

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTO FÍSICO, SEXUAL E FUNÇÃO REPRODUTIVA DA
PROLE FEMININA DE RATAS DIABÉTICAS

RAQUEL SPADOTTO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de PG em Biologia
Geral e Aplicada.

BOTUCATU – SP

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**DESENVOLVIMENTO FÍSICO, SEXUAL E FUNÇÃO REPRODUTIVA DA
PROLE FEMININA DE RATAS DIABÉTICAS**

RAQUEL SPADOTTO

ORIENTADORA: PROF^a DR^a WILMA DE GRAVA KEMPINAS

CO-ORIENTADOR: PROF^o DR^o ANTONIO FRANCISCO GODINHO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de PG em Biologia Geral e Aplicada.

BOTUCATU – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Spadotto, Raquel.

Desenvolvimento físico, sexual e função reprodutiva da prole feminina de ratas diabéticas / Raquel Spadotto. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Profª Drª Wilma De Grava Kempinas

Co-orientador: Profº Drº Antonio Francisco Godinho

Assunto CAPES: 20406010

**1. Reprodução – Biologia 2. Sexualidade
(Biologia) 3. Sexo (Biologia)**

CDD 574.36

Palavras-chave: Desenvolvimento físico; Comportamento sexual; Diabete;
Streptozotocin; Função reprodutiva feminina; Prenhez; Rata

Botucatu, 26 de fevereiro de 2007.

Banca Examinadora

Profª Drª Wilma De Grava Kempinas (Orientadora)

Assinatura

Profª Drª Sebastião Roberto Taboga

Assinatura

Profª Drª Débora Cristina Damasceno

Assinatura

Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro

Assinatura

Profª Drª Fernanda Klein Marcondes

Assinatura

Dedicatória

A minha mamãe, que eu tanto amo!

Agradecimentos

À Deus que é meu pai, me ama e com esse amor me ensinou que o primeiro passo para a sabedoria é o silêncio; o segundo, a escuta e por ter me dado força e direção em todos os momentos da minha vida.

“Por que maior é aquele que está em vós do que aquele que está no mundo.”

(1Jo 4:4^b)

À minha mamãe Eliane, que eu amo e que nos momentos mais tristes, alegres, nas vitórias, derrotas, dificuldades, decisões, esteve sempre segurando minha mão e me guiando, pelo incentivo, confiança e pelo amor incondicional em todos os momentos a está mulher virtuosa que excede o valor de jóias preciosas, mamãe você é uma mulher assombrosamente maravilhosa. A Tia Irene, que eu considero como uma vovó, pois sempre acreditou, confiou no meu potencial e sempre torceu pelo meu sucesso.

À minha irmã gêmea Renata, meu cunhado Luis Gustavo e minha sobrinha Fernanda, que eu amo muito, ambos são um dos maiores tesouros da minha vida.

“Não andeis ansiosos de cousa alguma.” (Fl 4:6^a)

Ao meu padrasto Paulinho, uma pessoa assombrosamente especial que Deus colocou no caminho de minha família e que tornou as nossas vidas muito mais felizes.

Ao meu noivo Marcos Antonio Amaral, uma pessoa maravilhosa que Deus colocou no meu caminho e que nos momentos mais difíceis do meu experimento me agüentou, me incentivou e acima de tudo esteve sempre ao meu lado.

“O homem fiel será cumulado de bênçãos.” (Pv 29:20^a)

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Wilma De Grava Kempinas, palavras são poucas para demonstrar o que você estimada mestra significou e significa para mim, foi um privilégio tê-la como minha orientadora, que com todo seu carinho, dedicação, sabedoria, ensinou-me a subir degrau por degrau para que hoje eu pudesse brilhar, o brilho do saber. Seu cuidado será marcado para sempre em minha vida. Obrigada por você ser do jeitinho que é toda especial e única.

“Fala com sabedoria e a instrução da bondade está na sua língua.”

(Pv 31:26)

Ao meu querido co-orientador Prof^o Dr^o Antonio Francisco Godinho, pelo incentivo, pela oportunidade de tornar o meu sonho realidade e por muitas vezes parar o que estava fazendo para me receber e prontamente me ajudar.

“Águas profundas são as palavras da boca do homem, e a fonte da sabedoria, ribeiros transbordantes.” (Pv 18:4)

À Prof^{ta} Dr^a Fernanda Klein Marcondes, pois prontamente me recebeu em seu laboratório e ensinou-me a técnica de lavagem vaginal em ratas, à Prof^{ta} Dr^a Débora Cristina Damascena, que muito contribuiu para o meu conhecimento profissional em diabete, ao Prof^o Dr^o Sebastião Roberto Taboga e a Prof^{ta} Dr^a Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro por participarem da minha banca.

Ao José Eduardo, técnico do Laboratório de Rotina em Embriologia, por toda ajuda no processamento dos materiais histológicos, amizade e ensinamento.

“O homem fiel será cumulado de bênçãos.” (Pv 29:20^a)

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Toxicologia da Reprodução: Ana Paula, Arielle, Azize, Carla, Davi, Elaine, Fabíola, Glaura, Gustavo, Juliana Akinaga, Juliana Perobeli, Larissa, Marina e Thaiane, pelo ambiente de trabalho maravilhoso e por toda a amizade vocês ficaram para sempre em meu coração. Em especial à Elaine, por sua companhia em todos os momentos do meu experimento, amizade depositada em mim, confiança nos momentos de sua vida e toda a sabedoria que ela me passou e a seu bebê (Bianca), que Deus os abençoe ricamente.

“Tem pessoas que passam pela nossa vida e só passam mais já a outras que passam e ficam para todo o sempre, vocês são essas pessoas, muito importantes muito significativas.”

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, Lucilene, Sergio e Sônia por toda a ajuda.

À secretária do Departamento de Morfologia da UNESP – I.B. – Botucatu, Luciana por toda a ajuda.

À bibliotecária Selma Maria de Jesus, pela ajuda na elaboração da ficha catalográfica.

À Profª Drª Fernanda Mani do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, por acreditar no potencial que Deus me deu e me ajudar quando precisei, parando tudo o que estava fazendo e me recebendo de braços abertos.

Ao Profº Drº Wesley Augusto Conde Godoy do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, que muito me incentivou a realizar o meu grande sonho.

Ao Profº Drº Francisco Eduardo Martinez do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu e ao Profº Drº Gustavo Tadeu Volpato do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu, por ambos terem aceitado compor a minha banca de qualificação.

Aos meus queridos amigos de mestrado e doutorado do programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada.

Aos mestres, por tudo que me ensinaram. Tudo o que aprendi devo a eles.

“Feliz a pessoa que acha sabedoria, e a pessoa que adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino.” (Pv 3:13-14)

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

Aos animais de laboratório, os ratos e ratas Wistar. Sem eles, esta pesquisa não teria sido concretizada.

Muito obrigada!

“Porque, quando sou fraco, então, é que sou forte.” (II Co 12:10^b)

Epígrafe

Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que

Deus tem preparado para aqueles que o amam. (1Co 2:9^b)

Sumário

Resumo.....	01
Abstract.....	02
Introdução.....	03
Objetivos.....	22
Referências bibliográficas da introdução.....	23
Capítulo.....	29
Título.....	30
Resumo.....	31
Introdução.....	32
Materiais e Métodos.....	33
Resultados.....	40
Discussão.....	42
Referências bibliográficas.....	48
Tabelas.....	55
Legendas das figuras.....	59
Figuras.....	60
Conclusões finais.....	62

RESUMO

Diabetes mellitus é uma síndrome caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta da ação da insulina em órgãos-responsivos-alvo, resultando na exposição de todos os tecidos à hiperglicemia crônica. O diabetes durante a gestação é caracterizado por numerosos distúrbios no desenvolvimento e crescimento fetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar os desenvolvimentos físico e sexual e a função reprodutiva, na puberdade e idade adulta, de ratas que se desenvolveram em condições hiperglicêmicas *in utero* e na lactação. Para tanto, foram utilizadas 72 ratas Wistar, divididas em dois grupos experimentais: diabético (n= 55), cujas ratas receberam streptozotocin administrada i.v. em dose única de 40 mg/kg; controle (n= 17), cujas ratas receberam tampão citrato segundo o mesmo protocolo experimental. Somente foram selecionadas para o grupo diabético ratas que apresentaram, oito dias após a injeção de streptozotocin, glicemia superior a 200 mg/dl, caracterizando diabetes grave. As ratas dos dois grupos foram acasaladas com ratos normais, e o desenvolvimento da prole foi avaliado através dos seguintes parâmetros: na pré-puberdade, o desenvolvimento físico (peso corpóreo, idade da abertura de olhos, do aparecimento de pêlos, do descolamento das orelhas e do aparecimento dos incisivos); na puberdade, a idade de abertura vaginal, do primeiro estro e peso e avaliação histológica do útero e ovários; na idade adulta, a duração do ciclo estral, o comportamento sexual e a fertilidade após acasalamentos naturais. O diabetes grave materno causou, na prole feminina, retardo no desenvolvimento físico, na idade de abertura vaginal e do primeiro estro. Na idade adulta, houve diminuição do peso dos ovários e do número de folículos. Embora o comportamento sexual não tenha se alterado, a performance reprodutiva da prole de ratas diabéticas foi inferior à do grupo controle, tendo ocorrido diminuição do número de fetos. Concluiu-se que a exposição aos meios intrauterino e lactacional hiperglicêmicos causou retardos no desenvolvimento físico e sexual e prejudicou a função reprodutiva de ratas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a syndrome characterized by absolute or relative deficiency of the action of insulin in responsive target organs, resulting in the exposition of all tissues to a chronic hyperglycemia. Diabetes during gestation is characterized by numerous disturbances in fetal development and growth. The objective of this work was to evaluate physical and sexual development and reproductive function, at puberty and adulthood, in rats that developed in hyperglycemic conditions *in utero* and during lactation. For this, 72 Wistar rats were utilized, divided into two experimental groups: diabetic (n=55), whose rats received streptozotocin administered i.v. in one dose of 40 mg/kg; and control (n= 17), whose rats received citrato buffer according to the same experimental protocol. Only rats presenting glycemia superior to 200 mg/dl, eight days after streptozotocin injection, characterizing severe diabetes, were selected for the diabetic group. The rats from both groups were mated with normal rats, and offspring development was evaluated through the following parameters: at prepuberty, physical development (body weight, age of eyes opening, hair appearance, ear detachment and appearance of the incisors); at puberty, the age of vaginal opening and first estrous, and the weight and histological aspect of the uterus and ovaries; the duration of the estrous cycle, sexual behavior and the fertility after natural mating at adulthood. The maternal diabetes provoked, in the female offspring, delays in the initial physical development, and the age of vaginal opening and first estrous. At adulthood, there was a diminution in the ovary weights and number of follicles. Although the sexual behavior was not altered, in the offspring of diabetic rats the reproductive performance was inferior when compared to the control group, with diminution of the number of fetuses. It was concluded that exposure to the hyperglycemic intrauterine and lactational environments provoked delays in the physical and sexual development and harmed the reproductive function of rats.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma síndrome caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta da ação da insulina em órgãos-responsivos-alvo, resultando na exposição de todos os tecidos à hiperglicemia crônica. (REECE et. al., 2004). A deficiência na ação da insulina, base comum do diabete, causa anormalidades características no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos (ADA, 2005). É progressiva, silenciosa e atinge vários órgãos (CALDERON et al., 1999).

A etiologia da doença é multifatorial, sendo influenciada por fatores genéticos e/ou ambientais. Clinicamente, o diabete se caracteriza pelo desenvolvimento, a longo prazo, de complicações microvasculares (microangiopatia diabética), retinopatia, nefropatia, neuropatia. O diabete acelera e aumenta a ocorrência de arteriosclerose, aumentando os riscos de infarto do miocárdio. Estas complicações constituem as principais causas de morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos. Dependendo da severidade da anormalidade metabólica, o diabete pode ser assintomático ou pode estar associado a sintomas clássicos tais como polidipsia (aumento da ingestão de líquidos; sede), poliúria (aumento da frequência urinária), polifagia (aumento da ingestão de alimentos), baixo ganho de peso corporal. Nos casos mais graves, cetoacidose ou o estado hiperglicêmico-hiperosmolar ocorre, podendo levar a distúrbios de consciência, coma e morte (KUZUYA et al., 2002).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que um distúrbio no ambiente intrauterino afeta o desenvolvimento fetal, podendo causar mudanças estruturais e bioquímicas permanentes no organismo embriofetal, aumentando a probabilidade destes indivíduos desenvolverem patologias tais como doenças cardíacas, hipertensão, resistência à insulina, *Diabetes mellitus* tipo 2 e osteoporose (BARKER & OSMOND, 1968; BOLOKER et al., 2002; NATHANIELSZ & THORNBURG, 2003), sugerindo que ocorra uma “programação” na vida embrionária de possíveis doenças crônicas que venham a se desenvolver na vida adulta. Desta forma, qualquer tipo de desequilíbrio que possa ocorrer no organismo materno pode causar profundas repercussões na saúde do recém-nascido, ao longo do desenvolvimento e na vida adulta (LESAGE et al., 2004; ZAMBRANO et al., 2005a,b; ZAMBRANO et al., 2006).

Modelos animais têm sido extensivamente utilizados em pesquisas sobre o diabete. Além de compreender os mecanismos da patogênese e complicações decorrentes da

doença, todos os novos tratamentos para o diabetes, incluindo transplante de células das ilhotas e estratégias preventivas, são inicialmente investigados em modelos animais (REES & ALCOLADO, 2005; ZHAO & REECE, 2005). Um outro importante campo de pesquisa que tem se apoiado nos animais de experimentação é o estudo do diabetes na gravidez e o papel do meio intrauterino metabólico anormal no subsequente desenvolvimento e função da prole, independente da herança genética (BOLOKER et al., 2002).

A seguir, será apresentada uma breve descrição do aparelho reprodutor feminino. Em seguida, uma revisão da literatura, iniciando pelo pâncreas e pelo papel da insulina, para se compreender melhor a relação entre o diabetes materno e o desenvolvimento sexual da prole feminina de ratos.

1. Anatomia e Fisiologia do Sistema Genital de Ratas

O sistema reprodutor é responsável por produzir e transportar os gametas para a reprodução sexual e, nas fêmeas, atua também protegendo e nutrindo o embrião (WALKER & HOMBERGER, 1997). Nas ratas, o sistema reprodutor é formado basicamente por vagina, útero e ovários e ovidutos (ANDERSON et al., 2004).

O útero é um órgão em forma de Y. Ele consiste num par de alongados cornos uterinos, independentes entre si. Caudalmente, esses cornos são rodeados por musculatura, formando um pequeno corpo uterino e logo abaixo deste corpo, encontra-se a cervix uterina (WALKER & HOMBERGER, 1997).

Os ovários constituem-se de uma massa sólida de células e tecidos. Podem ser divididos em medula (no centro do ovário, e constituído de tecido conjuntivo altamente vascularizado) e córtex (constituído por tecido conjuntivo denso e folículos, que envolvem os oócitos). O tecido conjuntivo cortical forma uma camada densa em volta do ovário, que é desprovido de folículos e recebe o nome de túnica albugínea. A periferia do córtex ovariano logo abaixo da túnica albugínea, é composta por varias camadas de folículos primordiais. Cada um desses folículos contém oócito primário e é circundado por uma camada de células achatadas. Como o ovário funciona também como um órgão endócrino, produz hormônios responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento dos folículos

primordiais até atingirem o tamanho de folículo de Graaf, estando prontos para ovulação. Após a ovulação, há formação do corpo lúteo a partir das células remanescentes do folículo maduro rompido durante a ovulação (JUNQUEIRA, 1999).

Os folículos, juntamente com o corpo lúteo, são glândulas endócrinas. Os folículos desenvolvem-se sob estímulo do FSH (hormônio folículo estimulante) secretado pela adenohipófise. Assim que se tornam maduros, eles secretam estrógeno, que é responsável pelo crescimento uterino e desenvolvimento endometrial. O corpo lúteo desenvolve-se por influência do hormônio luteinizante, também secretado pela adenohipófise e secreta, principalmente, progesterona. Este hormônio é necessário para o desenvolvimento final e aumento da vascularização do endométrio, preparando-o para uma possível implantação de um óvulo fertilizado. Ele também realiza a manutenção do endométrio proliferado e da placenta nos primeiros estágios de prenhez (WALKER & HOMBERGER, 1997).

As fêmeas são animais poliétricos, e o ciclo reprodutivo tem a duração de cerca de 4 a 5 dias, e entre 4 a 12 oócitos são ovulados por ciclo (WALKER & HOMBERGER, 1997).

2. Pâncreas

O pâncreas situa-se transversalmente ao longo da parede posterior do abdome, é alongado e de forma irregularmente prismática. Sua extremidade direita é chamada de cabeça, estando unida ao corpo por uma constrição, o colo, enquanto sua extremidade esquerda se adelgaça para formar a cauda. A glândula pesa cerca de 250 gramas (g) e dentro do pâncreas, especialmente na cauda, estão pedaços muito pequenos de tecido chamados ilhotas pancreáticas (JUNQUEIRA, 1999). O pâncreas é uma glândula mista, exercendo tanto função endócrina quanto exócrina. A porção exócrina apresenta-se como uma glândula acinosa composta que, além de íons e água, secreta enzimas digestivas no duodeno. As ilhotas pancreáticas constituem a porção endócrina do pâncreas, são produtoras de hormônios como a insulina, o glucagon, a somatostatina e o polipeptídio pancreático, representando cerca de 1,5% do seu volume total, sendo mais numerosa na cauda do pâncreas, apresentando-se sob a forma de aglomerados arredondados de células, imersos no tecido pancreático exócrino. Cada ilhota mede aproximadamente 75 a 150µm. O número de ilhotas no pâncreas humano é variável, oscilando ao redor de 1.000.000.

Localizam-se entre o parênquima glandular exócrino, ou seja, entre os ácinos pancreáticos, cada ilhota contém de 80 a 100 células β (JUNQUEIRA, 1999).

As células endócrinas são poligonais e estão distribuídas na ilhota ao longo de capilares fenestrados. Cada ilhota contém aproximadamente 2.000 células (BANDEIRA, 2003).

2.1. Tipos celulares nas ilhotas e suas funções

No século XIX, Brockman, em seus estudos com peixes, e Langerhans, em seus estudos em humanos, descreveram e caracterizaram as ilhotas pancreáticas. Dois cientistas alemães, Von Mering e Minkowski, observaram em 1889 que cães pancreatomizados desenvolviam um quadro clínico semelhante ao diabetes humano. Após esta descoberta, muitos experimentos em coelhos e cachorros se seguiram, embora a história tenha dado destaque especial a Marjorie, um dos cachorros utilizados por Banting e Best em seus experimentos (REES & ALCOLADO, 2005).

As ilhotas pancreáticas são constituídas por cinco tipos de células: alfa (α), beta (β), delta (δ), célula que produz o polipeptídeo pancreático (PP) e células G. Juntas, secretam mais de 20 hormônios, sendo 4 principais: glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático (GUYTON & HALL, 1997; GARTNER & HIATT, 1999).

As células A ou alfa (α) secretam o hormônio glucagon que possui a função de aumentar o nível de glicose no sangue (hiperglicêmico), assim pode-se dizer que o glucagon tem um efeito anti-insulínico, ocorrem na periferia das ilhotas e representam cerca de 20% das células das ilhotas. Predominam nas regiões da cauda, corpo e parte anterior da cabeça do pâncreas; apenas 0,5% do total de células A localiza-se na parte da cabeça do pâncreas (GUYTON & HALL, 1997; GARTNER & HIATT, 1999; BANDEIRA, 2003).

As células B ou beta (β), representam aproximadamente 70% da população celular das ilhotas, e se caracterizam pela presença de grânulos citoplasmáticos de depósito e liberação de insulina, que é responsável pelo transporte de glicose através da membrana celular, peptídeo C, pró-insulina, amilina e ácido gama-aminobutírico (GABA). Predominam nas regiões da cauda, corpo e porção anterior da cabeça do pâncreas, apesar

de também existirem no lobo posterior (GUYTON & HALL, 1997; GARTNER & HIATT, 1999; BANDEIRA, 2003).

As células D ou delta (δ) realizam a síntese de somatostatina e constituem de 5 a 10% da população celular. Predominam nas regiões da cauda, corpo e porção anterior da cabeça do pâncreas (GUYTON & HALL, 1997; GARTNER & HIATT, 1999; BANDEIRA, 2003).

As células F ou PP, que representam cerca de 1-2% do total, distribuem-se tanto nas ilhotas, na porção posterior da cabeça do pâncreas, quanto no pâncreas exócrino; estimulam a secreção do polipeptídeo pancreático (GUYTON & HALL, 1997; GARTNER & HIATT, 1999; BANDEIRA, 2003).

2.2. Insulina

A descoberta da insulina ocorreu em 1921 quando Banting e Best prepararam um extrato purificado das ilhotas e injetaram no cão diabético, verificando redução dos níveis de glicose no sangue e na urina do animal. Marjorie é provavelmente um dos mais famosos animais na história da experimentação animal (REES & ALCOLADO., 2005).

A insulina é uma proteína pequena, formada por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas, designadas A, com 21 aminoácidos e B, com 30 aminoácidos, ligadas por duas pontes de dissulfeto. A molécula de insulina também contém uma ligação dissulfeto intramolecular entre resíduos de aminoácidos da cadeia A. A insulina humana tem peso molecular de 5.808 (CHAMPE et al., 2006).

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células β das ilhotas pancreáticas. Sua biossíntese envolve dois precursores inativos, a pré-pró-insulina e a pró-insulina, que após clivagens seqüenciais formam o hormônio ativo. No aparelho Golgiano, a pró-insulina é quebrada em duas unidades, originando a insulina e o peptídeo C que é essencial para a organização correta da molécula de insulina. Ela é estocada em grânulos no citosol que, após estímulo apropriado, são liberados por exocitose. A insulina é degradada pela enzima insulinase, presente no fígado e, em menor quantidade, nos rins. A insulina possui uma meia-vida plasmática de aproximadamente seis minutos. Essa curta duração de ação permite alterações rápidas nos níveis circulantes desse hormônio (CHAMPE et al., 2006).

A principal função da insulina é transportar a glicose através da membrana celular. Com isso, ocorre um aumento da intensidade do metabolismo da glicose pelas células e um aumento do armazenamento do glicogênio, tanto no fígado como nas células musculares. A insulina exerce sua ação sobre receptores específicos de membrana. Este hormônio, quando liberado na corrente sanguínea, entra em contato com os receptores insulínicos localizados na membrana celular. O número de receptores de insulina na superfície celular altera-se dependendo das condições metabólicas; além disto, eles possuem uma alta taxa de renovação (LEHNINGER, 1989).

As células β pancreáticas são os mais importantes sensores corporais de glicose. Assim como o fígado, as células β pancreáticas possuem atividade glicoquinase e, portanto, podem fosforilar a glicose em quantidades proporcionais à sua concentração sanguínea real. A ingestão de glicose ou de uma refeição rica em carboidratos leva a um aumento na glicose sanguínea, o que é um sinal para um aumento da secreção de insulina (assim como para diminuição na síntese e liberação de glucagon). A glicose é o estímulo mais importante para a secreção de insulina (BAYES & DOMINICZAK, 2000).

A insulina é um dos mais importantes hormônios que coordenam a utilização de combustíveis pelos tecidos. Seus efeitos metabólicos são anabólicos favorecendo, por exemplo, a síntese de glicogênio, triacilgliceróis e de proteínas (CHAMPE et al., 2006).

O principal estímulo para a liberação de insulina é a glicose sanguínea. No organismo normal, quando os níveis de glicose sanguínea estão baixos, ocorre a liberação de insulina pelas células β pancreáticas, estimulando a captação de nutrientes (glicose, aminoácidos e ácidos graxos), pelas células dos tecidos. No organismo diabético, devido à ausência ou distúrbio na ação e/ou secreção da insulina, os nutrientes não são devidamente captados pelas células, e a sensação de fome é constante nestes indivíduos, o que leva a um aumento na ingestão de alimentos (polifagia). Devido ao baixo nível ou ausência da secreção de insulina, mediante estímulo alimentar, um excesso de nutrientes se acumula na circulação sanguínea. Os rins, que normalmente reabsorveriam a glicose útil, eliminam anormalmente o excesso de glicose sanguínea na urina (glicosúria), aumentando assim, a quantidade de urina a ser excretada (poliúria). Esta perda de grande quantidade de água e glicose estimula um aumento na ingestão de líquidos pelo organismo (polidipsia) (GUYTON & HALL, 1997).

3. Diabetes mellitus

O termo *Diabetes mellitus* aplica-se a um grupo de distúrbios metabólicos, de etiologia múltipla, que se caracterizam bioquimicamente pela hiperglicemia crônica em jejum, decorrente de defeito na secreção e/ou ação da insulina. A deficiência na ação da insulina, base comum do diabete, causa anormalidades características no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos (ADA, 2005) e, clinicamente, pelo desenvolvimento, a longo prazo, de complicações microvasculares (microangiopatia diabética) (KUZUYA et al., 2002). O diabete afeta 9,7% da população mundial e, só no Brasil, cerca de 5 milhões de pessoas. Essa doença é progressiva, silenciosa e atinge vários órgãos (CALDERON et al., 1999). De cada 100 pessoas pelo menos 6 ou 7 têm a doença. No Brasil, estima-se que 5,6% da população seja diabética, sendo que quase a metade não o sabe. Das pessoas próximas aos 65 anos 17% são diabéticas e essa percentagem se eleva a 26% naquelas em torno de 85 anos, constituindo-se um dos grandes desafios de saúde pública nos países em pleno desenvolvimento sócio-econômico (VIEIRA, 2006).

3.1. Classificação

A maioria dos quadros de diabete diagnosticados se enquadra em duas principais categorias. A principal diferença está no tipo de instalação e as características da doença:

- Diabetes mellitus tipo 1:

Diabete tipo 1 (5-10%), ocorre com mais freqüência em crianças ou adolescentes, caracterizado pela ausência de insulina, devido à destruição autoimune das células β pancreáticas, sendo que os sintomas apresentados pelos pacientes/animais, em geral, são mais abruptos (ADA, 2005).

- Diabetes mellitus tipo 2:

Diabete tipo 2 (90-95%), em que o fator hereditário e excesso de peso influenciam no seu aparecimento, no qual uma resistência à ação da insulina ou secreção inadequada de insulina pelas célula β pancreáticas, conjunta ou isoladamente são os responsáveis pelo aparecimento da doença (ADA, 2005).

- Diabete gestacional:

Diabete gestacional aparece quando, durante a gravidez, a mulher não-diabética produz insulina em pouca quantidade para ela e seu bebê. Ao final da gestação, tudo volta ao normal, mas este pode ser um fator de risco para se desenvolver futuramente o diabete tipo 2 (ADA, 2005).

3.2. Binômio diabete e gravidez – clínico e experimental

O diabete reveste-se de grande importância por ser intercorrência comum na gravidez e por apresentar riscos maternos potencialmente letais, como cetoacidose diabética, risco aumentado de infecções, piora das complicações diabéticas previamente existentes e um maior risco de pré-eclâmpsia, além de causar alterações no fluxo uterino-placentário (ERIKSSON & JANSSON, 1984) e nas trocas materno-fetais (ERIKSSON & JANSSON, 1984; GEWOLB et al., 1986; CALDERON et al., 1991, 1992, 1999), acarretando conseqüências desfavoráveis para o concepto, tais como elevada incidência de morte fetal, distúrbios metabólicos, parto prematuro e malformações congênitas (SAVION et al., 2004; ADA, 2005).

Paralelamente, estudos epidemiológicos e em animais experimentais têm demonstrado que distúrbios no meio intrauterino durante a gestação, tal como ocorre no diabete, estão relacionados ao aparecimento de desordens metabólicas na prole na vida adulta (HOLEMANS et al., 1999), sugerindo que durante o desenvolvimento embrionário ocorra uma programação fetal de possíveis doenças a se desenvolverem na via adulta (LESAGE et al., 2004).

Modelos animais de diabete e prenhez têm sido utilizados para caracterizar o desenvolvimento e função da prole, decorrente de efeitos específicos da exposição ao meio intrauterino metabólico anormal, independente da herança genética (BOLOKER et al., 2002).

O diabete tem sido associado a problemas reprodutivos em ambos os sexos. As complicações reprodutivas decorrentes do diabete têm sido largamente investigadas em mulheres jovens, entretanto, poucos estudos mostram a influência desta patologia ao longo do desenvolvimento reprodutivo feminino, quando expostos ao meio intrauterino diabético.

Estudos sugerem que a insulina exerce um papel importante na regulação do eixo hipotálamo-hipófise e função gonadal. Alteração no metabolismo de carboidratos, tal como

ocorre no diabetes, parece estar relacionada com distúrbios na função do sistema reprodutivo de animais de laboratório, por interferir no eixo hipotalâmico-hipofisário-gônadal (BACCETTI et al., 2002). Ratos machos com diabetes induzido quimicamente por streptozotocin, apresentaram diminuição na secreção de gonadotrofinas devido à liberação inadequada do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou por redução na resposta normal da hipófise à estimulação do GnRH (JHONSON & SIDMAN, 1979).

De maneira geral, os mecanismos precisos pelos quais o diabetes provoca problemas reprodutivos e de fertilidade no homem e em animais de laboratório não estão bem esclarecidos.

3.2.1. Indução experimental do diabetes

O diabetes experimental é estudado em diversos modelos experimentais (REES & ALCOLADO, 2005). Desde a década de 40, vêm sendo estudados métodos para indução do diabetes experimental, dentre eles a pancreatectomia parcial ou total (GALLO, 1941), o uso de hormônios antiinsulínicos, a exposição à hidrocortisona ou ACTH, lesões no sistema nervoso central (HETHERINGTON & RANSON, 1940) e o uso de agentes químicos β -citotóxicos como a aloxana e o streptozotocin (DUNN et al., 1943; RAKIETEN et al., 1963).

Atualmente, a mais utilizada é o streptozotocin, eficiente para a indução de um estado diabetogênico crônico. É droga citotóxica para células β pancreáticas em diversos animais experimentais (PITKIN & VAN ORDEN, 1974; BOLZÁN & BIANCHI, 2002), mimetizando o quadro clínico do *Diabetes mellitus* tipo 1 no homem.

Calderon et al. (1992) padronizaram o modelo do binômio diabetes e prenhez em ratas no Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp) e demonstraram que ratas com diabetes induzido por droga β citotóxica, streptozotocin, apresentaram diferentes repercussões placentárias dependentes do nível de hiperglicemia. A hiperglicemia crônica no meio intrauterino leva ao esgotamento das células β pancreáticas, à menor produção de insulina e à restrição no desenvolvimento do concepto (ERIKSSON et al., 1980; VERHAEGHE et al., 1989), além de alterações no fluxo uterino-placentário (ERIKSSON & JANSSON, 1984) e nas trocas

materno-fetais (GEWOLB et al., 1983; ERIKSSON & JANSSON, 1984; GEWOLB et al., 1986; CALDERON et al., 1991, 1992, 1999).

Streptozotocin que é uma nitrosamina isolada do *Streptomyces achromogenes* possui atividade antibiótica e anti-neoplásica (BÓLZAN & BIANCHI, 2002). Sua estrutura molecular foi descrita por Herr et al. (1967), possuindo a seguinte fórmula molecular: $C_8H_{15}N_3O_7$. Ela é utilizada para se induzir o diabetes crônico em roedores, pelo seu efeito tóxico direto sobre as células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001; REES & ALCOLADO, 2005) de maneira dose-dependente (HOLEMANS et al., 2003b). As células β são mais sensíveis a streptozotocin do que outros tipos celulares do organismo, sendo por este motivo que a droga é utilizada para causar o diabetes em roedores e é interessante notar que, ao contrário dos roedores, as células β humana são extremamente resistentes aos efeitos diabetogênicos do streptozotocin (YANG & WRIGHT, 2002). Quando realizados em ratas prenhes, ajudam na compreensão dos efeitos do diabetes, durante a gestação, sobre o desenvolvimento da prole (CALUWAERTS et al., 2003).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como o streptozotocin causa danos nas células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001; BÓLZAN & BIANCHI, 2002). O primeiro sugere que o streptozotocin é um forte agente alquilante, causando alquilação do DNA por $\cdot CH_3$ ou CH_3^+ (BÓLZAN & BIANCHI, 2002). O segundo sugere que a geração de ERMO seria a responsável pela toxicidade do streptozotocin no efeito diabetogênico (WEST et al., 2000; DAMASCENO et al., 2002). Streptozotocin tem uma meia-vida de aproximadamente 24 horas e, usualmente nos protocolos experimentais que utilizam ratas prenhes em seus estudos, para verificar os efeitos do diabetes sobre a prole, o acasalamento dos animais ocorre cerca de uma a duas semanas após o tratamento com a droga. Assim, um efeito direto do streptozotocin sobre o embrião é considerado virtualmente ausente (ZHAO & REECE, 2005).

Streptozotocin gera monóxido de nitrogênio no organismo, destruindo as células β . O tratamento com streptozotocin esgota os níveis de NADP intracelular, inibe a síntese de pró-insulina e induz o diabetes. Além disso, streptozotocin, geralmente, leva ao predomínio oxidativo nos tecidos, que ativa ERMO (O_2^- , H_2O_2 e OH) e aumenta a peroxidação lipídica. O diabetes induzido por essa substância, desenvolve, portanto, estresse oxidativo, responsável pelas lesões secundárias, ou seja, lesões de DNA, proteínas e lipídios. O nível

elevado de glicose sangüínea é a principal causa do estresse oxidativo no diabetes experimental (MATKOVICS et al., 1997).

Comparando o efeito citotóxico efetivo para as células β pancreáticas, entre streptozotocin e aloxana, há especificidade consideravelmente maior dos efeitos da streptozotocin sobre as células β pancreáticas. Contudo, a aloxana em quase todas as espécies exibe uma margem de segurança extremamente limitada entre a dose diabetogênica e as doses, geralmente, tóxicas e letais (JUNOD et al., 1967). O tratamento com streptozotocin esgota os níveis de NADP intracelular, inibe a síntese da pró-insulina e induz o diabetes (LIMA, 2001).

3.2.2. Repercussões maternas e fetais

O crescimento e o desenvolvimento fetais são determinados, primariamente, tanto pelo padrão genético do feto, quanto pela sua capacidade em produzir seus próprios fatores de crescimento, os quais influenciarão o crescimento e a diferenciação (VAN ASSCHE et al., 2001). Entretanto, a regulação gênica do crescimento fetal é influenciada por diferentes fatores externos, os quais podem exercer efeitos inibitórios ou estimulatórios. Além disso, como o embrião dos mamíferos cresce e se desenvolve dentro do útero materno, o crescimento fetal é dependente do *status* nutricional materno e da capacidade da placenta em transferir adequadamente os nutrientes da mãe para o feto (HOLEMANS et al., 2003a, b).

Assim, mecanismos homeostáticos se estabelecem no sistema mãe-placenta-feto, de maneira a garantir um equilíbrio na interação entre os diferentes fatores que regulam e influenciam o crescimento, o desenvolvimento e suprimento nutricional, para um desenvolvimento saudável do feto. Distúrbios nestes mecanismos decorrentes do desenvolvimento de um ambiente intrauterino anormal durante a gestação, estão associados com o aparecimento de anormalidades no crescimento fetal (HOLEMANS et al., 2003b).

Interessante notar que alguns modelos de diabetes e prenhez indicam que a prole que se desenvolve em um meio intrauterino hiperglicêmico têm aumentadas as chances de

desenvolver diabetes tipo 2 na vida adulta (BOLOKER et al., 2002), devido a um prejuízo, a longo prazo, na secreção e ação da insulina no organismo.

Al Ghafli et al. (2004) relataram em seu trabalho um aumento nas reabsorções embrionárias e morte fetal na prole de ratas em que o diabetes foi induzido quimicamente.

A embriopatia diabética (defeitos ao nascimento e abortos espontâneos), resulta de um ambiente intrauterino metabolicamente anormal (BUCHANAN & KITZMILLER, 1994), embora os mecanismos precisos ainda não estejam bem esclarecidos.

Trabalhos na literatura demonstram que ocorre um aumento na produção de radicais livres em resposta ao distúrbio metabólico decorrente do diabetes, sugerindo que o estresse oxidativo exerce forte influência nas complicações reprodutivas materna e patogênese da embriopatia diabética (ERIKSSON & BORG, 1991; DAMASCENO et al., 2002). Diversos autores têm demonstrado que a suplementação de ratas diabéticas, durante a prenhez, com antioxidantes, tais como vitamina C, vitamina E, ácido fólico, diminuem a incidência de malformações fetais e reabsorções embrionárias, evidenciando a função normal dos antioxidantes no processo de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento embrionário (AL GHAFI et al., 2004; WENTZEL & ERIKSSON, 2005).

A teratogenicidade do diabetes tem sido investigada em diversos estudos experimentais (ERIKSSON et al., 2003; AL GHAFI et al., 2004; SAVION et al., 2004; GARESKOG et al., 2006). Os efeitos deletérios da hiperglicemia materna sobre a gestação, decorrente do diabetes, tanto em humanos como em animais, inclui abortos espontâneos, restrição no crescimento, aumento da incidência de malformações congênitas, principalmente defeitos no tubo neural (KALTER, 1996; SAVION et al., 2004).

Sun et al. (2005), analisando embriões de ratas diabéticas nos 9,5 e 11,5 dias gestacionais, demonstraram uma associação entre apoptoses inadequadas e malformações do sistema nervoso. A apoptose (morte celular programada) é comum durante o desenvolvimento de vários órgãos e tecidos dos mamíferos, ocorrendo precocemente no embrião pós-implantação, em regiões específicas, principalmente áreas cardiogênicas e cérebro primitivo. Nos embriões de ratas diabéticas, o processo de apoptose estaria anormalmente aumentado nas células neuroepiteliais do sistema nervoso primitivo, acarretando malformações e morte fetal. Apoptose aumentada nos embriões pré-implantação, de ratas diabéticas, também tem sido associada ao fracasso gestacional.

Reece et al.(1998), demonstraram que as malformações em animais experimentais estão relacionadas com a intensidade da hiperglicemia: 20% das razões de malformações foram observadas quando os níveis de glicemia foram aproximadamente duas vezes (300mg/dl) maiores do que os valores considerados normais (150mg/dl); 50 % para níveis de glicemia de 600mg/dl e 100% para valores de glicemia 6 vezes maiores do que no controle (950mg/dl). Entretanto diversos autores têm demonstrado que a suplementação de ratas diabéticas, durante a prenhez, com antioxidantes, tais como vitamina C, vitamina E, ácido fólico, diminuem a incidência de malformações fetais e reabsorções embrionárias, evidenciando a função normal dos antioxidantes no processo de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento embrionário (AL GHAFI et al., 2004; WENTZEL & ERIKSSON, 2005).

As mulheres com diabetes que engravidam apresentam uma probabilidade maior de ter bebê com defeitos congênitos que as gestantes sem a doença ou algumas mulheres que desenvolvem diabetes durante a gestação. A inter-relação entre diabetes materno e malformações fetais tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. A etiologia é multifatorial e ainda pouco esclarecida (HOLLINGSWORTH, 1992; REECE & COUSTAN, 1995; REECE et al., 2004).

A hiperglicemia crônica no meio intrauterino leva ao esgotamento das células β pancreáticas, à menor produção de insulina e ao retardo no desenvolvimento do concepto (ERIKSSON et al., 1980; VERHAEGHE et al., 1989), além de alterações no fluxo uterino-placentário (ERIKSSON & JANSSON, 1984) e nas trocas materno-fetais (REECE et al., 2004).

A glicose materna serve como substrato energético para o desenvolvimento fetal e a insulina do feto como fator de crescimento. A placenta tem capacidade de garantir trocas materno-fetais, promovendo um ambiente intrauterino adequado às exigências do feto (CALDERON et al., 1992). A quantidade exagerada de glicose na circulação materna, caracterizada como estado diabético, ocasiona efeitos deletérios na formação, no desenvolvimento da placenta (DAMASCENO et al., 2006) e, conseqüentemente, no crescimento e oxigenação fetal (TARICCO et al., 2003).

Muitos trabalhos demonstraram que a hiperglicemia causa dano tecidual, porém o mecanismo fisiopatológico pelo qual isto ocorre não está totalmente definido. Existem evidências sobre a relação entre o excesso de espécies reativas derivadas do metabolismo

do oxigênio (ERMO), caracterizando estresse oxidativo e complicações diabéticas. Em algumas situações patológicas, como no diabetes, o estresse oxidativo promove queda no nível antioxidante, afetando todos os tipos de moléculas biológicas (KRINSKY, 1992; GRACE, 1994; DAMASCENO et al., 2002). O estresse oxidativo está presente no diabetes devido à alta produção de ERMO ou à deficiência do sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático (GRIESMACHER et al., 1995; DAMASCENO et al., 2002; PEUCHANT et al., 2004).

O estudo detalhado da interação dos inúmeros fatores envolvidos na síndrome diabética é muito complicado quando investigado na espécie humana. Desta forma, modelos experimentais foram desenvolvidos com a expectativa de que estudos em animais diabéticos levem ao entendimento mais completo de sua etiologia, patogenicidade e tratamento, visando melhor aplicação clínica (CALDERON et al., 1992).

Os defeitos congênitos mais comuns identificados em estudos com streptozotocin mostram que ocorrem efeitos sobre o cérebro, a medula espinhal, o coração e o trato gastrointestinal. Essa descoberta, porém, não significa que todas as mulheres com diabetes devem temer pelos bebês que esperam, pois há maneiras de as pacientes diabéticas reduzirem o risco de ter um filho com defeitos congênitos. Estudos anteriores mostraram que quanto melhor o controle glicêmico dessas mulheres, menor é a probabilidade de seus bebês apresentarem defeitos ao nascer (SAVION et al., 2004).

A regulação gênica do crescimento fetal é influenciada por diferentes fatores externos, os quais podem exercer efeitos inibitórios ou estimulatórios. Além disso, como o embrião dos mamíferos cresce e se desenvolve dentro do útero materno, o crescimento fetal é dependente do *status* nutricional materno e da capacidade da placenta em transferir adequadamente os nutrientes da mãe para o feto (HOLEMANS et al., 2003b).

Holemans et al. (1999) observaram em estudos experimentais com ratos que a prole de ratas diabéticas quando amamentadas por uma rata normoglicêmica (cross-fostering), apresentou uma curva de crescimento semelhante à da prole do grupo controle. Ao contrário, quando a prole de ratas normoglicêmicas, foi amamentada por ratas diabéticas, houve uma tendência à diminuição do peso corporal no período perinatal e vida adulta, comparado à prole controle, por um mecanismo de “imprinting” durante o período de lactação, sugerindo que o período perinatal exerce uma importante influência no ganho de

peso corporal da prole ao longo da vida. Estes mesmos achados não se confirmaram em modelos de restrição calórica, nos quais o período da prenhez é muito mais importante do que a lactação para se determinar o ganho de peso corporal.

Nos roedores, assim como em humanos, a glicose é o principal substrato energético para o desenvolvimento fetal, sendo completamente liberada da circulação materna. O principal hormônio para o crescimento fetal é a insulina produzida e secretada pelas ilhotas pancreáticas fetais. Ao fim da gestação, o feto já é capaz de regular autonomamente sua própria homeostasia da glicose (AERTS & VAN ASSCHE, 2003). Assim, a insulina fetal exerce duas principais funções: estimula o crescimento fetal e faz o controle da glicemia.

3.2.3. Repercussões do diabetes materno na prole feminina de ratas

De acordo com o grau de hiperglicemia, o diabetes materno experimental pode ser classificado em: diabetes moderado e diabetes grave. Em animais experimentais, o quadro clínico típico do diabetes moderado (CALDERON et al., 1999; LÓPEZ-SOLDADO & HERRERA, 2003), está caracterizado por um aumento na glicemia materna (entre 120-200 mg/dL) e no transporte de glicose e outros nutrientes através da placenta, da mãe para o feto, resultando principalmente em macrosomia (caracterizada por um alargamento da circunferência torácica e abdominal em relação a circunferência da cabeça) (VAN ASSCHE et al., 2001). Entretanto, a hiperglicemia crônica no meio intrauterino decorrente do diabetes grave, caracterizado em estudos experimentais por glicemia superior a 200mg/dL (CALDERON et al., 1992; LÓPEZ-SOLDADO & HERRERA, 2003), está associado à complicações maternas tais como reduzida função renal (VAN ASSCHE et al., 2001), deficiência no transporte de nutrientes para a unidade fetoplacentária e prejuízo do fluxo sanguíneo útero placentário (HOLEMANS et al., 2003b), ocasionando restrição de crescimento intrauterino do feto, caracterizado pelo baixo peso ao nascimento quando comparado a prole de mães normoglicêmicas (VAN ASSCHE et al., 2001; HOLEMANS et al., 2003a,b).

O diabetes durante a gestação pode resultar em prejuízo no desenvolvimento e/ou crescimento fetal. O crescimento e o desenvolvimento fetal é determinado primariamente tanto pelo padrão genético do feto, quanto pela sua capacidade em produzir seus próprios fatores de crescimento, os quais influenciarão o crescimento e a diferenciação (VAN

ASSCHE et al., 2001). Entretanto, a regulação gênica do crescimento fetal é influenciada por diferentes fatores externos, os quais podem exercer efeitos inibitórios ou estimulatórios. Além disso, como o embrião dos mamíferos cresce e se desenvolve dentro do útero materno, o crescimento fetal é dependente do *status* nutricional materno e da capacidade da placenta em transferir adequadamente os nutrientes da mãe para o feto (HOLEMANS et al., 2003a,b). Assim, mecanismos homeostáticos se estabelecem no sistema mãe-placenta-feto, de maneira a garantir um equilíbrio na interação entre os diferentes fatores que regulam e influenciam o crescimento, o desenvolvimento e suprimento nutricional, para um desenvolvimento saudável do embrião. Distúrbios nestes mecanismos decorrentes de um meio intrauterino anormal durante a gestação, estão associados com o aparecimento de anormalidades no crescimento fetal (HOLEMANS et al., 2003b), caracterizado por restrição no crescimento intrauterino (microssomia) ou um super crescimento (macrossomia).

Em humanos, macrossomia é principalmente reportado em pacientes com diabetes gestacional, devido a um aumento no transporte de glicose e outros nutrientes da mãe para o feto. Entretanto, no diabete materno grave, a suplementação de nutrientes da mãe para o feto está prejudicada, levando a restrição no crescimento intrauterino (VAN ASSCHE et al., 2001).

López-Soldado & Herrera (2003) verificaram que diferentes doses da droga, administradas no primeiro dia da prenhez, resultam em diferentes graus da doença, caracterizando principalmente dois subgrupos: diabete moderado (animais com níveis de glicose plasmática ao redor de 200mg/dl) e o diabete grave (animais com níveis de glicose plasmática ao redor de 400mg/dl), concluindo que o estado de diabete moderado nos animais mimetiza o quadro de diabete gestacional humano, enquanto que o diabete grave é mais similar aos quadros clínicos do diabete não controlado. Estes dois modelos experimentais podem ser utilizados para o estudo das condições patofisiológicas e conseqüências materno-fetal, sob diferentes condições ou estágios da doença.

O diabete materno durante a prenhez induz a alterações e adaptações na atividade do pâncreas fetal, em resposta ao aumento do suprimento de glicose da mãe para o feto (HOLEMANS et al., 2003b). A hiperglicemia crônica no meio intrauterino em ratas prenhes induz a hiperglicemia e hipoinsulinemia na prole logo ao nascimento, além de restrição no crescimento intrauterino (VAN ASSCHE et al., 2001). O peso do pâncreas

fetal está diminuído embora a porcentagem de tecido endócrino esteja aumentada (AERST & VAN ASSCHE, 1977).

Alguns autores relatam que logo após o nascimento, normalmente ocorre uma queda brusca da glicemia do recém-nascido humano, principalmente nas duas primeiras horas após o nascimento, sendo uma importante causa de mortalidade perinatal. A hipoglicemia seria consequência de uma hipertrofia das ilhotas pancreáticas devido principalmente a um aumento no número de célula β pancreáticas, em resposta à hiperglicemia materna (ARDUINO & ALBANO, 1980).

A maneira como a hiperglicemia materna causa distúrbios no desenvolvimento e função da prole ainda permanece por ser elucidada.

O processo de maturação sexual é um evento fisiológico complexo, coordenado por fatores genéticos e ambientais, e os mecanismos precisos envolvidos são desconhecidos. É bem conhecida a função do eixo hipotálamo-hipófise-gônada no processo de maturação sexual e função reprodutiva na mulher e em várias espécies de animais. Inúmeros são os locais neste sistema que podem sofrer interferência e modulação (HOLEMANS, et al., 1999).

A literatura carece de estudos mais detalhados sobre o início da puberdade em ratos. A precisa definição da puberdade necessitaria de estudos mostrando as alterações endócrinas relacionadas às concentrações do hormônio luteinizante (LH) durante a vida fetal, perinatal e lactação dos animais (HOLEMANS, et al., 1999).

Os mecanismos que governam o início da puberdade no rato são melhor compreendidos nas fêmeas do que nos machos. Nos machos, as inter-relações entre o eixo hipotálamo-hipófise e as gônadas já são funcionantes desde antes do nascimento, sendo que, durante as primeiras semanas de vida pós-natal, os vários processos iniciam sua sincronização (OJEDA & URBANSKI, 1994).

O desenvolvimento pós-natal da rata pode ser dividido em 4 fases: período neonatal, que se inicia ao nascimento e termina no 7º dia pós-natal; período infantil, que vai do dia 8 até 21; período juvenil, que se encerra entre os dias 30 e 32, e período peri-puberal, com uma duração variável, que culmina com a ocorrência da primeira ovulação, em torno do 38º dia (OJEDA & URBANSKI, 1994).

Alguns autores têm hipotetizado que o peso corporal exerceria um importante papel na regulação, com relação ao sistema nervoso central, no controle da puberdade. A relação entre o peso corporal (quantidade de gordura) durante o desenvolvimento intrauterino, ao nascimento e período perinatal, e início da puberdade em ratos, tem sido pouco estudado (ENGELBREGT et al., 2000) sendo que os reais mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados.

Engelbregt et al. (2000) observaram que ratos nascidos com restrição de crescimento intrauterino tiveram um atraso no início da puberdade e uma relação direta com o peso corporal não foi observada. O período perinatal parece ser um período crítico no processo de maturação sexual, por mecanismos ainda desconhecidos, independente do peso corporal. Engelbregt et al. (2001), utilizando o modelo de restrição de crescimento intrauterino também relataram que o início da puberdade independe da relação entre a porcentagem de gordura corporal e concentrações de leptina plasmáticas nos animais.

Trabalhos têm demonstrado uma relação entre a restrição do crescimento intrauterino devido a um desequilíbrio na sua homeostasia e o desenvolvimento puberal de machos e fêmeas, indicando mudanças no início e progressão da puberdade (ENGELBREGT et al., 2000; ZAMBRANO et al., 2005). A influência da relação entre os mecanismos que controlam o início da puberdade e restrição do crescimento intrauterino não está totalmente compreendida.

Estudos recentes demonstram que o *status* nutricional do organismo é um importante fator que interfere nas funções reprodutivas e início da puberdade (ENGELBREGT et al., 2000; LEONHARDT, et al., 2003; ZAMBRANO et al., 2005). A leptina, um hormônio produzido pelo gene *obesity* expressado pelas células adiposas (adipócitos), está envolvido na regulação da adiposidade em mamíferos e pode atuar como um sinalizador endócrino interligando o eixo reprodutivo (hipotálamo-hipófise-gônada) com o status nutricional do organismo (LEONHARDT, et al., 2003). A leptina estimula a secreção de LH e FSH pela hipófise nos animais jovens e adultos de maneira dose-dependente (SINZATO et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que distúrbios no meio intrauterino, durante a gestação, podem provocar anormalidades metabólicas na prole na vida adulta, levando ao

desenvolvimento de doenças tais como doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes tipo 2 (BOLOKER et al, 2002; NATHANIELSZ & THORNBURG, 2003; ZAMBRANO et al., 2005), sugerindo que durante o desenvolvimento embrionário ocorre uma programação das funções de diversos sistemas e órgãos do organismo. Nos últimos anos, tem sido muito discutida a influência dos fatores externos na programação das funções reprodutivas de ambos os sexos (RHIND et al., 2001; ZAMBRANO et al., 2005). Por isso, mais estudos são necessários para a elucidação dos mecanismos exatos que interferem na programação, durante o desenvolvimento embrionário, das funções reprodutivas e fertilidade no adulto.

OBJETIVOS

Geral: Avaliar os desenvolvimentos físico e sexual e a função reprodutiva, na puberdade e idade adulta, de ratas que se desenvolveram em condições hiperglicêmicas *in utero* e lactação.

Específicos: Avaliar, na prole de ratas diabéticas o desenvolvimento físico, na pré-puberdade, através dos seguintes parâmetros: peso corpóreo, idade de abertura de olhos, do aparecimento de pêlos, do descolamento das orelhas e do aparecimento dos incisivos. Investigar o desenvolvimento sexual pela determinação das idades de abertura vaginal e primeiro estro (indicativos da instalação da puberdade) e, na idade adulta, peso e histologia dos ovários e útero, duração do ciclo estral, comportamento sexual e fertilidade após acasalamentos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.**, 2005. v. 28, n. 1, p. 537-542.
- AERTS, L.; VAN ASSCHE, F.A. Intra-uterine transmission of disease. **Placenta**, 2003. v. 24, p. 905-911.
- AERTS, L.; VAN ASSCHE, F.A. Rat fetal endocrine pancreas in experimental diabetes. **J. Endocrinol.**, 1977. v. 73, p. 339-346.
- AL GHAFI, M.H.M. et al. Effects of α -lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat fetuses. **Mol. Cell. Bioch.**, 2004. v. 261, p. 123-135.
- ANDERSON, M.L. et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. 1ª ed. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2004, p. 82-119.
- ARDUINO, F.; ALBANO, N. A gestante diabética e seu recém-nascido. In: ARDUINO, F. (Eds). **Diabetes mellitus e suas complicações**. Atheneo: Rio de Janeiro, 1980. p. 177-179.
- BACCETTI, B. et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reprod**, 2002. v. 17, n. 10, p. 2673-2677.
- BANDEIRA, F. **Endocrinologia e diabetes**. Rio de Janeiro: MEDS: Editora Medica Cientifica Ltda, 2003. p. 793-799.
- BARKER, D.J.P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart diseases in England and Wales. **Lancet**, 1968. v. 1, p. 1077-1081.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M.H. Homsotasia da glucose e metabolismo energético. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole LTDA, 2000. p. 243-266.
- BOLOKER, J. et al. Gestacional diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. **Diabetes**, 2002. v. 51, p. 1499-1506.
- BOLZÁN, A.D.; BIANCHI, M.S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat Res**, 2002. p. 512:121.
- BUCHANAN, T.A.; KITZMILLER, J.L. Metabolic interactions of diabetes and pregnancy. **Annu. Rev. Med.**, 1994. v. 45, p. 245-260.
- CALDERON, I.M.P et al. Diabete e gravidez experimental em ratas I. Indução do diabete, obtenção e evolução da prenhez. **Acta. Cir. Bras.**, 1992. v. 7, n. 1.

- CALDERON, I.M.P. et al. Estudo longitudinal, bioquímico e histoquímico de placentas de ratas diabética - relação com a macrosomia e o retardo de crescimento intra-uterino. **Rev. Bras. Ginec. Obst.**, 1999. v. 2, p. 91-98.
- CALDERON, I.M.P. et al. **Diabete e gravidez experimental em ratas II – Repercussões fetais e placentárias**. In: Anais do Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia. Brasília (DF): Febrasgo; 1991:PtI290.
- CALUWAERTS, S. et al., Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus? **Journal of Society for Gynecologic Investigation**, 2003. v. 10, p. 216-221.
- CHAMPE, P.C. et al. Efeitos metabólico da insulina e do glucagons. **Bioquímica ilustrada**. São Paulo: Artmed S.A., 2006. p. 305-316.
- DAMASCENO, D.C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnancy rats. **Animal. Reprod. Sci.**, 2002. v. 72, p. 235-44.
- DAMASCENO, D.C. et al. Study of placental morphometry and maternal fetal DNA damages in diabetic rats. **Placenta**, 2006. v. 27, p. A51.
- DUNN, J.S. et al. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, 1943, v. 1, p. 484-487.
- ENGELBREGT, M.J. et al. Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats alter intrauterine growth retardation and alter early postnatal food restriction. **Pediatr. Res.**, 2001. v. 50, p. 474-478.
- ENGELBREGT, M.J. et al. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. **Pediatr. Res.**, 2000. v. 48, n. 6, p. 803-807.
- ERIKSSON, U. et al. Diabetes in pregnancy: effects on the foetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentration and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin. **Acta Endocrinol**, 1980. v. 94, p. 354-364.
- ERIKSSON, U.J.; BORG, L.A.H. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. **Diabetologia**, 1991. v. 34, p. 325-331.
- ERIKSSON, U.J. et al. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers – animal and human studies. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, 2003. v. 4, p. 79-93.

- ERIKSSON, U.J.; JANSSON, L. Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal development in the rat. **Pediatr. Res.**, 1984. v. 18, p. 735-38.
- GALLO, F.N. Acción del extracto de “pezuña de vaca” (*Bauhinia candicans* Benth) sobre la glucemia normal y la diabetes experimental en el perro. **Rev. Soc. Argent. Biol.** 1941; v. 17, p.128-137.
- GARESKOG, M., et al., Maternal diabetes *in vivo* and high glucose concentration *in vitro* increases apoptosis in rat embryos. **Reprod. Toxicol.**, 2006.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histología**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. p. 320-336.
- GEWOLB, I.H et al. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. **Diabetes**, 1986. v. 35, p. 1264-71.
- GEWOLB, I.H. et al. Placental growth and glucagen metabolism in streptozotocin diabetic rats. **Pediatr. Res.**, 1983. v. 17, p. 587-591.
- GRACE, P.A., Ischemia-reperfusion injury. **The British Journal of Oral Surgery**. 1994. v. 81, p. 637-647.
- GRIESMACHER, A., et al., Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine**. 1995. n. 98, v. 5, p. 469-475.
- GUYTON, A.C.; HALL, J. Insulina, glucagon e diabetes mellitus. In: GUYTON, A.C.; HALL, J. (Eds). **Tratado de fisiología médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 883-894.
- HERR, R.R., et al., The structure of streptozotocin. **Journal of the American Chemical Society**, 1967. p. 89, 18.
- HETHERINGTON, A.W.; RANSON, S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.** 1940; v. 78, p. 149-53.
- HOLEMANS, K. et al. Streptozotocin diabetes in the pregnant induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Diabetologia**, 1999. v. 42, p. 81-89.
- HOLEMANS, K. et al. Fetal Growth restriction and consequences for the offspring in animal models. **J. Soc. Gyneco.l Investig.**, 2003a. v. 10, n. 7, p. 392-399.
- HOLEMANS, K., et al., Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. **J. Physiol.** 2003b. v. 574, p. 11-20.

- HOLLINGSWORTH, D.R. **In: Pregnancy, diabetes and birth.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1992. p. 288.
- JHONSON, L.M.; SIDMAN, R.L. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. **Biol Reprod**, 1979. v. 20, p. 552-559.
- JUNOD, A. et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, 1967. v. 126, p. 201-205.
- JUNQUEIRA, L.C.U. Glândulas endócrinas. In: JUNQUEIRA, L.C.U (Eds). **Histologia básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 349-350.
- KALTER, H. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. **Reprod. Toxicol.**, 1996. v. 10, p. 417-38.
- KRALL, L.P. O que é o diabete? In: JOSLIN, E.P. (Eds). **Manual do diabete de Joslin.** 11ª edição. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1983. p. 01-32.
- KRINSK, N.I., Mechanism of action of biological antioxidantes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 1992. v. 200, p. 248-541.
- KUZUYA, T., et al., Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus., Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice.** 2002. v. 55, p. 65-85.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier, 1989. p. 507-528.
- LEONHARDT, M. et al. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin in rat pup at birth and weaning and timing of puberty. **Biol. Reprod.**, 2003. v. 68, p. 390-400.
- LESAGE, J. et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. **J. Endocrinol.**, 2004. v. 181, p. 291-296.
- LIMA, P.H.O. **Avaliação do efeito hipoglicemiante do extrato de *Eugenia jambolana* em ratas diabéticas.** 2001. p. 35. Dissertação (Biólogo) – Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru.
- LÓPEZ-SOLDADO, I., HERRERA, E., Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. **Experimental Diabetes Research.** 2003. n. 4, v. 2, p. 107-118.
- MATKOVICS, B. et al. Oxidative stress in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Acta Physiol Hung* 1997-98; 85: 29-38.

- NATHANIELSZ, P.W.; THORNBURG, K.L. Fetal programming: from gene to function systems na overview. **J Physiol**, 2003. v. 547, p. 3-4.
- OJEDA, S.R.; URBANSKI, H.F. Puberty in the rat. **The physiology of reproduction** Raven Press: New York. 1994. p. 363-409.
- PEUCHANT, E., et al., Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. **Clinical Biochemistry**. 2004. n. 37, v. 4, p. 293-298.
- PITKIN, R.M.; VAN ORDEN, D.E. Fetal effects of maternal streptozotocin-diabete. **Endocrinol.** 1974. p. 1247-1253.
- RAKIETEN, N. et al. Studies in the diabetogenic action of streptozotocin. **Cancer Chemother Rep.**, 1963. v. 29, p. 91-94.
- REECE, E.A.; COUSTAN, D.R. Diabetes mellitus in pregnancy. New York (NY): Churchill Livingstone, 1995.
- REECE, E.A. et al. Diabetes in women: Adolescence, Pregnancy and menopause. New York (NY): Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- REECE, E. A., et al., The role of free radicals and membrane lipids diabetes-induced congenital malformations. **Journal of Society for Gynecologic Investigation**, 1998. v. 5, p. 178-187.
- REES, D.A.; ALCOLADO, J.C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic. Med.** 2005. v. 22, p. 359-370.
- RHIND, S.M. et al. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. **Reproduction**, 2001. v. 122, p. 205-214.
- SAVION, S. et al. Diabetes teratogenicity is accompanied by alterations in macrophages and cell T subpopulations in the uterus and lymphoid organs. **Int. Immunopharmacol.**, 2004. v. 4, p. 1319-1327.
- SINZATO, Y.K. et al. Leptina e seu papel nas funções reprodutivas. **Femina**, Rio de Janeiro, 2005. v. 33, n. 5, p. 339-346.
- SUN, F. et al. Apoptosis and its pathway in early post-implantation embryos of diabetic rats. **Diabetes. Res. Clin. Pract.**, 2005. v. 65, p. 110-118.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, 2001. v. 50, p. 536-546.
- TARICCO, E. et al. Fetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. **Placenta**, 2003. v. 24, p. 343-347.

- VAN ASSCHE, F.A. et al. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. **Br. Med. Bull.**, 2001. v. 60, p. 173-182.
- VERHAEGHE, J. et al. Maternal and fetal endocrine pancreas in the spontaneously diabetic BB rat. **Biol. Neonatal**, 1989. v. 55, p. 298-308.
- VIEIRA, R. <http://www.fundamentosdebioquimica.hpg.ig.com.br/Diabetes.html>. 10/04/2006.
- WALKER, W.F.JR.; HOMBERGER, D.G. **Anatomy & Dissection of the rat**. 3^a ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1997. 122p.
- WENTZEL, P.; ERIKSSON, U.F. O diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E₂ in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. **Birth. Defects. Res.**, 2005. v. 73, p. 506-511.
- WEST, I.C., Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine: a Journal of the British Diabetic Association*. 2000. v. 17, n. 3, p. 171-180.
- YANG, H., WRIGHT, JR., Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. **Endocrinology**, 2002. v. 143, p. 2491-2495.
- ZAMBRANO, E. et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat male reproductive development. **J. Physiol.**, 2005a. v. 563, p. 275-284.
- ZAMBRANO, E. et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **J. Physiol.**, 2006. v. 571, p. 221-230.
- ZAMBRANO, E. et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. **J. Physiol.**, 2005b. v. 566, p. 225-236.
- ZHAO, Z., REECE, E.A., Experimental mechanisms of diabetic embryopathy and strategies for developing therapeutic interventions. **Journal of Society for Gynecologic Investigation**. 2005. v. 12, p. 549-557.

CAPÍTULO

Este trabalho deu origem ao artigo “Desenvolvimento físico, sexual e função reprodutiva da prole feminina de ratas diabéticas” que, após ser versado para o inglês, será submetido para publicação no periódico “Life Sciences”.

**Desenvolvimento Físico, Sexual e Função Reprodutiva da Prole Feminina de Ratas
Diabéticas**

Raquel Spadotto¹, Débora Cristina Damasceno², Antonio Francisco Godinho³, Elaine
Manoela Porto⁴, Juliana Elaine Perobelli¹, Wilma De Grava Kempinas^{1*}

¹ Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³ Centro de Assistência Toxicológica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

***Endereço para correspondência:**

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP

Caixa Postal 510

18618-000, Botucatu, SP, Brasil

Tel: + 55 14 3811 6264 ramal 104; Fax: + 55 14 3811 6264 ramal 120

E-mail: kempinas@ibb.unesp.br.

RESUMO

Diabetes mellitus é uma síndrome caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta da ação da insulina em órgãos-responsivos-alvo, resultando na exposição de todos os tecidos à hiperglicemia crônica.. O objetivo deste trabalho foi avaliar os desenvolvimentos físico e sexual e a função reprodutiva, na puberdade e idade adulta, de ratas que se desenvolveram em condições hiperglicêmicas in utero e lactação. A indução do diabete nas ratas foi realizada através da administração de uma única dose, via intravenosa, de streptozotocin (40mg/kg) antes do acasalamento. Fêmeas Wistar foram acasaladas com machos, no período noturno, e a presença de espermatozóides em lavados vaginais foi considerado dia zero da prenhez. A prole feminina foi avaliada através dos seguintes parâmetros: na pré-puberdade, o desenvolvimento físico (peso corpóreo, idade da abertura de olhos, do aparecimento de pêlos, do descolamento das orelhas e do aparecimento dos incisivos); na puberdade, a idade de abertura vaginal, do primeiro estro e peso e avaliação histológica do útero e ovários; na idade adulta, a duração do ciclo estral, o comportamento sexual e a fertilidade após acasalamentos naturais. O diabete materno provocou, na prole feminina, retardo no desenvolvimento físico, na idade de abertura vaginal e do primeiro estro. Na idade adulta, houve diminuição do peso dos ovários e do número de folículos. Embora o comportamento sexual não tenha se alterado, a performance reprodutiva da prole de ratas diabéticas foi inferior à do grupo controle, tendo ocorrido diminuição do número de fetos. Concluiu-se que a exposição aos meios intrauterino e lactacional hiperglicêmicos provocou retardos no desenvolvimento físico e sexual e prejudicou a função reprodutiva de ratas.

Palavras-chave: Streptozotocin, Diabete, Prenhez, Rata, Desenvolvimento físico, Comportamento sexual, Função reprodutiva feminina

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus, uma doença metabólica complexa (Tang et al., 2003), causada pela falta de produção de insulina pelas células beta (β) das ilhotas pancreáticas ou pelo defeito nos receptores para insulina nas células-alvo, é uma das doenças que mais acomete pessoas no mundo (Hrabák et al., 2006).

O diabete na gravidez é caracterizado por numerosos distúrbios no desenvolvimento e crescimento fetal (Takenaka and Toyoda, 1995), e mulheres grávidas diabéticas são mais susceptíveis a abortos espontâneos do que as grávidas não diabéticas (Reece et al., 2004). Além disso, o diabete é a principal causa de defeitos ao nascimento e mortalidade perinatal (Zhao and Reece, 2005).

Vários estudos epidemiológicos (Dabelea et al., 1998; Cho et al., 2000; Manderson et al., 2002) e estudos experimentais (Canavan and Goldspink, 1988; Robinson et al., 1988; Grill et al., 1991; Thamocharan et al., 2003; Fujisaw et al., 2004) têm demonstrado que as chances de desenvolver intolerância a glicose, obesidade, resistência à insulina e Diabetes mellitus tipo 2 na vida adulta são maiores na prole de mães diabéticas (Aerts and Van Assche, 2006), sugerindo que durante o desenvolvimento embrionário ocorra uma programação fetal de possíveis doenças a se desenvolverem na vida adulta (Lesage et al., 2004) e diferentes modelos experimentais têm sido utilizados para investigar os efeitos da “programação fetal” no desenvolvimento da prole: exposição das mães a uma dieta isocalórica com baixo conteúdo protéico (Zambrano et al., 2005a,b, 2006).

Modelos animais para o estudo dos efeitos da diabete na prenhez têm sido utilizados para caracterizar o desenvolvimento e função da prole, decorrente de efeitos específicos da exposição ao meio intrauterino metabólico anormal, independente da herança genética (Boloker et al, 2002).

O método mais utilizado para a indução do diabetes experimental é a indução química por streptozotocin, provocando em roedores um estado diabetogênico crônico, mimetizando o quadro clínico do Diabetes mellitus tipo 1 no homem (Hrabák et al., 2006). A streptozotocin é uma droga citotóxica para células β pancreáticas em diversos animais experimentais (Pitkin and Van Orden, 1974; Bolzán and Bianchi, 2002), de maneira dose-dependente (Holemans et al., 2003). Possui meia-vida de 24 horas e normalmente é administrada duas semanas antes do acasalamento, pois o efeito direto da streptozotocin no embrião é considerado ausente (Zhao and Reece, 2005).

Alterações no metabolismo de carboidratos, tal como ocorre no diabetes, parecem estar relacionadas com distúrbios na função do sistema reprodutivo de animais de laboratório, por interferir no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Baccetti et al., 2002). Ratas fêmeas, com diabetes induzido quimicamente por streptozotocin, apresentaram diminuição na secreção de gonadotrofinas devido à liberação inadequada de GnRH ou por redução na resposta normal da hipófise à estimulação do GnRH (Jhonson and Sidman, 1979).

De maneira geral, os mecanismos precisos pelos quais o diabetes provoca problemas reprodutivos e de fertilidade na mulher e em animais de laboratório não estão bem esclarecidos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os desenvolvimentos físico e sexual e a função reprodutiva na idade adulta, em ratas que se desenvolveram em condições hiperglicêmicas in utero e durante a lactação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Ratos Wistar, a partir de 30 dias de idade, 30 machos e 72 fêmeas, foram fornecidos pelo Centro Multi-disciplinar para Investigação Biológica da Universidade de

Campinas, CEMIB - UNICAMP. Eles foram adaptados e mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, durante todo o período experimental, onde permaneceram em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15), sob condições controladas de temperatura, mantida entre 22^o e 25^oC, umidade relativa próxima de 55% e luminosidade fotoperíodo de 12 horas (período de luz se iniciando às 7:00), com acesso livre a água e ração para roedores. Quando os animais completaram aproximadamente 90 dias de idade iniciou-se o período experimental. Os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências de Botucatu (protocolo 05/05).

Seqüência experimental para a indução do diabete nas ratas

Streptozotocin (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO), droga escolhida para a indução do diabete, foi administrada, em dose única de 40 mg/Kg de peso, via intravenosa, pela veia caudal, nas ratas a partir de 90 dias de idade, pesando aproximadamente 220g. O período para avaliação do efeito diabetogênico nos animais se estendeu por oito dias. As ratas normoglicêmicas do grupo controle receberam, também por via intravenosa, tampão citrato (0,1M; pH6,5), em volume equivalente à droga diabetogênica, calculada para uma rata do mesmo peso.

A observação de ingestão excessiva de água (polidipsia) e alimentos (hiperfagia), associada à perda ou manutenção do peso, foi interpretada como indícios de hiperglicemia. Também foi parâmetro indicativo de hiperglicemia o aumento no grau de umidade da forração das gaiolas acompanhado de odor acentuado, indicando excesso de diurese dos animais (poliúria).

Acasalamentos naturais

Oito dias após a indução do diabetes nas ratas, foi iniciada a fase de acasalamento, durante o ciclo de escuro, com duração máxima de 15 dias, até a obtenção de, pelo menos, 8 ratas prenhes por grupo experimental. Para o acasalamento, as ratas foram acomodadas, em duplas aleatórias, em gaiolas de polietileno, com cama de maravalha, na presença de um rato macho. Na manhã subsequente, as fêmeas foram retiradas e lavados vaginais foram colhidos com a ponteira de uma pipetador automático contendo 10 μ L de solução fisiológica a 0,9% sendo o líquido introduzido na vagina e em seguida aspirado (Marcondes et al., 2002). O material contido nos 10 μ L de solução fisiológica foi espalhado sobre uma lâmina histológica limpa e previamente identificada com o número do animal. Os lavados vaginais foram analisados com o auxílio de um microscópio óptico e os fatores indicativos de prenhez foram presença de cabeças de espermatozóides e diagnóstico da fase estral, e este foi definido como dia gestacional zero (DG 0). As ratas foram pesadas em dias alternados, do DG 0 até o DG 20, para controle do ganho de peso.

Nas manhãs dos DG 0, 7, 14 e 21 foram colhidas amostras de sangue por punção da parte distal da cauda para a determinação da glicemia materna. Os níveis de glicemia foram monitorados por leitura de hemoglicofita em glicosímetro específico, que expressa o valor em miligrama por decilitro (mg/dl). O limite de normalidade foi de 120 mg/dl. O critério de inclusão de ratas diabéticas foi considerado quando os níveis de glicemia foram superiores a 200 mg/dl, caracterizando um diabetes grave (Damasceno et al., 2002; López-Soldado and Herrera, 2003).

A partir do DG 20, as ratas foram monitoradas quanto ao nascimento dos filhotes. Em seguida, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, procurando-se sempre manter os filhotes do sexo feminino. Ninhadas com número de filhotes inferior a

oito tiveram seus filhotes remanejados para outras ninhadas do mesmo grupo experimental, de tal forma que o número de filhotes amamentados por cada rata fosse de, no mínimo, seis e, no máximo, oito. As ratas que não pariram foram sacrificadas em média cinco dias após a data prevista para o nascimento dos filhotes. Tiveram o útero removido para a verificação de sítios de implantação, contagem de corpos lúteos e presença de reabsorções.

Avaliação da prole feminina após o nascimento

Os recém-nascidos foram avaliados quanto à presença de malformações externas. O desenvolvimento reprodutivo foi avaliado em diferentes idades, em grupos de 5 a 10 ratas, dependendo do parâmetro estudado, sendo um a dois por ninhada, de ratas controle e diabéticas, considerando as seguintes fases do desenvolvimento sexual: pré-puberdade (dia pós-natal 30 - DPN 30), puberdade (DPN 50) e maturidade sexual (DPN 80).

Para evitar rejeição materna (Holemans et al., 1999), o peso corporal e os níveis de glicemia (leitura de hemoglicofita), da prole foram avaliados a partir do DPN 3, e monitorados no DPN 10, 20 e sacrifício.

Avaliação dos sinais físicos externos do desenvolvimento sexual feminino

Foi realizada de acordo com metodologia descrita em Smart and Dobbing (1971). Após o nascimento a prole feminina, foi observada diariamente do DPN 1 ao 20 para avaliação do desenvolvimento físico através dos seguintes parâmetros: peso, idade de abertura de olhos, aparecimento de pêlos, descolamento das orelhas, aparecimento dos incisivos.

Início da puberdade e primeiro estro

Foi determinado, nos filhotes do sexo feminino, o dia médio, por ninhada, em que ocorreu a abertura vaginal, indicativo da instalação da puberdade. As observações se iniciaram a partir do DPN 30.

Para se investigar a idade do primeiro estro, a partir da instalação da puberdade, foram colhidos lavados vaginais de todos os filhotes do sexo feminino. Para tanto, e sempre no mesmo horário, uma ponteira contendo 10 μ L de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) acoplada a um pipetador automático foi introduzida na vagina da ratas, e o líquido transferido e logo depois aspirado (Marcondes et al., 2002). Em seguida, os lavados vaginais foram espalhados sobre lâminas histológicas limpas e previamente identificadas com o número do animal. Os lavados vaginais foram analisados com o auxílio de um microscópio com contraste de fase.

A regularidade do ciclo estral que, na rata, dura em média 4 a 5 dias, foi também estudada através da obtenção de lavados vaginais de todas as ratas a partir dos 60 dias de idade, por um período de 15 dias consecutivos. A classificação da fase do ciclo foi baseada nos parâmetros descritos a seguir (Long and Evans, 1922; Mandl, 1951): proestro: predomínio de células epiteliais e, em menor quantidade à medida que se aproxima o final dessa fase, leucócitos e muco; estro: predomínio de células queratinizadas anucleadas, isoladas ou em grupos e, ausência de leucócitos e muco; metaestro: encontram-se todos os tipos celulares, anteriormente citados, mas com decréscimo do número de células queratinizadas e aumento de muco e dos outros tipos celulares; diestro: encontram-se células epiteliais de vários tipos, muitos leucócitos e muito muco.

Coleta dos órgãos reprodutores

Após a investigação da regularidade do ciclo estral, um grupo de 10 ratas, sendo 5 por grupo experimental, foram sacrificadas no estro, para a coleta dos ovários e útero (com fluido), que foram removidos, pesados em balança de precisão e pré-fixados durante 4 horas na solução fixadora de Alfac (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial). A seguir, os órgãos foram removidos do fixador, aparados e retornaram ao

fixador, até completarem 24 horas de fixação, quando a solução foi substituída por álcool 80°, onde as peças permaneceram até processamento de rotina para inclusão em Paraplast. Após o processamento, foram então seccionados a 5 µm de espessura, corados pela hematoxilina e eosina para posterior avaliação histopatológica e morfométrica.

Nos ovários, foi realizada a contagem de corpos lúteos, assim como a classificação e contagem dos folículos. A classificação foi baseada nos diferentes estágios de desenvolvimento folicular, na morfologia dos folículos e no número de camadas de células da granulosa (Borgeest et al., 2002; Talsness et al., 2005). A classificação folicular foi baseada nos parâmetros de acordo com o descrito abaixo: folículo primordial e primário (contados juntos): apresenta uma única camada de células planas ou cubóides da granulosa; folículo pré-antral: apresenta duas a quatro camadas de células cubóides da granulosa sem presença de espaço antral; folículo antral: apresenta várias camadas de células da granulosa e um espaço antral claramente definido; folículo atrésico: apresenta desorganização das células da granulosa, núcleos picnóticos nas células da granulosa, descolamento da membrana basal e degeneração do oócito.

Comportamento sexual

Os estudos de comportamento sexual foram realizados em 7 ratas por grupo experimental (uma por ninhada), no primeiro estro após os 80 dias de idade, numa sala com ciclo invertido, durante a fase escura do ciclo, com o auxílio de 2 lâmpadas vermelhas de 40 Watts. Os animais foram colocados individualmente em caixa de polipropileno transparente medindo 56x35x31 cm, com tampa móvel de ferro galvanizada, e em seu assoalho, tela quadriculada, que permite perfeita visualização dos animais. Dois observadores colocados em posições diferentes em relação à caixa de observação anotaram simultaneamente o comportamento dos animais em estudo. Essas observações foram

comparadas após cada observação, sendo desprezadas as discordantes. Antes do início da avaliação propriamente dita, um macho sexualmente ativo foi introduzido na referida caixa por 5 minutos, para se adaptar ao novo ambiente. Logo em seguida, foi introduzida na caixa a rata em teste, permitindo-se a realização de dez montas do macho, anotando-se, em cada uma delas, a presença ou não de lordose na fêmea. Defini-se lordose como o ato da fêmea curvar o dorso para baixo, ao mesmo tempo em que a cauda se ergue expondo, assim, a genitália. A partir desses resultados foi calculado o coeficiente de lordose (CL) para cada rata, $CL = \frac{\text{n}^\circ \text{ de lordoses}}{\text{n}^\circ \text{ de montas}} \times 100$

Performance reprodutiva

Após o estudo do comportamento sexual, outras ratas com maturidade sexual foram avaliadas quanto à sua fertilidade. Para tanto, 10 ratas por grupo experimental, uma ou duas por ninhada, foram pareadas com machos comprovadamente férteis, até no máximo 3 ciclos sexuais (3 estros), colocadas em suas caixas (uma fêmea por macho), no início da manhã (sala com ciclo invertido). No final da tarde, foram colhidos os lavados vaginais, conforme descrito anteriormente, sendo que o dia em que se determinou a presença de espermatozóides foi considerado o dia zero de prenhez. As fêmeas esperma-positivo foram mortas na manhã do 20º dia de prenhez, para a coleta do útero e ovários e registro dos números de corpos lúteos e implantes para posterior determinação do potencial de fertilidade (eficiência de implantação): $\frac{\text{implantes}}{\text{corpos lúteos}} \times 100$; taxa de gestação: $\frac{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas prenes}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas inseminadas}} \times 100$; taxa de perdas pré-implantação: $\frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantes}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$; taxa de perdas pós-implantação: $\frac{\text{n}^\circ \text{ de implantes} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantes}} \times 100$; razão sexual: $\frac{\text{n}^\circ \text{ de ratos machos}}{\text{n}^\circ \text{ ratas fêmeas}} \times 100$.

Análise estatística dos resultados

Para a análise das porcentagens entre o número de fêmeas prenhes e que tiveram prenhez a termo e das porcentagens entre o número de fêmeas que tiveram prenhez a termo e que permaneceram com as ninhadas, foi utilizado Teste exato de Fisher. Para a comparação dos demais parâmetros avaliados entre os grupos experimentais foram utilizados, dependendo da natureza da distribuição dos dados, os testes t de Student's ou teste de Mann-Whitney. Os dados foram expressos em média ou mediana \pm EPM respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Resultado da prenhez das ratas com diabete induzida:

Sinais clínicos do diabete como baixo ganho de peso corporal, hiperfagia, polidipsia e poliúria, foram observados no grupo de ratas diabéticas (dados não mostrados). As médias das glicemias nas ratas (dados não mostrado) do grupo diabético, avaliadas nos DG 0, 7, 14 e 20 estiveram ao redor de 400 mg/dl (diabete grave), enquanto que no grupo controle as médias das glicemias foram sempre inferiores ao limite máximo de normalidade (120mg/dl). No grupo de ratas diabéticas, a porcentagem de fêmeas que tiveram prenhez a termo (45,45%), em relação ao número de fêmeas inseminadas (n=55), foi menor quando comparado ao grupo de ratas controle (100%; n=17) e, além disso, apenas 7 (28%) das ratas diabéticas mantiveram suas ninhadas. Foi evidenciado também alto índice de perdas pré e pós-implantação, observado nas ratas diabéticas, submetidas às laparotomias em média 5 dias após a data prevista para o nascimento dos filhotes. Em média, o número de filhotes nas ninhadas de ratas diabéticas foi menor ($G2 = 6,12 \pm 0,67$, média \pm EPM), comparado ao grupo controle ($G1 = 9,17 \pm 0,52$). Foi observado um alto índice de canibalização dos filhotes e mortes neonatais no grupo de ratas diabéticas, fato

que não ocorreu no grupo controle.

Avaliação da prole feminina após o nascimento:

Em ambos os grupos, não foram observadas malformações congênitas externas nas neonatas viáveis. A média do peso corporal (g) da prole feminina por ninhada, avaliada no 3º DPN, 10º DPN e 20º DPN, foi menor na prole de ratas diabéticas, quando comparada à prole de ratas do grupo controle (tabela 1). As médias das glicemias (mg/dl) nas proles de ratas diabéticas foi estatisticamente inferiores no 3º DPN ($G1 = 104,78 \pm 2,27$; $G2 = 67,93 \pm 4,38$) e 10º DPN ($G1 = 138,58 \pm 3,31$; $G2 = 111,43 \pm 9,78$), às proles do grupo controle, enquanto que no 20º DPN as médias das glicemias foram semelhantes entre os grupos (dado não mostrado).

Em comparação com o grupo controle, houve um retardo no tempo (dias) médio para o descolamento das orelhas, aparecimento de pêlos e abertura dos olhos na prole das ratas diabéticas. Por outro lado, o tempo de aparecimento de incisivos foi semelhante entre os grupos (tabela 2).

Parâmetros reprodutivos:

A figura 1 mostra que houve um retardo significativo no tempo (dias) da abertura vaginal (indicativo da instalação da puberdade) da prole feminina das ratas diabéticas, quando comparadas ao controle.

Da mesma forma, houve um atraso no tempo (dias) da idade do primeiro estro da prole feminina das ratas diabéticas ($G2 = 41,98 \pm 0,96$), quando comparadas com as proles controle ($G1 = 36,02 \pm 0,45$), mas não houve diferença entre a frequência (dias) da fase proestro, estro e metaestro entre os grupos (dados não mostrados).

Os aspectos histológicos dos ovários (figura 2) e úteros foram semelhantes nas ratas em estro pertencentes aos grupos. Entretanto, a análise morfométrica da gônada revelou

diminuição significativa no número de folículos primordial e primário, pré-antral e antral da prole das ratas diabéticas, comparando com o controle (tabela 3). Foi também observada uma redução no peso absoluto médio dos ovários (mg) da prole das ratas diabéticas, comparando com o controle (tabela 3).

A avaliação do comportamento sexual não revelou diferenças significativas entre os grupos (dados não mostrados). Em relação à performance reprodutiva, foi verificado que a exposição ao meio intrauterino e lactacional diabético provocou redução no peso final da rata prenhe, peso da ninhada, do número de filhotes e aumento no peso da placenta, comparado com o grupo controle (tabela 3).

DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que durante o desenvolvimento intrauterino ocorre uma programação da função, ao longo da vida, de diferentes sistemas e órgãos do corpo (programação fetal de doenças na vida adulta), em resposta a distúrbios no ambiente intrauterino (Aerts and Van Assche, 2003; Zambrano et al., 2005b). A maioria destes estudos tem se preocupado em avaliar os efeitos da programação fetal nas disfunções cardiovasculares e o desenvolvimento de diabetes na prole adulta devido à gestação em meio a um ambiente uterino anormal (Zambrano et al., 2005a). Este trabalho teve a finalidade de verificar os efeitos tardios da programação fetal sobre as funções reprodutivas femininas ao longo do seu desenvolvimento e demonstrar que a exposição das ratas ao diabete materno, durante o período fetal e durante a lactação, acarreta conseqüências na prole feminina, que se manifestaram tanto na pré-puberdade, puberdade e na vida adulta.

O diabetes experimental tem sido estudado em diversos modelos experimentais (Rees and Alcolado, 2005). Neste trabalho, foi utilizada uma única dose de streptozotocin para induzir o estado de diabetes grave (400 mg/dl) nas ratas, antes do acasalamento, mimetizando o quadro clínico típico do diabetes não controlado em humanos (López-Soldado and Herrera, 2003). Os sinais clássicos da patofisiologia do Diabetes mellitus tais como hiperglicemia, polifagia, polidipsia, poliúria, observados nas ratas oito dias após a indução com a droga, assim como o menor ganho de peso corporal durante a gestação, confirmam dados da literatura e corroboram com outros trabalhos em roedores (Padmanabhan and Al-Zuhair, 1988; Damasceno et al., 2002; Al Ghafli et al., 2004).

O peso corporal é um parâmetro importante de ser avaliado, pois dá uma visão geral do status de saúde do animal e indica possíveis efeitos de toxicidade sistêmica. Neste estudo, embora o ganho de peso corporal das ratas diabéticas tenha sido semelhante ao controle, na maior parte da prenhez, houve uma diminuição no grupo diabético no final da prenhez. Al Ghafli et al. (2004), também observaram que o ganho de peso corporal durante a gestação de ratas, nas quais o diabetes foi quimicamente induzido, com uma única injeção intraperitoneal de 60mg/kg de streptozotocin, foi menor do que o ganho de peso corporal do grupo controle.

As ratas que receberam tratamento diabetogênico tiveram o sucesso gestacional e reprodutivo prejudicado, evidenciado pelo baixo número de fêmeas prenhes que vieram a termo e um menor número de filhotes por ninhada, quando comparado às ratas normoglicêmicas do grupo controle. Após sacrifício e análise do útero das ratas diabéticas que não pariram observou-se a presença de diversos sítios de reabsorção, indicando que a hiperglicemia crônica no meio intrauterino, decorrente do diabetes materno, prejudica o desenvolvimento e sobrevivência do concepto. Al Ghafli et al. (2004) também relataram

um aumento nas reabsorções embrionárias e morte fetal na prole de ratas em que o diabetes foi induzido quimicamente. Sun et al. (2005), analisando embriões de ratas diabéticas nos 9,5 e 11,5 dias gestacionais, demonstraram uma associação entre apoptoses inadequadas e malformações do sistema nervoso. Contudo, neste trabalho não foi observada a presença de malformações congênitas na prole viável das ratas diabéticas, que vieram a termo. Entretanto, não se pode ignorar o alto índice de canibalização da prole e da incidência de reabsorções, indicativo da existência de problemas embrionários e fetais, que não puderam ser observados.

A glicemia e o peso corporal das proles femininas das ratas, dos dois grupos experimentais (controle e diabetes), não foram avaliadas imediatamente após o nascimento para se evitar o risco de rejeição materna dos filhotes (Holemans et al., 1999). Em mães diabéticas, o feto tem suprimento abundante de glicose e sua adaptação ocorre por mudanças na produção e ação da insulina (Aerts and VanAssche, 1977; Kervran et al., 1978). A característica típica de recém-nascidos de mães diabéticas é a presença de macrossomia e alto peso ao nascimento. Em fetos de ratas com diabetes moderado (glicemia entre 100 e 300 mg/dl), esta hiperglicemia estimula o pâncreas fetal levando à hiperplasia e hiperatividade das células β -pancreáticas resultando em hiperinsulinemia, incremento do anabolismo e, conseqüentemente, estímulo do crescimento fetal com macrossomia. No de diabete grave (glicemia > 300mg/dl) em ratas, que corresponderia ao diabete descompensado em gestantes, os níveis glicêmicos também induzem à hiperplasia das células β -pancreáticas e aumentam a secreção de insulina, numa fase inicial. Porém, a superestimulação destas células leva ao esgotamento funcional e à diminuição acentuada da produção de insulina no final da gestação. Isto resulta em diminuição do anabolismo, tendo como conseqüência a restrição de crescimento intrauterino (RCIU). Portanto,

dependendo dos níveis de hiperglicemia, o diabetes materno pode favorecer a macrosomia fetal ou RCIU (Aerts and Van Assche, 2003; Merzouk et al., 2002).

N DPN 3, 10 e 20 a média do peso corporal das proles femininas das ratas diabéticas foi reduzida, quando comparada às proles controle, evidenciando um prejuízo no desenvolvimento. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre o baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Hoet and Janson, 1999; Soto and Mericq, 2005; Srinivasan et al., 2006). Entretanto a média glicêmica da prole feminina nascida de ratas diabéticas, avaliada nos DPN 3 e 10, foi inferior à do grupo controle.

Observou-se neste estudo que houve retardo no descolamento das orelhas, aparecimento de pêlos e abertura dos olhos nas proles fêmeas nascidas de ratas diabéticas. Isso pode ser devido provavelmente a um distúrbios no meio intrauterino durante a gestação, devido ao diabetes materno ou deficiência nutricional da mãe, prejudica o crescimento e o desenvolvimento fetal, podendo causar retardo no crescimento intrauterino, caracterizado pelo baixo peso corporal ao nascimento (Holemans et al., 1999; Engelbregt et al., 2000).

Nas últimas décadas, vários trabalhos têm demonstrado uma relação entre o retardo do crescimento intrauterino e o desenvolvimento puberal de fêmeas e machos, indicando mudanças no início e progressão da puberdade (Engelbregt et al., 2000; Zambrano et al., 2005a). A influência da relação entre os mecanismos que controlam o início da puberdade e o retardo do crescimento intrauterino ainda não estão totalmente compreendidos. Desta forma, foi realizado o estudo da abertura vaginal, que ocorre a partir do DPN 30 (Eckstein et. Al., 1973), tem sido utilizado como um sinal externo do início da puberdade feminina e é acompanhada do primeiro estro, que ocorre a partir do DPN 38 (Ojeda and Urbanski,

1994; Beckman and Feuston, 2003). Este estudo mostrou que houve retardo na idade média da abertura vaginal e do primeiro estro na prole das ratas diabéticas, sugerindo que as complicações reprodutivas decorrentes do diabetes grave prejudicou o desenvolvimento sexual inicial. Entretanto, na idade adulta, o ciclo estral foi normalizado.

Alguns autores têm hipotetizado que o peso corporal exerceria um importante papel na regulação, em nível do sistema nervoso central, no controle da puberdade. A relação entre o peso corporal (quantidade de gordura) durante o desenvolvimento intrauterino, ao nascimento e período perinatal, e alterações no início da puberdade em ratos, tem sido pouco estudado (Engelbregt et al., 2000), e os reais mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados.

O peso e a morfologia uterina sofrem flutuações normais devido a mudanças nos níveis hormonais que ocorrem ao longo do ciclo estral, sendo que o peso máximo ocorre na fase de proestro em resposta ao aumento de secreção de estrógeno (US EPA, 1996). Neste trabalho, a ausência de alterações na regularidade do ciclo estral, na morfologia e no peso do útero na fase de estro sugerem que a exposição ao meio intrauterino e lactação hiperglicêmico não interferiu nas secreções neuroendócrinas durante o ciclo reprodutivo.

A organização sexual do cérebro feminino requer, durante o período sensitivo de desenvolvimento, baixos níveis de estimulação estrogênica de origem materna para que ocorram comportamentos sexuais femininos característicos, assim como a liberação cíclica de gonadotropinas para manutenção das fases estrais (Dohler et al, 1982). Em nosso trabalho a exposição no meio intrauterino e lactacional hiperglicêmico não alterou o coeficiente de lordose das fêmeas durante o teste de comportamento sexual, sugerindo que provavelmente a hiperglicemia materna não interferiu na organização sexual do cérebro feminino.

Entretanto, houve diminuição do peso do ovário de ratas púberes do grupo de mães diabéticas, provavelmente devido à redução, aos 60 dias de idade, no número de folículos primordiais, primários, pré-antrais e antrais nas ratas do grupo de mães diabéticas. Estes dados sugerem que a exposição aos meios intrauterino e lactacional hiperglicêmicos podem ter induzido, nesta fase do desenvolvimento sexual, uma evolução descontínua dos estágios foliculares, diminuindo assim o mecanismo ovulatório. O impacto na reprodução é determinado de acordo com o estágio do desenvolvimento folicular atingido (Hoyer and Sipes 1996; Hoyer 1999).

O presente trabalho mostrou que no teste de fertilidade houve uma diminuição do peso corporal final das proles de ratas diabéticas prenhes, e redução no número de filhotes. É provável que esse resultado esteja associado à perda prematura de folículos ovarianos que se deve aos danos em folículos pré-antrais e antrais, que interrompem temporariamente a função reprodutiva, uma vez que ocorre um maior recrutamento de folículos primordiais para suprir os folículos danificados. Danos em folículos primordiais e primários levam a um quadro de infertilidade permanente, já que estes não são repostos (Generoso et al., 1971; Hooser et al., 1994). Entretanto o aumento no peso da placenta das proles femininas de ratas diabéticas prenhes se deve a está placenta ainda ser imatura, por isso ela é maior e o peso do feto é menor. Segundo Bruin et al. (1998), filhotes que nasceram com baixo peso tiveram problemas de fertilidade e reprodução na vida adulta.

No presente trabalho, a hiperglicemia crônica, durante a gestação e lactação, afetou as funções reprodutivas da prole na puberdade e maturidade, reforçando a hipótese de que distúrbios no meio intrauterino podem permanentemente programar a estrutura e função do organismo. Não podemos determinar, com base somente nos parâmetros avaliados, o quanto as alterações encontradas no sistema reprodutivo feminino podem ser resultantes,

diretamente, do meio intrauterino e lactacional hiperglicêmico, decorrente do diabetes materno, ou um efeito indireto do prejuízo nas trocas materno-fetais, que acarreta deficiência de nutrientes e restrição de crescimento intrauterino da prole, uma vez que ambos os fatores estão relacionados.

Neste contexto, futuros trabalhos para verificar os mecanismos pelos quais o diabetes materno afeta parâmetros reprodutivos na prole poderão ser aplicados na saúde humana, visando um melhor cuidado pré e perinatal natal, garantindo uma melhor qualidade de vida. Tendo em vista que o diabetes causa alteração no desenvolvimento psicomotor de crianças de mães diabéticas e aumenta em proporções epidêmicas no mundo todo, sendo um importante problema de saúde pública da atualidade, a utilização de modelos animais com diabetes materno (grave ou gestacional) induzido experimentalmente, pode ajudar na elucidação dos mecanismos pelos quais a doença programa o organismo fetal a desenvolver doenças crônicas e problemas reprodutivos na puberdade e maturidade.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 04/12948-0) e da Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP, Proc. 01089/05).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, L., Van Assche, F.A., 1977. Rat fetal endocrine pancreas in experimental diabetes. *Journal Endocrinology*, 73, 339-346.
- Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003. Intra-uterine transmission of disease. *Placenta* 24, 905-911.

- Al Ghafli, M.H.M., Padmanabhan, R., Kataya, H.H., 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.
- 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.
- Beckman, D.A., Feuston, M., 2003. Landmarks in the development of the female reproductive system. *Birth defects research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 68, 2:137-143.
- Boloker, J., Gertz, S.J., Simmons, R.A., 2002. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* 51, 1499-1506.
- Bolzán, A.D., Bianchi, M.S., 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation research* 512, 121.
- Borgeest, C., Symonds, D., Mayer, L.P., Hoyer, P.B., Flaws, J.A., 2002. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicological Sciences* 68, 473-478.
- Bruin, J.P., Dorland, M., Bruinse, H.W., Spliet, W., Nikkels, P.G.J., Te Velde, E.R., 1998. Fetal growth retardation as a cause of impaired ovarian development. *Early Human Development* 51, 39-46.
- Canavan, J.P., Goldspink, D.F., 1988. Maternal diabetes in rats II. Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes* 37, 1671-1677.

- Cho, N.H., Silverman, B.L., Rizzo, T.A., Metzger, B.E., 2000. Correlations between the intrauterine metabolic environment and blood pressure in adolescent offspring of diabetic mothers. *The Journal of Pediatrics* 136, 587–592.
- Dabelea, D., Hanson, R.L., Bennett, P.H., Roumain, J., Knowler, W.C., Pettitt, D.J., 1998. Increasing prevalence of type II diabetes in American Indian children. *Diabetologia* 41, 904–910.
- Damasceno, D.C., Volpato, G.T., Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., 2002. Oxidative stress and diabetes in pregnancy rats. *Animal. Reproduction Science* 72, 235-244.
- Dohler, K.D., Cocquelin, A., Davies, F., Hines, M., Shrne, J.E., Gorski, S.A., 1982. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the brain is determined by the perinatal hormone environment. *Neurosciences Letters* .33, 295-298.
- Eckstein, K.L., Oberlander, S.G., Marx, G.F., 1973. Uterine rupture during extradural blockade. *Canadian Anaesthetists' Society Journal* 20, 4:566-568.
- Engelbregt, M.J., Houdijk, M.E., Popp-Snijders, C., Delemarre-Van de Waal, H.A., 2000. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research* 48, 6:803-807.
- Fujisaw, Y , Nakagawa, Y., Ren-shan, L., Ohzeki, T., 2004. Streptozotocin-induced diabetes in the pregnant rat reduces 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in placenta and fetal kidney. *Life Sciences* 75, 2797-2805.
- Generoso, W., Stout, S.K., Huff, S.W., 1971. Effects of alkylating chemicals on reproductive capacity of adult female mice. *Mutation Research* 13, 171-184.

- Grill, V., Johansson, B., Jalkanen, P., Eriksson, U.J., 1991. Influence of severe diabetes mellitus early in pregnancy in the rat: effects on insulin sensitivity and insulin secretion in the offspring. *Diabetologia* 34, 373–378.
- Hoet, J.J., Hanson, M.A., 1999. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *Journal of Physiology* 514.3, 617-627.
- Holemans, K., Aerts, L., Van Assche, F.A., 2003. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *Journal of Physiology* 574, 11-20.
- Holemans, K., Gerber, R.T., Meurrens, K., Clerck, F., Poston, L., Van Assche, F.A., 1999. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Diabetologia* 42, 81-89.
- Hooser, S.B., Douds, D.P., DeMerell, D.G., Hoyer, P.B., Sipes, I.G., 1994. Long-term ovarian and gonadotropin changes in mice exposed to 4-vinylcyclohexene. *Reproductive Toxicology* 08, 315-323.
- Hoyer, P.B., 1999. Ovotoxic environmental chemicals: indirect endocrine disruptors. In: Naz R (ed) *Endocrine disruptors: Effects on male and female reproductive systems*. CRC Press, Boca Raton 57-88.
- Hoyer, P.B., Sipes, I.G., 1996. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36, 307-331.
- Hrabák, A., Szabó, A., Bajor, T., Körner, A., 2006. Differences in the nitric oxide metabolism in streptozotocin-treated rats and children suffering from Type 1 diabetes. *Life Sciences* 78, 1362-1370.
- Jhonson, L.M., Sidman, R.L., 1979. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. *Biology of Reproduction* 20, 552-559.

- Kervran, A., Guillaume, M., Jost, A., 1978. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 15, 387-393.
- Lesage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D., Darnaudery, M., 2004. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *Journal Endocrinology* 181, 291-296.
- Long, J.A., Evans, H.M., 1922. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California* 6, 1-148.
- López-Soldado, I., Herrera, E., 2003. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Experimental Diabetes Research* 4(2), 107-118.
- Manderson, J.G., Mullan, B., Patterson, C.C., Hadden, D.R., Traub, A.I., McCance, D.R., 2002. Cardiovascular and metabolic abnormalities in the offspring of diabetic pregnancy. *Diabetologia* 45, 991–996.
- Mandl, A.M., 1951. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology* 28, 576-584.
- Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 62, 4A:609-614.
- Merzouk, H., Madane, S., Hichami, A., Prost, J., Montairou, K., Belleville, J., 2002. Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring streptozotocin-induced rats. *Lipids*. 37, 773-781.
- Ojeda, S.R., Urbanski, H.F. 1994. Puberty in the rat. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press 363-409.

- Padmanabhan, R., Al-Zuhair, A.G.H., 1988. Congenital malformations and \square ntrauterine growth retardation in streptozotocin induced diabetes during gestation in rat. *Reproductive Toxicology* 1, 117-125.
- Pitkin, R.M., Van Orden, D.E., 1974. Fetal effects of maternal streptozotocin-diabete. *Endocrinology* 1247-1253.
- Reece E.A., et al., 2004. *Diabetes in women: Adolescence, Pregnancy and menopause.* New York (NY): Lippincott Williams & Wilkins.
- Rees, DA., Alcolado, JC., 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 22, 359-370.
- Robinson, J., Canavan, J.P., Haj, A.J.E., Goldspink, D.F., 1988. Maternal diabetes in rats I. Effects on placental growth and protein turnover. *Diabetes* 37, 1665–1670.
- Smart, J.L., Dobbing, J., 1971. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Research* 28, 85-95.
- Soto, I.N., Mericq, G.V., 2005. Fetal growth restriction and insulin resistance. New findings and review of the literature. *Revista Medica de Chile* 133(1), 97-104.
- Srinivasan, M., Aalinkel, R., Song, F., Mitrani, P., Pandya, J.D., Strutt, B., Hill, D.J., Patel, M.S., 2006. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 290(1), E129-E-134.
- Sun, F., Kawasaki, E., Akazawa, S., Hishikawa, Y., Sugahara, K., Kamihira, S., Koji, T., Eguchi, K., 2005. Apoptosis and its pathway in early post-implantation embryos of diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice* 67 (2), 110-118.

- Takenaka, Y., Toyoda, N., 1995. The effect of α 1-bblocking vasodilator on fetal growth and uteroplacental blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences* 56, 13:1127-1134.
- Talsness, C.E., Shakibaei, M., Kuriyama, S.N., Grande, S.W., Sterner-Kock, A., Schnitker, P., Souza, C., Grote, K., Chahoud, I., 2005. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicology Letters* 157, 189-202.
- Tang, D., Yu, T., Khraibi, A.A., 2003. Cardiovascular and renal characteristics, and responses to acute volume expansion of a rat model of diabetic pregnancy. *Life Sciences* 74, 2909-2918.
- Thamotharan, M., McKnight, R.A., Thamotharan, S., Kao, D.J., Devaskar, S.U., 2003. Aberrant insulin-induced GLUT4 translocation predicts glucose intolerance in the offspring of a diabetic mother. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 284, E901–E914.
- US EPA. 1996. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk assessment, U.S. Environmental Protection Agency. *Federal Register* 61, 212.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P.M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005a. A maternal low protein diet durin pregnancy and lactation in the rat male reproductive development. *Journal of Physiology* 563, 275-284.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deás, M., Martínez-Samayoa, P.M., González-Zambrano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., Nathanielz, P.W., 2006. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-

specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *Journal of Physiology*, 571, 221-230.

Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P.M., Bautista, C.J., Deás, M., Guillén, L., Rodríguez-González, G.L., Guzmán, C., Larrea, F., Nathanielz, P.W., 2005b. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *Journal of Physiology*, 566, 225-236.

Zhao, Z., Reece, E.A., 2005. Experimental mechanisms of diabetic embryopathy and strategies for developing therapeutic interventions. *Journal of Society for Gynecologic Investigation* 12, 549-557.

Tabela 1

Média do peso corporal por ninhada (g) da prole feminina de ratas controle e diabéticas, avaliado no 3º, 10 e 20º dia pós-natal. Grupo 1 – ninhada de ratas controle; Grupo 2 – ninhada de ratas diabéticas. Valores expressos em média \pm EPM. ****p<0,0001. Teste t de Student's.

Média do peso corporal (g) das ninhadas		
Dia	Grupo 1 (n= 7)	Grupo 2 (n= 7)
3º DNP	9,68 \pm 0,36	6,48 \pm 0,39****
10º DNP	23,13 \pm 0,52	11,64 \pm 1,19****
20º DNP	43,85 \pm 0,99	22,37 \pm 2,55****

Tabela 2

Parâmetros de desenvolvimento físico inicial da prole feminina de ratas controle e diabéticas. Grupo 1 – ninhada de ratas controle; Grupo 2 – ninhada de ratas diabéticas. Valores expressos em média para teste t de Student's^a e mediana para o teste de Mann-Whitney^b ± EPM. **p<0,01, *p<0,05.

Características	Média (dias) do desenvolvimento físico das ninhadas	
	Grupo 1 (n= 7)	Grupo 2 (n= 7)
^a Descolamento das orelhas	2,92 ± 0,11	3,59 ± 0,18**
^a Aparecimento de pêlos	4,82 ± 0,13	6,03 ± 0,37*
^a Aparecimento de incisivos	6,16 ± 0,39	6,83 ± 0,27
^b Abertura de olhos	13,82 ± 0,18	15,12 ± 0,49*

Tabela 3

Peso absoluto médio do ovário (mg), classificação e contagem de estruturas ovarianas no Grupo 1 – ninhada de ratas controle e Grupo 2 – ninhada de ratas diabéticas, aos 60 dias de idade, na fase de estro. Valores expressos pela média \pm EPM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ e **** $p < 0,0001$. Teste t de Student's.

Estruturas	Grupo 1 (n= 5)	Grupo 2 (n= 5)
Peso absoluto médio do ovário (mg)	174,25 \pm 7,15	114,00 \pm 11,32***
Folículo primário e primordial	33,75 \pm 3,18	10,63 \pm 2,05****
Folículo pré-antral	21,13 \pm 2,15	12,63 \pm 1,99*
Folículo antral	13,25 \pm 1,72	7,25 \pm 1,15*
Folículo atrésico	1,12 \pm 0,13	0,75 \pm 0,16
Corpo lúteo	9,75 \pm 1,03	7,75 \pm 1,37

Tabela 4

Glicemia e resultados dos testes de fertilidade realizados com ratas pertencentes ao Grupo 1 – ninhada de ratas controle e Grupo 2 – ninhada de ratas diabéticas. Valores expressos pela média \pm EPM (teste t de Student's^a) e mediana (teste de Mann-Whitney^b) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Parâmetro	Grupo 1 (n= 10)	Grupo 2 (n= 10)
^b Taxa de prenhez (%)	90	80
Nº de fêmeas prenhes	9	8
^a Glicemia	90,44 \pm 3,64	82,75 \pm 3,19
^a Peso final da rata (g)	321,80 \pm 7,65	286,54 \pm 7,49**
^a Peso útero + fetos (g)	60,99 \pm 5,41	42,29 \pm 3,43*
^a Peso rata – peso útero + fetos (g)	310,05 \pm 12,99	264,23 \pm 7,25**
^a Peso dos fetos (g)	3,71 \pm 0,32	3,05 \pm 0,36
^a Peso das placentas (g)	0,51 \pm 0,03	0,70 \pm 0,07*
^a Número de corpos lúteos	14,56 \pm 0,87	13,13 \pm 0,64
^a Número de implantes	11,00 \pm 0,80	9,25 \pm 1,19
^a Número de reabsorções	1,11 \pm 0,26	1,38 \pm 0,38
^a Número de fetos	10,33 \pm 0,89	6,00 \pm 1,07***
^b Razão sexual (%)	50	50
^b Potencial de fertilidade (%)	80,00	68,76
^b Perdas pré-implantação (%)	23,99	31,18
^b Perdas pós-implantação (%)	11,24	12,49

Legenda das figuras

Figura 1 – Tempo médio (dias) da ninhada da abertura vaginal da prole feminina de ratas controle (Grupo 1, n= 7 ninhadas) e diabéticas (Grupo 2, n= 7 ninhadas). Valores expressos em média \pm EPM. ****p<0,0001. Teste t de Student's.

Figura 2. Fotomicrografias ilustrativas de cortes longitudinais de ovários de ratas. **A:** Grupo 2 – ninhada de ratas diabéticas. Aumento de 50X, coloração HE. **B:** Grupo 1 – ninhada de ratas controle, onde se observa FPP: folículo primordial e primário, FPA: folículo pré-antral, FA: folículo antral e CL: corpo lúteo.

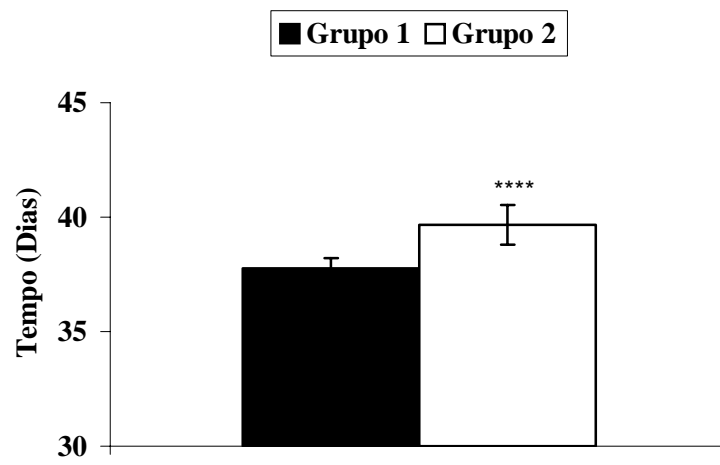


Fig. 1

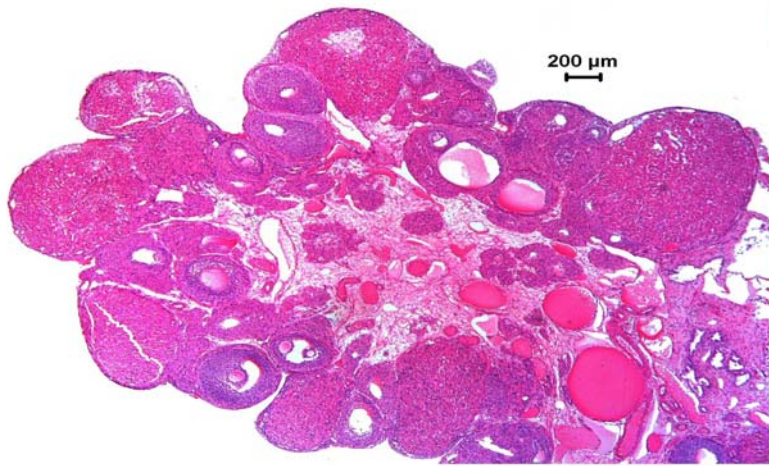
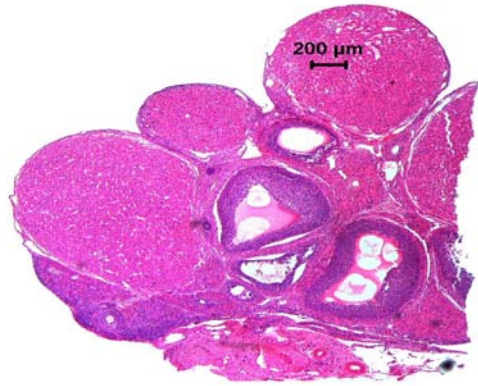


Fig. 2

CONCLUSÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que o diabetes materno provocou, na prole feminina, retardo no desenvolvimento físico inicial, na idade de abertura vaginal e do primeiro estro, indicativos da instalação da puberdade. Na idade adulta, houve diminuição do peso dos ovários e do número de folículos. Embora o comportamento sexual não tenha se alterado, a performance reprodutiva da prole de ratas diabéticas foi inferior à do grupo controle, tendo ocorrido diminuição do número de fetos. Concluiu-se que a exposição aos meios intrauterino e lactacional hiperglicêmicos provocou retardos no desenvolvimento físico e sexual e prejudicou a função reprodutiva de ratas.