang Z, Weiss RM, Latifpour J. 2000. Experimental and diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor- β . *The Journal of Urology* 164:180-185.
- Justulin Jr LA, Ureshino RP, Zanoni M, Felisbino SL. 2006. Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell Biology International* 30:354-364.
- Kleinberg DL, Ruan W, Yee D, Kovacs KT. 2007. Vidal S. Insulin-like growth factor (IGF)-I controls prostate fibromuscular development: IGF-I inhibition prevents both fibromuscular and glandular development in eugonadal mice. *Endocrinology* 148:1080-8.
- Liu X, Allen JD, Arnold JT, Blackman MR. 2008. Lycopene inhibits IGF-I signal transduction and growth in normal prostate epithelial cells by decreasing DHT-modulated IGF-I production in co-cultured reactive stromal cells. *Carcinogenesis* Apr;29(4):816-23.
- Lopaczynski W, Hruszkewycz AM, Lieberman R. 2001. Preprostatectomy: A clinical model to study stromal-epithelial interactions. *Urology* 57:194-9.

- Malecka-Tendera E, Erhardt E, Molnár D. 2005. Type 2 diabetes mellitus in European children and adolescents. *Acta Paediatr* May;94(5):543-6.
- Marchetti B, Poulin R, Plante M, Labrie F. 1988. Castration levels of plasma testosterone have potent stimulatory effects on androgen-sensitive parameters in the rat prostate. *Journal of steroid biochemistry* 31(4A):411-9.
- Mokdad AH. 2001. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 286:1195.
- Ohlson N, Bergh A, Stattin P. 2007. Wikström P. Castration-induced epithelial cell death in human prostate tissue is related to locally reduced IGF-1 levels. *Prostate* 67:32-40.
- Öztürk Y, Aydin S. 2006. Effects of streptozocin-induced diabetes and insulin on calcium responsiveness of the rat vas deferens. *Life sciences* 78:1084-1090.
- Ribeiro DL, Caldeira EJ, Cândido EM, Manzato AJ, Taboga SR, Cagnon VH. 2006. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. *European journal of histochemistry* 50(1):51-60.
- Rittmaster RS, Magor KE, Manning AP, Norman RW, Lazier CB. 1991. Differential effect of 5- α reductase inhibition and castration on androgen-regulated gene expression in rat prostate. *Molecular endocrinology* 91:1023–109.
- Ruan W, Powell-Braxton L, Kopchick JJ, Kleinberg DL. 1999. Evidence that insulin-like growth factor I and growth hormone are required for prostate gland development. *Endocrinology* 140:1984-1989.
- Saucier J, Dubé JY, Tremblay RR. 1981. Specific insulin binding sites in rat testis: characterization and variation. *Endocrinology* 109(6):2220-5.
- Schneider JE. 2004. Energy balance and reproduction. *Physiology and Behavior* 81:289-317.

- Soudamani S, Yuvaraj S, Malini T, Balasubramanian K. 2005. Experimental diabetes há. The Anatomical Record Part A 287A:1281-1289.
- Steger RW, Amador A, Lam E, Rathert J, Weis J, Smith MS. 1989. Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. Endocrinology 124(4):1737-1743.
- Steger RW, Kienast G. 1990. Effect of continuous versus delayed insulin replacement on sex behavior and neuroendocrine function in diabetic male rats. Diabetes 39:942-948.
- Sudha S, Sankar BR, Valli G, Govindarajulu P, Balasubramanian K. 1999. Streptozotocin-diabetes impairs prolactin binding to Leydig cells in prepubertal and pubertal rats. Horm Metab Res. Nov;31(11):583-6.
- Vilamaior PSL, Taboga SR, Hernandes FC. 2006. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometric study. The Anatomical Record Part A 288A: 885-892.
- Yono M, Pouresmail M, Takahashi W, Flanagan JF, Weiss RM, Latifpour J. 2005. Effect of insulin treatment on tissue size of the genitourinary tract in BB rats with spontaneously developed and streptozotocin-induced diabetes. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 372:251-255.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Escala de coloração utilizada para leitura e interpretação das fitas utilizadas para a avaliação semiquantitativa dos valores de glicosúria e cetonúria dos animais dos grupos experimentais. 50mg/dl = 2,8mmol/l.

Figura 2. Consumo hídrico (ml) dos ratos, durante o período de maturação prostática, mortos aos 61 dias de idade. Valores expressos em média $\pm$ SD. Teste de Kruskall Wallis. Animais púberes: CS (controle, n=5), DS (diabético, n=6), DIS (diabético com reposição simultânea de insulina, n=4).

Figura 3. Consumo de ração (g) dos ratos, durante o período de maturação prostática, mortos aos 61 dias de idade. Valores expressos em média $\pm$ SD. Teste de Kruskall Wallis. Animais púberes: CS (controle, n=5), DS (diabético, n=6), DIS (diabético com reposição simultânea de insulina, n=4).

Figura 4. Consumo hídrico (ml) dos ratos, durante o período de maturação prostática, mortos aos 81 dias de idade. Valores expressos em média $\pm$ SD. Teste de Kruskall Wallis. Animais púberes: CT (controle, n=5), DT (diabético, n=6), DIT (diabético com reposição tardia de insulina, n=7).

Figura 5. Consumo de ração (g) dos ratos, durante o período de maturação prostática, mortos aos 81 dias de idade. Valores expressos em média $\pm$ SD. Teste de Kruskal-Wallis. Animais adultos: CT (controle, n=5), DT (diabético, n=6), DIT (diabético com reposição tardia de insulina, n=7).

Figura 6. Evolução do peso corporal dos ratos, durante o período de maturação prostática, mortos aos 61 dias de idade. Valores expressos em média $\pm$ SD. Análise de Variância Anova. CS (controle, n=5), DS (diabético, n=6), DIS (diabético com reposição simultânea de insulina, n=4).

Figura 7. Evolução do peso corporal dos ratos, durante o período de maturação prostática, mortos aos 81 dias de idade. Valores expressos em média $\pm$ SD. Análise de Variância Anova. CT (controle, n=5), DT (diabético, n=6), DIT (diabético com reposição tardia de insulina, n=7).

Figura 8. Evolução do peso absoluto prostático do lobo ventral. Nesta figura é possível reconhecer que mesmo com as alterações nos níveis plasmáticos de glicemia e da testosterona, o lobo ventral apresentou crescimento glandular, principalmente entre o período de 60 a 80 dias. O peso aos 40 dias foi baseado nos dados de Vilamaior et al. (2005).

Figura 9. Imunocitoquímica para o receptor de andrógeno (AR) na próstata ventral de rato dos diferentes grupos experimentais. **a)** Controle 60 dias; **b)** Controle 80 dias; **c)** Diabético 60 dias; **d)** Diabético 80 dias; **e)** Diabético com reposição simultânea de insulina 60 dias; **f)** Diabético com reposição tardia de insulina 80 dias. Observar marcação positiva nos núcleos (mais forte) e no citoplasma (mais fraca) das células epiteliais prostáticas (setas).

Figura 10. Imunocitoquímica para o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1) no lobo ventral de ratos púberes nos diferentes grupos. **a)** Controle 60 dias; **b)** Controle 80 dias; **c)** Diabético 60 dias; **d)** Diabético 80 dias; **e)** Diabético com reposição simultânea de insulina 60 dias; **f)** Diabético com reposição tardia de insulina 80 dias. Observar marcação positiva (mais forte) no citoplasma das células epiteliais (setas finas) e na região estromal dos lobos prostáticos (setas grossas), inclusive na camada muscular de vasos, principalmente nos animais diabéticos (c e d). Aumento de 400X.

Figura 11. Imunohistoquímica para o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1R) no lobo ventral de ratos púberes nos diferentes grupos. **a)** Controle 60 dias; **b)** Controle 80 dias; **c)** Diabético 60 dias; **d)** Diabético 80 dias; **e)** Diabético com reposição simultânea de insulina 60 dias; **f)** Diabético com reposição tardia de insulina 80 dias. Observar marcação positiva (mais forte) no citoplasma das células epiteliais (setas finas) e na região estromal dos lobos prostáticos (setas grossas), inclusive na camada muscular de vasos, principalmente nos animais diabéticos (c e d). Aumento de 400X.

Figura 12. Western Blotting para o receptor de andrógeno (AR). Observar marcação positiva em uma banda com peso molecular relativo de 110kDa, que corresponde ao peso molecular esperado do AR. Análise densitométrica mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre as bandas dos diferentes grupos experimentais.

Figura 13. Western Blotting para o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1). Observar marcação positiva em uma banda com peso molecular relativo de 6kDa, que corresponde ao peso molecular esperado do IGF-1. Análise densitométrica mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre as bandas dos diferentes grupos experimentais.

Figura 14. Western Blotting para o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1R). Observar marcação positiva em uma banda com peso molecular relativo de 155kDa, que corresponde ao peso molecular esperado do IGF-1R. Análise densitométrica mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre as bandas dos diferentes grupos experimentais.

TABELAS

Tabela 1. Média das concentrações sanguíneas de glicose dos ratos controles, diabéticos e diabéticos + reposição de insulina (simultânea e tardia) durante o período de maturação prostática.

Dias após a administração de STZ		Concentração de glicose sanguínea (mg/dl)	
	CS (n=5)	DS (n=6)	DIS (n=4)
Dia 2	82,60 ± 6,10	289,33 ± 74,54*	295,75 ± 55,77* <i>Ri</i>
Dia 7	58,60 ± 10,52	353,50 ± 82,51*	45,25 ± 13,84
Dia 14	89,00 ± 6,92	358,60 ± 23,11**	104,50 ± 14,75
Dia 21	54,60 ± 5,87	318,33 ± 98,63*	43,00 ± 17,30
	CT (n=5)	DT (n=6)	DIT (n=7)
Dia 2	72,40 ± 14,11	256,85 ± 61,02*	265,85 ± 38,06*
Dia 7	57,60 ± 15,32	255,16 ± 24,58*	263,50 ± 74,21*
Dia 14	85,20 ± 8,08	354,67 ± 80,02*	350,17 ± 60,82*
Dia 21	75,60 ± 1,40	311,00 ± 102,85*	376,83 ± 68,38** <i>Ri</i>
Dia 28	75,60 ± 21,40	311,00 ± 102,85**	176,50 ± 61,90
Dia 35	81,68 ± 12,36	362,33 ± 98,63***	98,53 ± 40,12
Dia 41	65,60 ± 4,27	333,00 ± 57,09**	32,80 ± 3,96

Valores expressos em média±SD. *p<0,05; **p<0,01, comparados ao grupo controle. Teste de Kruskal-Wallis. Animais púberes: CS (controle), DS (diabético), DIS (diabético com reposição simultânea de insulina). Animais adultos: CT (controle), DT (diabético), DIT (diabético com reposição tardia de insulina). Ri: início da reposição com insulina.

Tabela 2. Peso absoluto e relativo do lobo ventral dos animais dos grupos experimentais

<i>Grupos de 60 dias</i>	CS (n=5)	DS (n=6)	DIS (n=4)
PV (mg)	210,56 ± 48,25	85,90 ± 36,17**	168,17 ± 16,92
PV (mg/100g)	73,82 ± 18,15	47,37 ± 16,72	61,85 ± 5,68
<i>Grupos de 80 dias</i>	CT (n=5)	DT (n=6)	DIT (n=7)
PV (mg)	299,20 ± 76,18	155,41 ± 61,24**	232,48 ± 38,61
PV (mg/100g)	85,47 ± 17,50	69,20 ± 21,14	79,43 ± 10,03

Valores expressos em média ± DP. **p<0,01, comparados ao grupo controle. Análise da Variância Anova. CS (controle), DS (diabético), DIS (diabético com reposição simultânea de insulina). CT (controle), DT (diabético), DIT (diabético com reposição tardia de insulina). PV: próstata ventral.

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de diidrotestosterona (DHT) e testosterona (T) nos animais controles, diabéticos e diabéticos com reposição simultânea e/ou tardia de insulina.

Parâmetro	CS	DIS	DS	CT	DIT	DT
Concentração plasmática DHT (ng/dl)	28,28 ±10,48	21,11 ±17,10	18,15 ±5,92	30,48 ±18,45	23,73 ±15,08	30,28 ±6,80
Concentração plasmática T (ng/dl)	184,45 ±85,98	89,57 ±95,34*	32,46 ±31,21**	350,45 ±210,68	46,42 ±31,18***	22,77 ±15***

Valores expressos em média±SD.***p<0,001, comparados aos grupos controles idade-emparelhados. Teste de Kruskal-Wallis. Animais púberes: CS (controle), DS (diabético), DIS (diabético com reposição simultânea de insulina). Animais adultos: CT (controle), DT (diabético), DIT (diabético com reposição tardia de insulina).

FIGURAS

Figura 1

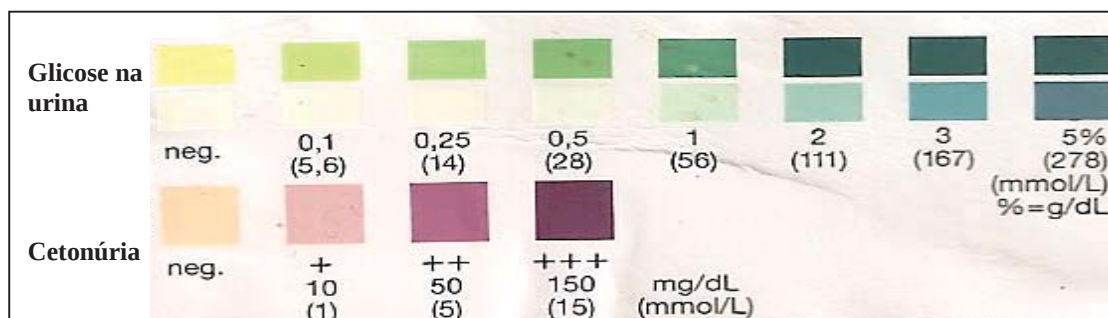


Figura 2

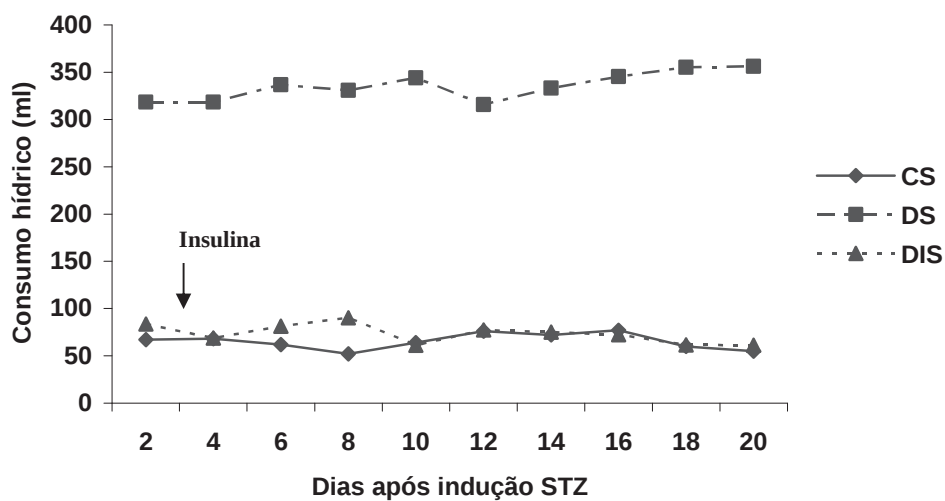


Figura 3

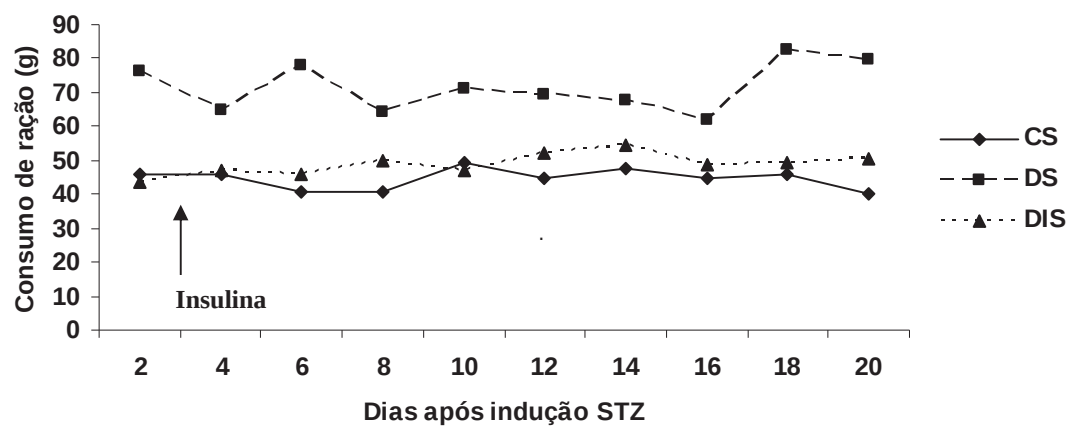


Figura 4

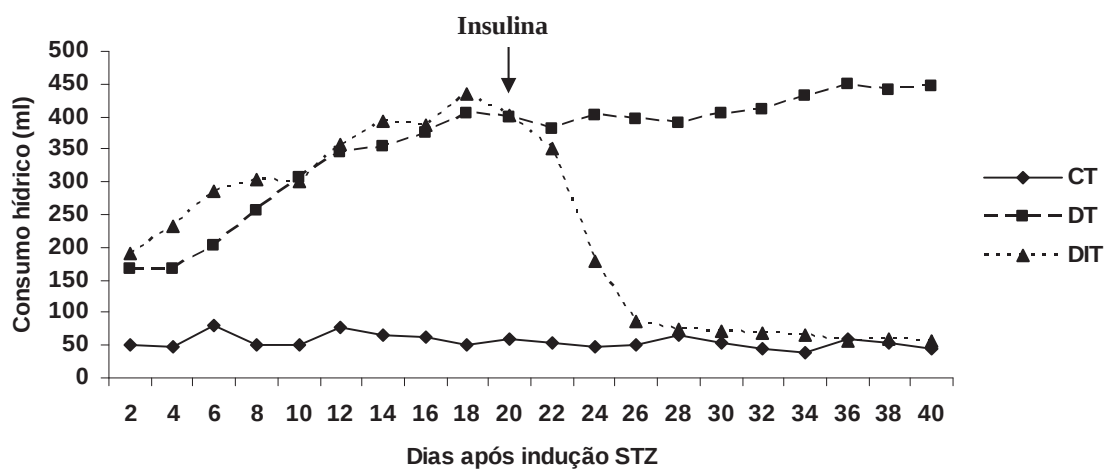


Figura 5

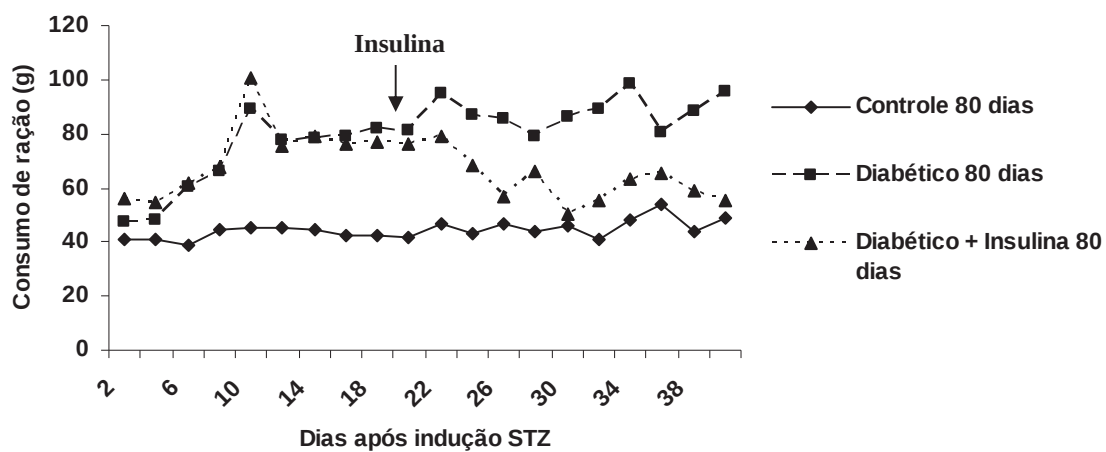


Figura 6

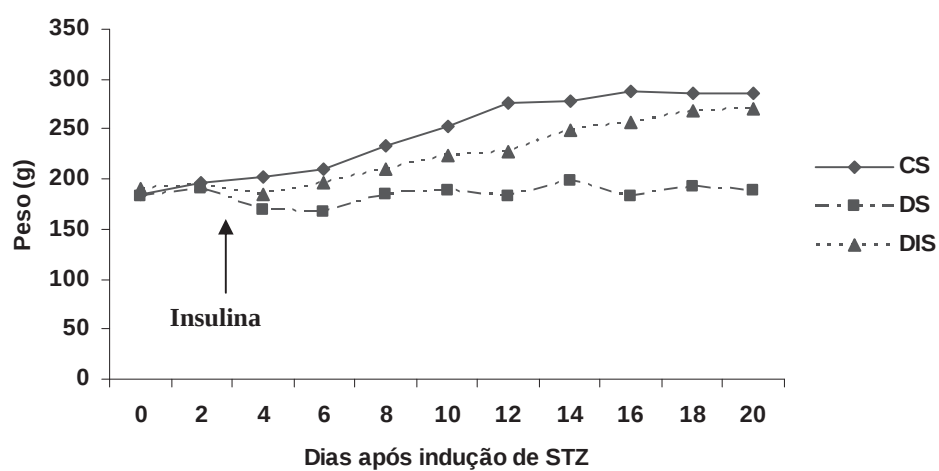


Figura 7

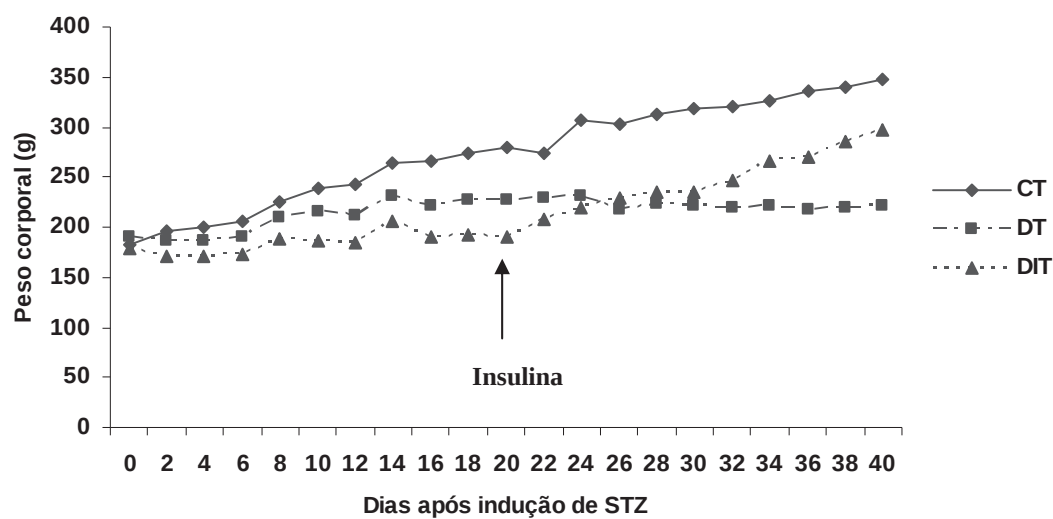


Figura 8

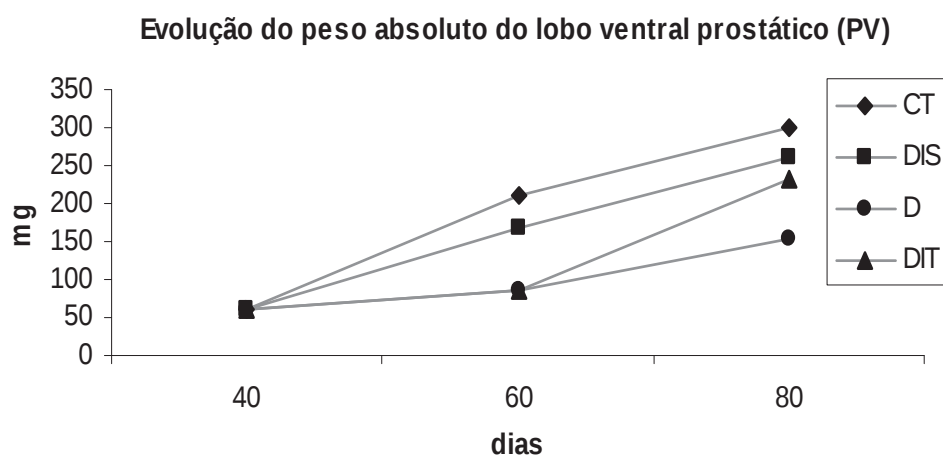


Figura 9

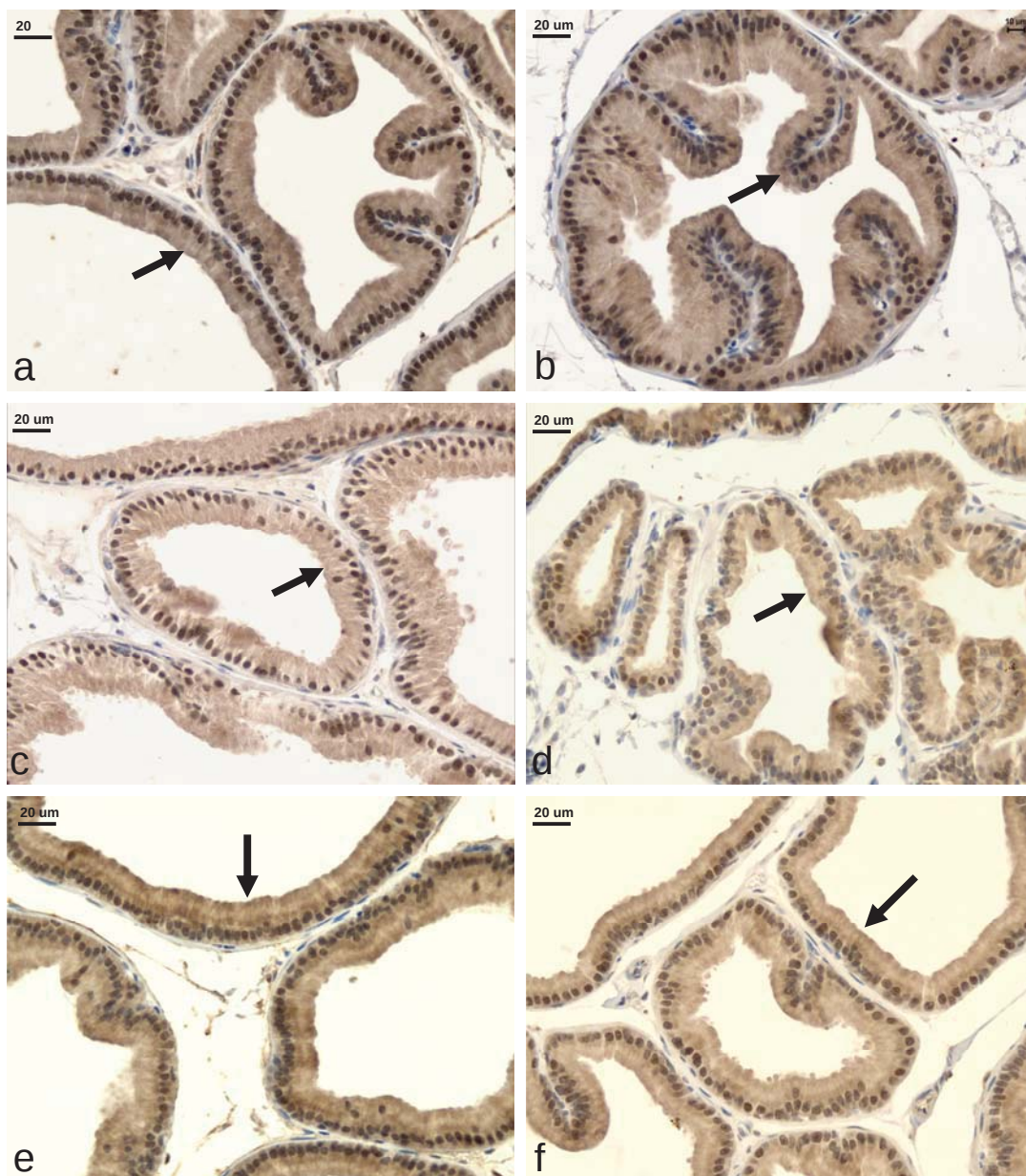


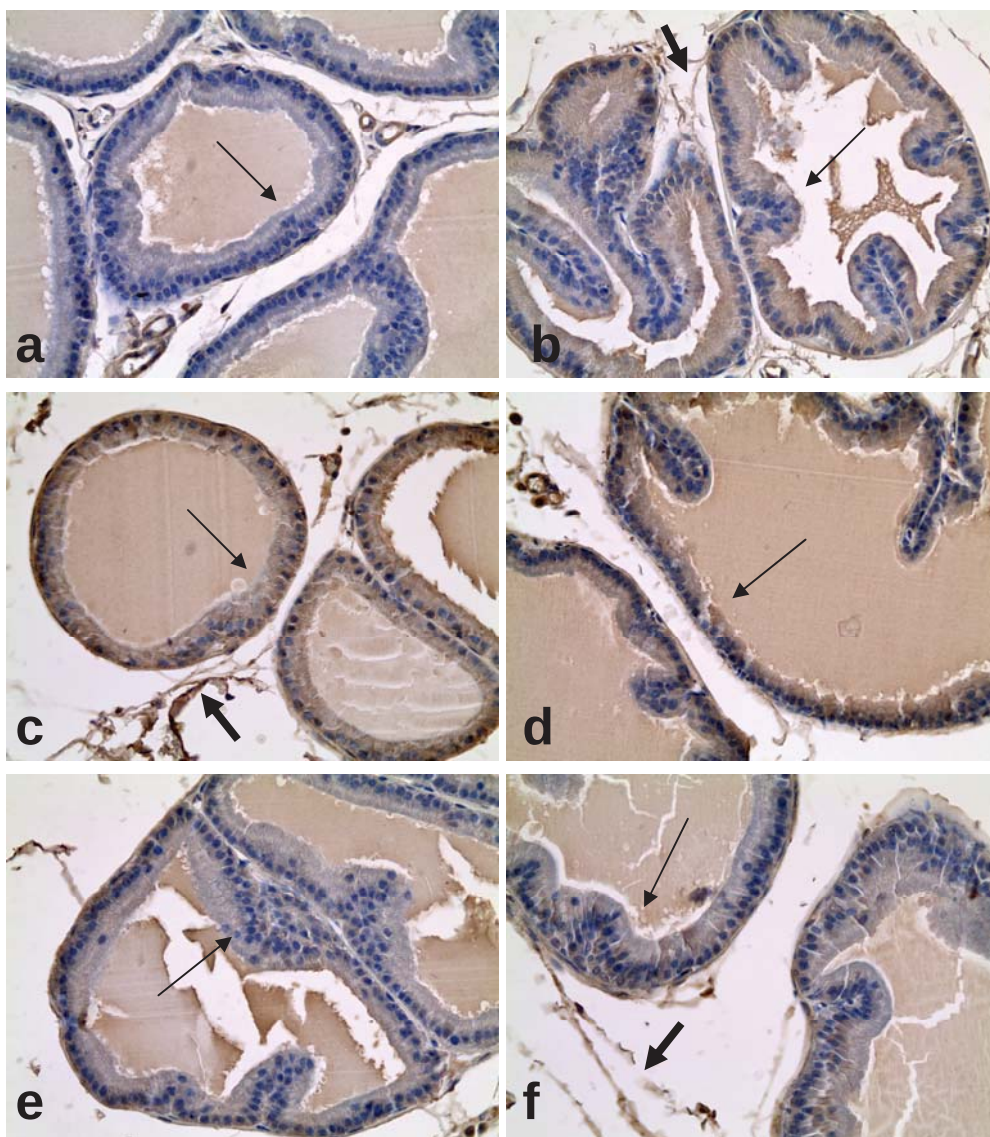
Figura 10

Figura 11

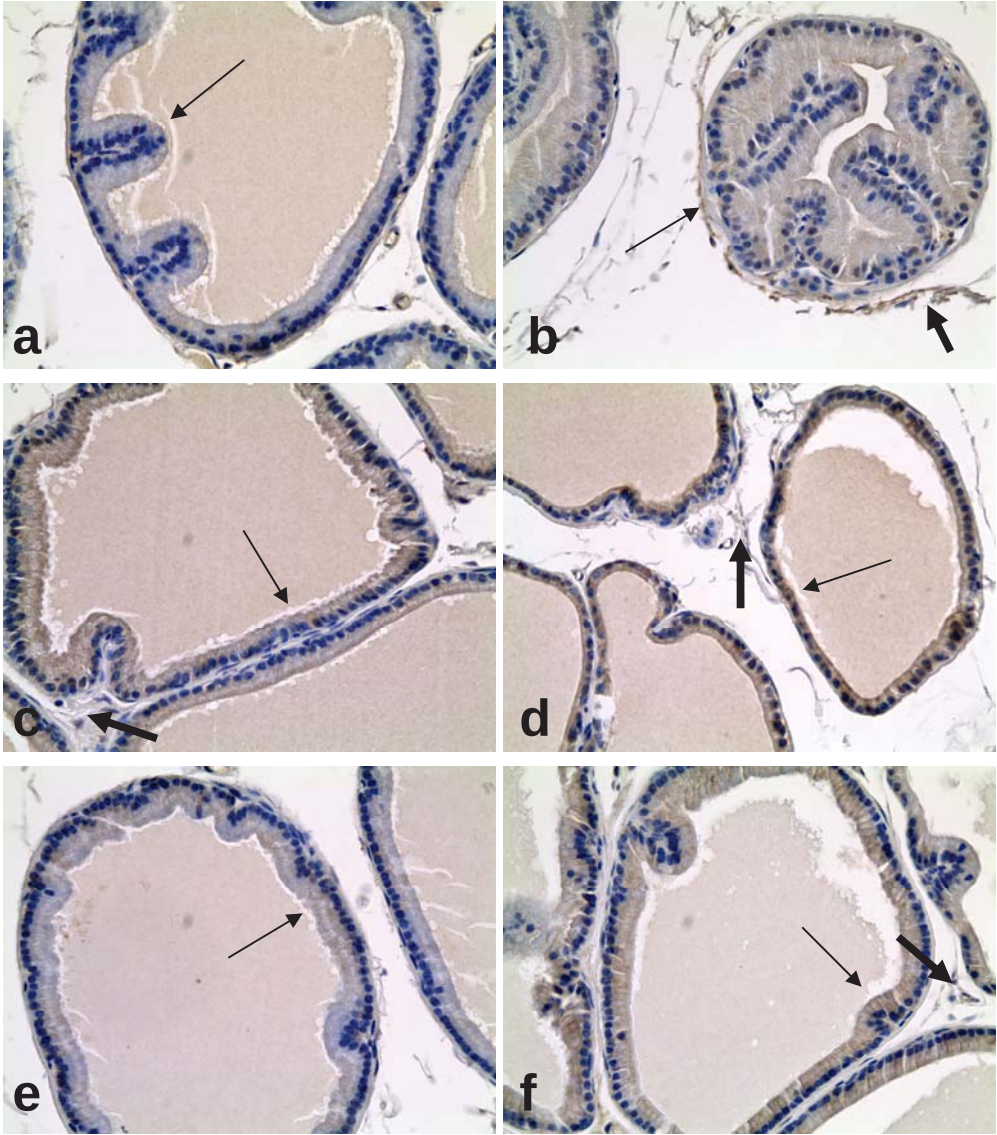
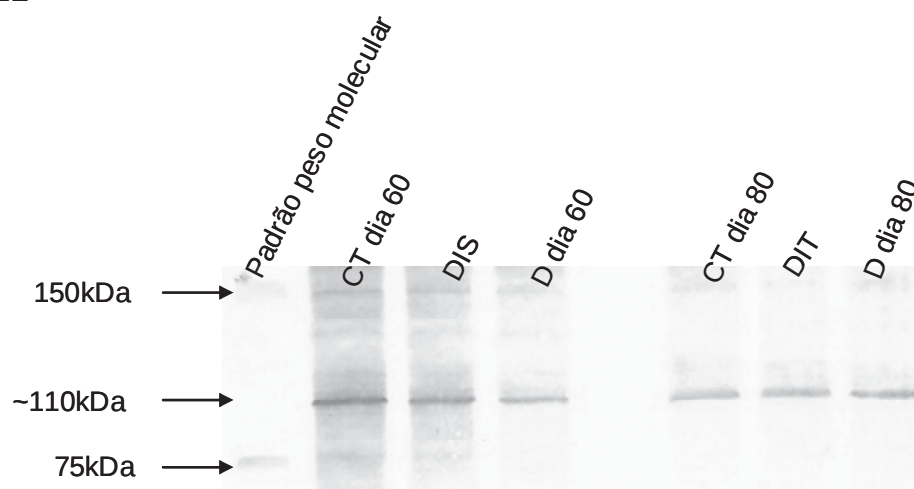
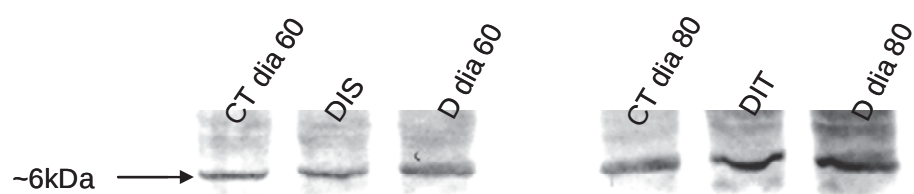


Figura 12**Figura 13****Figura 14**