MARCIA CURY CIOFFI

Efeitos do diabetes mellitus sobre a função testicular de ratos Wistar

São Paulo

2006

MARCIA CURY CIOFFI

Efeitos do diabetes mellitus sobre a função testicular de ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1734
FMVZ

Cioffi, Marcia Cury
Efeitos do diabetes mellitus sobre a funcão testicular de ratos Wistar / Márcia Cury Cioffi. – São Paulo: M. C. Cioffi, 2006.
55 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe.

1. Diabetes. 2. Espermatogenes. 3. Estreptozotocina. 4. Inibina. 5. Testosterona. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia
Assistência Acadêmica

PARECER

Interessado: Márcia Cury Cioffi

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 680/2005, intitulado: "Estudo do efeito da diabetes mellitus sobre a função testicular de ratos Wistar", no qual foram utilizados 36 ratos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabé, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 18 de outubro de 2005.

Profa. Dra. Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-270 - Cidade Universitária. "Armando de Salles Oliveira"
Fax: (011) 3032-2224 Fone: (011) 3091-7671 -3091-7676 e-mail: fmvz@edu.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia
Assistência Acadêmica

São Paulo, 18 de outubro de 2005.

Of. Bioét.nº80/FMVZ/181005
srg

Ao senhor Professor
Doutor Renato Campanarut Barnabe

Ref. Projeto de Pesquisa protocolado sob o nº 680/2005, intitulado: "Estudo do efeito da diabetes mellitus sobre a função testicular de ratos Wistar."

A Comissão de Bioética, desta Faculdade, ao analisar o projeto acima mencionado houve por bem sugerir a Vossa Senhoria o uso da câmara de CO_2 para eutanásia.

Sem mais, no ensejo expressamos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-270 - Cidade Universitária. "Armando de Salles Oliveira"
Fax: (011) 3032-2224 Fone: (011) 3091-7671 -3091-7676 e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CIOFFI, Márcia Cury

Titulo: Efeitos do diabetes mellitus sobre a função testicular em ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA(S)

Dedico esse estudo ao meu avô paterno e a minha avó materna que foram chamados ao céu para estar com Deus. Agradeço ao meu avô paterno por ter me transmitido através de seus genes o AMOR e RESPEITO pelos animais e agradeço a minha avó materna por ter herdado a paixão pela ciência médica. Apesar dessas duas pessoas maravilhosas não estarem mais fisicamente ao meu lado, vão estar para sempre na minha memória e no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e orientando. Devo a eles tudo que sou, tudo que realizei e tudo que ainda vou conquistar. Agradeço também as minhas duas irmãs queridas e a minha avó paterna pelo seu amor incondicional. Agradeço ao meu companheiro por seu apoio, lealdade e devoção.

Agradecimentos especiais;

- Professora Dra. Márcia Marques Jérico por meus conhecimentos clínicos do diabetes mellitos.

- Professor Dr. Franscisco Gacek por meus conhecimentos fisiológicos.

- Professor Dr. Renato Campanarut Barnabé por ter me acolhido e me ajudado no desenvolvimento desse projeto.

- Roche Diagnostics©, SP, Brasil.

RESUMO

CIOFFI, M. C. **Efeitos do diabetes mellitus sobre a função testicular em ratos Wistar.** [Study of the diabetes mellitus on testicular function of Wistar rat]. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Utilizaram-se 27 ratos Wistar, machos com 98 dias de idade, originados do Biotério da FMVZ-USP, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos do diabetes mellitus, sobre a função reprodutiva relacionada ao macho.Os animais foram divididos em três grupos, grupo A (GA) constituído de 10 animais sadios, grupo B (GB) constituído de oito ratos Wistar, com diabetes mellitus induzida quimicamente através da administração intraperitonial de estreptozotocina (65mg/Kg) e grupo C (GC) constituído por nove animais com diabetes mellitus induzida quimicamente pela administração intraperitonial de estreptozotocina (65mg/Kg), associada a insulinoterapia (3UI/rato por dia). Após quatro dias da administração da droga (GB e GC), os animais pertencentes ao grupo C (GC) receberam insulinoterapia (três IU/rato/dia) durante 42 dias. No final do experimento (46 dias após a administração da estreptozotocina), os animais foram sacrificados e foram observados os seguintes resultados; O diabetes mellitus leva ao aumento da glicemia, diminuição do peso corpóreo, diminuição do peso e tamanho testicular, diminuição das concentrações séricas de testosterona e FSH. Porém através da avaliação dos níveis séricos de inibina B, foi constatado que o diabetes não promove nem redução, nem aumento das concentrações séricas desse hormônio. Conclui-se também que a reposição exógena de insulina foi capaz de impedir a diminuição do peso corporal, redução do peso testicular, diminuição dos níveis de testosterona e FSH, porém apesar da insulinoterapia ter impedido a diminuição do peso corpóreo, não foi capaz de proporcionar o mesmo desenvolvimento corporal observado nos animais controle.

Palavras-chave: Diabetes. Espermatogênese. Estreptozotocina. Inibina. Testosterona

ABSTRACT

CIOFFI, M. C. **Study of the diabetes mellitus on testicular function of Wistar rat.** [Efeitos do diabetes mellitus sobre a função testicular em ratos Wistar]. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The objective of the present experiment was to evaluate the possible effect of diabetes mellitus, on the reproductive function in male rats. Towards this end, 27 male Wistar rats (98 days old), housed at the FMVZ-USP animal holding facility, were randomly assigned into three groups: Group A (GA) consisting of 10 healthy animals; Group B(GB) consisting of eight Wistar rats, with diabetes mellitus chemically induced through the intraperitoneal administration of estreptozotocin (65mg/Kg); and C group (GC) constituted by nine animals with diabetes mellitus chemically induced by the intraperitoneal administration of estreptozotocin (65mg/Kg), associate to an insulin treatment (3IU/rat per day for 42 days) that begun 4 days after the streptozotocin administration. Animals were euthanized 46 days after the administration of the estreptozotocin and the following results were obtained: diabetes mellitus led to an increase of the glicemia, reduction of the corporeal weight, decreased testicular wheight, serum concentrations of testosterone and FSH. No effect of diabeted were found for the serum levels of inhibin B. Results suggested that the exogen replacement of insulin was capable of hindering the reduction on corporal weight, reduction of testicular weight and reduction of the testosterone levels and FSH. On the other hand despite the fact that insulin treatament was capable of avoiding the reduction on bofy weight, it was not capable to provide similar body development observed in the normal animals.

Key words: Diabetes. Spermatogenesis. Streptozotocin. Inhibin. Testosterone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Curva de ganho de peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) pertencentes ao grupo controle (Grupo A). Efeito dos dias sobre o peso dos animais a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 31

Gráfico 2 - Curva de ganho de peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) pertencentes ao grupo com diabetes induzida através de estreptozotocina (Grupo B). Efeito dos dias sobre o peso dos animais a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 32

Gráfico 3 - Curva de ganho de peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) pertencentes ao grupo com diabetes induzida através de estreptozotocina e submetidos a insulinoterapia (Grupo C). Efeito dos dias sobre o peso dos animais a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 32

Gráfico 4 - Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre o peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 34

Gráfico 5 - Efeitos dos dias sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) normais (grupo A = controle) – São Paulo – São Paulo - 2005 - 2006..... 37

Gráfico 6 - Efeitos dos dias sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) com diabetes induzida através de estreptozotocina (grupo B) – São Paulo – São Paulo - 2005 - 2006..... 38

Gráfico 7 - Efeitos dos dias sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) com diabetes induzida através de estreptozotocina e submetidos a insulinoterapia (grupo C) – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 39

Gráfico 8 - Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 40

Gráfico 9 - Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre o peso testicular de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 43

Gráfico 10 - Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre os níveis plasmáticos de testosterona de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 46

Gráfico 11 - Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre os níveis plasmáticos de inibina de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 48

Gráfico 12 - – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre os níveis plasmáticos de FSH de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006..... 49

Figura 1 - Administração de insulina por via subcutânea. São Paulo – São Paulo – 2006..... 24

Figura 2 - Exposição e extração testicular. São Paulo – São Paulo – 2006..... 24

Figura 3 - Coleta de sangue, através de picote de cauda. São Paulo – São Paulo - 2006..... 26

Figura 4 - Administração de anti-séptico na cauda do animal. São Paulo – São Paulo – 2006..... 26

Figura 5 - Dosagem de glicemia São Paulo – São Paulo – 2006..... 27

Figura 6 - Leitura da glicemia pelo monitor. São Paulo – São Paulo – 2006..... 27

Figura 7 - Comparação do Animal saudável (esquerda), animal diabético com Insulinoterapia (meio), com animal diabético sem insulinoterapia (direita). Observar diferença em relação à massa corpórea (Quadragésimo oitavo dia). São Paulo – São Paulo – 2006..... 35

Figura 8 - Comparação de tamanho testicular entre animal diabético sem insulinoterapia (esquerda) e animal saudável (direita), 48 dias após o início do período experimental São Paulo – São Paulo – 2006..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva de ganho de peso dos animais dos grupos controle (A), diabéticos (B) e diabéticos submetidos a insulinoterapia (C), durante 48 dias em ratos Wistar – São Paulo – São Paulo – 2005 - 2006..... 30

Tabela 2 - Curva de glicemia de animais dos grupos controle (A), diabéticos (B) e diabéticos submetidos a insulinoterapia (C), durante 48 dias em ratos Wistar – São Paulo – São Paulo – 2005 - 2006..... 36

Tabela 3 - Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) nas concentrações plasmáticas de inibina, testosterona e FSH, e no peso testicular de ratos Wistar, 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005-2006..... 42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....14

2 OBJETIVO 15

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16

4 MATERIAL E MÉTODO 23

4.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA E FSH.....25

4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INIBINA B.....25

4.3 AVALIAÇÃO DA GLICOSE SÉRICA.....25

4.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....28

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....30

7 CONCLUSÃO.....51

REFERÊNCIAS.....52

1 INTRODUÇÃO

A estreptozotocina é um antibiótico sintetizado pela bactéria *Streptomyces Achoromogenes*. Essa droga vem apresentando um seletivo efeito citolítico sobre as células B das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Devido as suas propriedades diabetogênicas, a estreptozotocina vem sendo utilizada como droga de eleição para a indução do diabetes mellitus em animais experimentais (BRENNA; QUIGSTAD; BRENNA; WALDUM, 2003).

Inúmeros estudos já realizados demonstraram que o diabetes mellitus está associada a alterações na função sexual e reprodutiva, tanto em homens como em modelos experimentais, porém os mecanismos fisiopatológicos dessas disfunções reprodutivas permanecem ainda inconclusivos (CALVO et al., 1982; FAERMAN et al., 1972; STEGER et al., 1989). Os gonócitos em ratos machos permanecem inativados até a puberdade, que ocorre por volta de 50 dias de vida. Após a puberdade, os gonócitos começam a se dividir e tornam-se espermatogônias, a partir daí as espermatogônias continuam se dividindo até que o animal perca a capacidade de produzir espermatozóides (KRINKE, 2000).

No rato, 14 estágios do ciclo espermatogénico são reconhecidos nos túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos possuem uma organização segmentada, logo em cada corte transversal do túbulo, são vistos de forma homogênea, os estágios envolvendo quatro a cinco gerações de células germinativas em sincronia. Em ratos, são necessários 12 dias para se ter um ciclo completo constituindo esses 14 estágios mencionados. Porém, nos ratos são requeridos quatro ciclos para a formação final do espermatozóide, logo são requeridos 48 dias para completar toda espermatogênese (KRINKE, 2000).

2 OBJETIVO

Esperamos que os dados a obtidos neste experimento, possam vir a contribuir para um melhor entendimento e compreensão de possíveis fenômenos fisiopatológicos relacionados aos processos reprodutivos no macho que acompanham o diabetes mellitus, caso vier a ser constatada alguma das alterações descritas, temos como objetivo também avaliar se a insulinoterapia é capaz de retardar ou amenizar essas alterações patológicas decorrentes do diabetes mellitus.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O diabetes mellitus é uma doença endócrina que se caracteriza pelo comprometimento da função das células B das ilhotas de Langerhans do pâncreas, levando a uma perda progressiva, e eventualmente completa, da secreção de insulina. Uma vez instalado o quadro de hipoinsulinismo ocorre uma falha nas funções orgânicas do tecido adiposo, muscular e hepático, alterando com isso o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Logo, uma deficiência relativa ou absoluta de insulina resulta numa diminuição da utilização de glicose, aminoácidos e ácidos graxos pelos tecidos periféricos (hepatócitos, miócitos e adipócitos), com isso à glicose obtida da dieta ou da gliconêogenese hepática acumula-se no sangue causando hiperglicemia. (BIRCHARD; SHERDING, 1998).

A hiperglicemia crônica presente no diabetes mellitus está associada em longo prazo a danos, disfunções ou falência de vários órgãos, especialmente os olhos, os rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Os sintomas mais comuns da hiperglicemia são; poliúria, polifagia e perda de peso (NICOLAU et al., 2005).

Com o objetivo de estudar mais a fundo os mecanismos fisiopatológicos do diabetes mellitus, sobre os diferentes sistemas do organismo, iniciou-se o desenvolvimento de protocolos experimentais de indução do diabetes. O Primeiro método de indução experimental do diabetes foi descrito por Banting e Bast (1923), promovendo uma remoção cirúrgica parcial ou total do pâncreas em cães. Por volta de 1937, a pancriectomia como método de indução experimental do diabetes mellitus passou a ser substituído por um método experimental mais simples e muito menos traumático. Nos meados de 1937 a utilização de uma droga diabetogênica (Aloxana), passou a substituir a pancriectomia como método experimental de indução do diabetes. A indução química, além de muito mais simples do que a cirúrgica é também muito menos traumática. A Aloxana causa o diabetes mellitus, pois leva a destruição das células B das ilhotas de Langerhans do pâncreas, porém essa droga tem um forte efeito nefrotóxico. Por volta de 1963 foi descoberta uma segunda droga (estreptozotocina) com propriedades diabetogênicas, porém com menos efeitos tóxicos do que a Aloxana. Desde então a estreptozotocina vem sendo

a droga diabetogênicas experimental de eleição. Antes da descoberta da estreptozotocina, a aloxana era a única opção para a realização de uma indução química do diabetes mellitus experimental (KALTER, 1996).

A estreptozotocina é um antibiótico de amplo espectro, com funções anti-neoplasicas e diabetogênicas (BOLZAN; BIANCHI, 2002). Essa droga vem sendo muito utilizada para induzir diabetes mellitus em animais experimentais, devido a sua ação direta e tóxica nas células B das ilhotas de Langerhans do pâncreas (KONRAD et al., 2001).

A estrutura molecular da estreptozotocina foi primeiramente descrita por Herr et al.,1967. Essa droga induz a morte celular por apoptose e necrose. A morte celular por apoptose foi observada em culturas de células B pancreáticas logo após o tratamento com a estreptozotocina (MORGAN et al., 1994). Sain et al.,1996 demonstrou que a estreptozotocina em doses baixas induz a apoptose das células B pancreáticas ao passo que, em doses altas, causa necrose das mesmas.

Lee et al. (2003) avaliou a ação da estreptozotocina sobre a morfologia, o número (volume e massa) e a função das ilhotas de Langerhans no pâncreas de ratos Wistar, observando que essa droga apresenta uma toxicidade seletiva sobre as células B das ilhotas, pois constataram em ratos diabéticos (diabetes induzida quimicamente pela estreptozotocina) que essa droga causa uma diminuição tanto do número, como da função das ilhotas. A estreptozotocina leva também a alterações morfológicas das ilhotas, enquanto que ilhotas normais são circulares, compactas e se coram bem com dithizone, aquelas lesionadas pela ação da estreptozotocina se apresentam colabadas, amorfas e se coram mal com a dithizone.

O mecanismo pelo qual a estreptozotocina induz a morte celular das células B envolve fragmentação do DNA, seguida de ativação da enzima nuclear Poly (ADP–RIBOSE) Polimerase (PARP). A ativação dessa enzima leva a uma forte redução do NAD+ celular. De qualquer forma, a sensibilidade das células B à ação tóxica da estreptozotocina é espécie específica. Tem sido demonstrado que as ilhotas de humanos, em contraste com as ilhotas de ratos ou camundongo, são muito mais resistentes ao efeito tóxico da estreptozotocina (ELSNER; TIEDG; LENZEN, 2003). Essa diferença na suscetibilidade das células B aos efeitos tóxicos da estreptozotocina, provavelmente seja devida a diferentes níveis de expressão celular do transportador GLUT 2 (HOSOKAWA; DOLCI; THORENS, 2001).

As células B de humanos expressam níveis menores GLUT 2 do que as células B dos roedores (RAKIRTEN et al., 1963). Porém a estreptozotocina não demonstra ter efeito tóxico particular nas células hepáticas e renais, ou seja, a expressão pela célula do transportador GLUT 2 não significa necessariamente que a estreptozotocina é citotóxica para a célula, pois o transportador GLUT 2 é também expressado nos hepatócitos e nas células tubulares renais. Além disso, não existem evidências de citotoxidade nessas células após administrações de estreptozotocina. (BRENNA et al., 2003).

As disfunções patológicas observadas em animais tratados com a estreptozotocina, possivelmente sejam resultado da ação tóxica direta da droga sobre as células B das ilhotas de Langerhans, porém algumas dessas disfunções podem não ter relação com a destruição das células B, mas sim com um efeito tóxico da estreptozotocina em outras células de outros tecidos. Porém, ainda não foi descrita nenhuma forma de distinção entre essas ações da estreptozotocina. Até a presente data, não se tem estudos realizados que comprovem que a estreptozotocina tenha uma ação direta sobre a função reprodutiva.

Hosokawa, Dolci e Thorens (2001), demonstraram em camundongos modificados geneticamente, que as células B que expressam GLUT 2 são sensíveis aos efeitos tóxicos da estreptozotocina, ao passo que as células B que expressam GLUT 1 são completamente resistentes à ação dessa mesma droga. Dessa forma, conclui-se que a ação tóxica (nas células B) da estreptozotocina é estritamente dependente da expressão do transportador GLUT 2. Dessa maneira, acredita-se que o transporte da estreptozotocina para dentro da célula seja feito seletivamente pelo transportador GLUT2 (HOSOKAWA; DOLCI; THORENS, 2001).

A associação entre diabetes mellitus e problemas reprodutivos no homem, foi primeiramente relatada em 1797, porém o mecanismo exato de como leva a essas alterações reprodutivas permanecem inconclusivos. Porém, várias hipóteses tem sido estudadas e levantadas (WABREK, 1979). A incidência de ejaculação retrograda em homens diabéticos é baixa e o exato mecanismo patológico desse problema não é totalmente conhecido. Uma das etiologias mais defendidas é que a neuropatia causada pelo diabetes mellitus seja responsável, tanto pela ejaculação retrograda, como pela dificuldade de ereção. O sistema nervoso simpático pode ser afetado pelo diabetes mellitus, logo se acredita que o mecanismo patológico na reprodução seja causado pela neuropatia simpática. Dentre homens diabéticos, a

infertilidade é um problema ainda pouco estudado e a avaliação do estado funcional das gônadas nestes casos não está claramente estabelecida (CAI et al., 2000). Distúrbios na ereção é uma das complicações mais reconhecidas no diabetes mellitus em homens (ALTAY et al., 2003).

Ratos machos adultos com diabetes mellitus induzida pela estreptozotocina, produzem um modelo experimental interessante e relevante para o estudo dos efeitos do diabetes sobre a reprodução masculina, isso devido a esses animais exibirem severos déficits na função reprodutiva, que são similares aos observados no homem diabético (HASSAN et al.,1993). As alterações reprodutivas em ratos que recebem o tratamento de indução do diabetes com estreptozotocina incluem; diminuição no peso dos órgãos reprodutivos, diminuição nos níveis das gonadotropinas e baixos níveis plasmáticos da testosterona (BUCHOLTZ et al., 2003; CAGNON et al., 2000; JACKSON et al., 1984; TANAKA et al., 2000; SUDHA et al.,1999). O rato diabético apresenta também menor responsividade ao “feed back” negativo da testosterona, já a resposta hipofisária à estimulação com GNRH, aparentemente não é afetada pelo diabetes (STEGER, 1990).

Steger (1989), levantou a hipótese de que o foco da ação do diabetes mellitus, provavelmente seria ao nível de hipotálamo ou em nível de SNC, logo com isso ocorreria uma redução da liberação de GNRH. Esse mesmo autor, concluiu, que as alterações na secreção das gonadotropinas, aparentemente, se devem a uma diminuição na liberação de GNRH, provavelmente devido a uma secundária diminuição no metabolismo da noroepinefrina no hipotálamo.

Bucholtz et al. (2000) demonstrou indícios que a insulina é capaz de modular a secreção de LH e de estimular a produção de esteróides. Com isso, esse mesmo autor levantou a hipótese de que o hipoinsulinismo observado no diabetes contribua para a diminuição dos níveis sericos de LH e de testosterona.

Seethalakshmi et al. (1987) demonstrou experimentalmente que ratos diabéticos apresentam uma redução significativa do peso testicular, da motilidade espermática e da contagem dos espermatozóides. Esse mesmo autor encontrou, diminuições dos níveis séricos de testosterona, mostrando ainda, experimentalmente, alterações na espermatogênese em ratos diabéticos. Cameron et al., 1985 realizou biópsia testicular e examinou a morfologia testicular de ratos e homens diabéticos, detectando aumento na espessura da parede tubular e repleção das células germinativas. Atlay (2003), acredita que provavelmente a neuropatia

diabética provoque uma falência testicular secundária, e ainda sugere, que a neuropatia diabética cause anormalidades em receptores hormonais, sendo assim responsável por alterações funcionais no hipotálamo e na adenohipófise. Análises testiculares em homens diabéticos demonstraram uma diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, hialinização das paredes tubulares, oclusão do lúmen por debris celulares, vacuolização das células de Sertoli e Leydig, alterações microvasculares e invasão de colágeno extracelular no compartimento intersticial testicular (CAMERON et al., 1985).

Alguns experimentos vêm demonstrando a ocorrência de alterações neuro-endócrinas no eixo hipotálamo, hipófise e gônadas, tanto em homens como em ratos diabéticos. Segundo Seetialakshmi et al. (1987), o diabetes mellitus em ratos, além de induzir a uma significativa diminuição do peso corpóreo, também leva a diminuição do peso dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimo, próstata e vesículas seminais) e diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, da contagem de espermatozóides, da motilidade espermática, dos níveis séricos de FSH, LH e testosterona. Seethalakshmi et al. (1987), testaram três tipos diferentes de tratamento no rato diabético. Um grupo de animais diabéticos recebeu insulinoterapia isolada, outro grupo recebeu administrações de testosterona exógena e o último grupo recebeu um tratamento realizado com uma associação de insulina e testosterona. Com esse estudo, esses autores observaram que os ratos diabéticos que receberam insulinoterapia isolada, demonstraram reversão do peso corpóreo, do diâmetro dos túbulos seminíferos, da contagem de espermatozóides, da motilidade espermática, dos níveis séricos de FSH, LH e testosterona e, por fim, apresentaram também reversão do peso dos órgãos reprodutivos, com exceção da próstata. Os ratos diabéticos que receberam a associação de insulina e testosterona, apresentaram praticamente os mesmos resultados obtidos nos animais que receberam a insulinoterapia isolada. Houve apenas uma diferença entre esses dois grupos estudados; no tratamento com a associação da insulina e testosterona, observou-se reversão do peso prostático, enquanto que, no tratamento com a insulinoterapia isolada não foi observada reversão dessa alteração. Os animais que receberam apenas testosterona exógena, não apresentaram ganho de peso significativo, não ocorreu reversão da motilidade espermática e nem dos baixos níveis de LH e FSH. Porém, esse grupo apresentou reversão do peso dos órgãos reprodutivos, inclusive da próstata, do diâmetro dos túbulos seminíferos e contagem

do número de espermatozóides. Ainda, segundo esses autores, permanecem inconclusivos, se as alterações no peso dos órgãos reprodutivos causada pelo diabetes, ocorre devido a alterações no metabolismo da glicose ou devido à diminuição dos hormônios androgênios. Eles promoveram cultura de células hipofisárias de ratos diabéticos, e mostraram que a secreção de gonadotropinas in vitro, foi significativamente menor nos animais diabéticos do que nos animais normais. Promoveram também estimulação de GNRH na cultura de células hipofisárias, com isso, a secreção de gonadotropinas aumentaram no grupo controle (animais sadios), porém essa mesma estimulação com o GNRH sobre a cultura de células hipofisárias de ratos diabéticos, não levou ao aumento da secreção das gonadotropinas. Com todas essas observações, concluíram, que ocorre uma diminuição da resposta hipofisárias ao GNRH em ratos diabéticos. Assim, essas últimas informações sugerem que provavelmente os ratos diabéticos desenvolvam uma disfunção hipofisária secundária ao diabetes mellitus e com isso observam-se alterações no eixo neuro-endócrino hipotálamo, hipófise e gônadas. Provavelmente, essa disfunção hipofisária induzida pelo diabetes mellitus, seja responsável pelas alterações reprodutivas encontradas nos ratos diabéticos.

Alterações na função sexual e reprodutiva são freqüentemente associadas com o diabetes mellitus, tanto em homens como em animais experimentais (CALVO et al., 1982). Foram observadas em ratos diabéticos significativas reduções de noroepinefrina e mudanças no metabolismo da dopamina em regiões cerebrais envolvidas com a regulação da libido e com a secreção de gonadotropinas (STEGER, 1990). Este autor demonstrou, que o diabetes mellitus está associado com marcadas reduções na libido nos machos, acompanhados com mudanças nos níveis plasmáticos hormonais e com alterações no “feed back” hipotalámico.

O diabetes mellitus induzida pela estreptozotocina resulta em reduções dos níveis séricos de testosterona, porém esse fato isolado não parece ser o responsável pela diminuição da libido, pois Steger (1990), administrou testosterona em animais diabéticos e notou que não houve reversão do comportamento sexual. Com isso, supôs que, os ratos diabéticos provavelmente apresentem essa diminuição de libido devido a uma diminuição na resposta da testosterona secundária a alterações nos receptores esteróides.

Steger (1990), observou, que os ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina apresentaram uma redução no metabolismo da dopamina ao nível

de hipotálamo anterior e com essas informações supôs que alterações no metabolismo das catecolaminas no hipotálamo anterior, talvez sejam responsáveis pelas mudanças no comportamento sexual (libido) de ratos com diabetes mellitus. Demonstrou também que os ratos com diabetes mellitus que recebem insulinoterapia apresentam reversão da diminuição do metabolismo da dopamina no hipotálamo anterior e com isso, tiveram uma reversão completa do comportamento sexual (libido).

A inibina é uma molécula de proteína, produzida pelas células de Sertolli, que possui subunidades que estão ligadas por pontes dissulfito. Uma alfa – subunidade com peso molecular de cerca de 18.000 daltons, que é comum a ambas as formas de inibina (inibina A e inibina B) e uma beta – subunidade que varia em peso molecular de 13.000 até 14.700 (SALARDI et al., 2002). A inibina produzida nos testículos age nas células hipofisárias, (Gonadotrópicos), suprimindo a secreção de FSH (ANDERSSON et al., 1998; KISHI et al., 2000), portanto a alta atividade da célula de Sertolli está relacionada às concentrações baixas de FSH, logo um dos sinais de que o processo espermatogénico está diminuído; pelo menos no que concerne á atividade da célula de Sertolli, é um elevado nível de FSH no macho (SWENSON; REECE; DUKES, 1996).

Buzzaard et al. (2004) observaram, que a Inibina B é a forma predominante na circulação sanguínea e logo é a forma mais produzida pelos testículos. Portanto, uma das hipóteses levantadas, é de que a Inibina A possui, predominantemente, uma função parácrina, atuando no próprio testículo e tendo como principal função, suprimir o numero de espermatogônias. Quanto a Inibina B (forma predominantemente na circulação sanguínea) é a forma de Inibina mais produzida pelas células de Sertolli e tem como principal função inibir a secreção hipofisária de FSH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo analisou se as alterações fisiopatológicas decorrentes do diabetes mellitus são capazes de alterar a função reprodutiva de ratos machos. Considerando que o rato macho atinge a puberdade aos 50 dias de vida, foram utilizados 27 ratos Wistar, machos com 98 dias de vida, oriundos do Biotério da FMVZ-USP. Essas alterações, uma vez constatadas, foram estudadas, na tentativa de tentar compreender os seus mecanismos fisiopatológicos.

Os animais foram pesados e divididos em três grupos, respectivamente, Grupo A (GA) – Grupo controle constituído de 10 ratos Wistar sadios; Grupo B (GB) – constituído de oito ratos Wistar, com diabetes mellitus induzida quimicamente, através, da administração intraperitonial de estreptozotocina, 65mg/kg (SEETHALAKSHMI; MENON; DIAMOND, 1987). Grupo C (GC) - constituído de nove ratos Wistar, com diabetes mellitus induzida quimicamente, através, da administração intraperitonial de estreptozotocina, 65mg/kg, com administração de insulina NPH 3 UI/Rato (SEETHALAKSHMI; MENON; DIAMOND, 1987).

Os animais pertencentes aos grupos GB e GC foram avaliados no que diz respeito à condição diabética, 48 horas após a aplicação de estreptozotocina, foi realizado a mensuração dos níveis séricos de glicose e somente os animais que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dl foram incluso no experimento, os demais ratos foram descartados.

Todos os animais do experimento foram pesados a cada quatro dias para avaliação da evolução da massa corporal. Após passados quatro dias da aplicação da estreptozotocina, os animais pertencentes ao GC foram tratados com insulina (3UI/rato/dia), durante 42 dias ver figura 1, para verificar se a insulinoterapia por si só foi capaz de amenizar ou até mesmo impedir as alterações fisiopatológicas decorrentes do diabetes mellitus. Depois de terminado o experimento (46 dias após a administração da estreptozotocina), todos os ratos (GA/GB/GC) foram pesados e sacrificados por administração de ultradose de tiopental intraperitonial. Procedeu-se

então, as avaliações das possíveis alterações de peso corpóreo, peso dos testículos e dosagens dos níveis séricos de testosterona, FSH e inibina B.

Figura 1 – Administração de insulina por via subcutânea. São Paulo – São Paulo – 2006

Os testículos foram removidos e pesados para determinação do peso úmido ver figura 2.

Figura 2 – Exposição e extração testicular. São Paulo – São Paulo – 2006

4.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA E FSH

As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, e as dosagens de testosterona foram determinadas a partir do soro pelo método de radioimunoensaio (kits DPCMEDLAB®).

As dosagens de FSH foram determinadas a partir do soro pelo método de EIA (kits ALPCO®).

Foram realizadas avaliações em duplicata para obter uma melhor precisão nos resultados (diminuição das margens de erros).

4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE SÉRICOS DE INIBINA B

As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca, e as dosagens de Inibina B foram determinadas pelo método de enzimaimunoensaio (ELISA – Kits DSL - GENESIS®).

Foram realizadas avaliações em duplicata para obter uma melhor precisão nos resultados (diminuição das margens de erros).

4.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GLICOSE

As amostras para a realização da mensuração de glicemia foram obtidas através de picotes realizados na região distal da cauda dos animais ver figuras 3 e 4.

Figura 3 – Coleta de sangue, através de picote de cauda. São Paulo – São Paulo - 2006

Figura 4 – Administração de anti-séptico na cauda do animal. São Paulo – São Paulo – 2006

A dosagem dos níveis séricos de glicose ver figuras 5 e 6, foram realizadas a partir de sangue total e mensurados pelo aparelho ACCU-CHEK ADVANTAGE© (Roche Diagnostics©, SP, Brasil).

Figura 5 – Dosagem de glicemia São Paulo – São Paulo – 2006

Figura 6 – Leitura da glicemia pelo monitor. São Paulo – São Paulo – 2006

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows, 2000.

Através do aplicativo Guided Data Analisys, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logaritmo na base 10 - $Log_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados os desvios padrões e as médias (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária à transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta. As variáveis classificatórias utilizadas foram Dias (para peso e glicemia) e tratamentos (A= controle; B= diabetes induzida; C= diabetes induzida associada a insulinoterapia; para todas as variáveis). As variáveis resposta avaliadas foram peso corpóreo, glicemia, peso testicular, níveis séricos de inibina, testosterona e FSH.

As variáveis peso e glicemia foram submetidas ao PROC MIXED de medidas repetidas no tempo. Para isso, primeiramente foi analisado o efeito da interação tempo (Dias) e tratamentos (A, B e C). Na presença de interação, as variáveis foram analisadas avaliando-se o efeito do tratamento dia a dia ou do tempo (Dia) em cada um dos tratamentos.

Na análise das variáveis peso testicular e concentrações sérica de inibina, testosterona e FHS, foi utilizado o PROC GLM, utilizando-se o teste de Duncan para verificar diferenças entre os tratamentos A, B e C.

As variáveis respostas peso corpóreo, glicemia, peso testicular e níveis séricos de inibina e FSH obedeceram às premissas. A variável resposta níveis séricos de testosterona não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo de seus valores na base 10.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O benefício do presente trabalho foi constatar experimentalmente algumas alterações reprodutivas relacionadas ao macho, decorrentes do diabetes mellitus e conseguintemente avaliar se a insulinoterapia, foi capaz de impedir ou ao menos amenizar o aparecimento das mesmas. Foi encontrada interação entre tempo (Dias) e tratamentos (A, B e C) tanto para peso ($p<0,0001$) como para glicemia ($p<0,0001$). Sendo assim, estas variáveis foram analisadas verificando o efeito do tempo (Dias) em cada um dos tratamentos e o efeito dos tratamentos dia a dia. Os resultados dos pesos corpóreos dos três grupos estudados estão listadas na tabela 1.

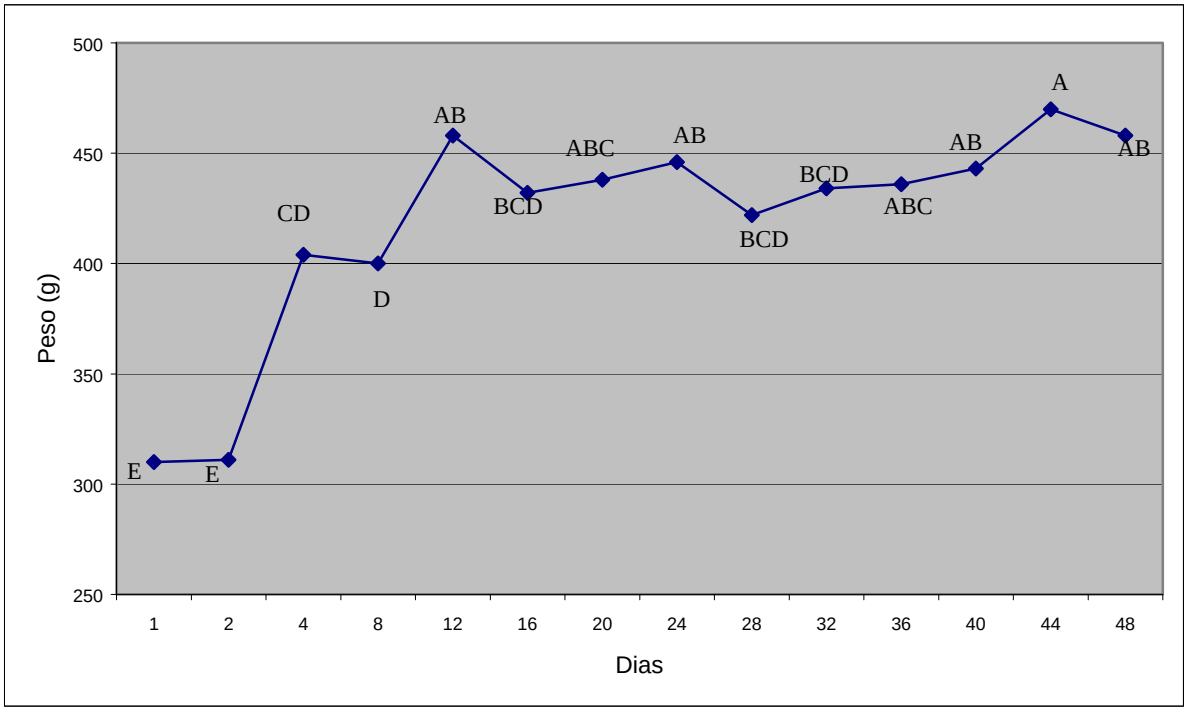
Tabela 1 – Curva de ganho de peso (gramas) dos animais dos grupos controle (A), diabéticos (B) e diabéticos submetidos a insulinoterapia (C), durante 48 dias em ratos Wistar machos (98 dias de idade) – São Paulo – São Paulo - 2005-2006

	Tratamentos x Peso Corpóreo		
Dias	**A**	**B**	**C**
1	$310,0 \pm 11,15^{E}$	$313,75 \pm 16,03$	$343,33 \pm 6,67^{FG}$
2	$311,0 \pm 10,59^{E}$	$312,5 \pm 11,46$	$323,33 \pm 5,0^{H}$
4	$404,0 \pm 8,97^{a,CD}$	$313,75 \pm 16,36^{b}$	$323,33 \pm 5,53^{b,GH}$
8	$400,0 \pm 7,89^{a,D}$	$323,75 \pm 11,64^{b}$	$351,11 \pm 8,24^{c,EF}$
12	$458,0 \pm 10,20^{a,AB}$	$313,75 \pm 11,17^{b}$	$371,11 \pm 6,76^{c,DE}$
16	$432,0 \pm 11,33^{a,BCD}$	$315,0 \pm 9,82^{b}$	$384,44 \pm 10,42^{c,CD}$
20	$438,0 \pm 10,52^{a,ABC}$	$325 \pm 12,39^{b}$	$413,33 \pm 5,77^{a,AB}$
24	$446,0 \pm 10,46^{a,AB}$	$312,5 \pm 10,65^{b}$	$400,0 \pm 7,26^{c,BC}$
28	$422,0 \pm 11,72^{a,BCD}$	$280 \pm 9,26^{b}$	$376,67 \pm 9,72^{c,D}$
32	$434,0 \pm 9,91^{a,BCD}$	$302,5 \pm 17,09^{b}$	$424,44 \pm 10,42^{a,AB}$
36	$436,0 \pm 9,80^{a,ABC}$	$302,5 \pm 17,09^{b}$	$423,33 \pm 10,27^{a,AB}$
40	$443,0 \pm 10,65^{a,AB}$	$295 \pm 17,42^{b}$	$427,78 \pm 8,30^{a,A}$
44	$470,0 \pm 13,82^{a,A}$	$278,75 \pm 15,52^{b}$	$421,11 \pm 5,64^{c,AB}$
48	$458,0 \pm 15,04^{a,AB}$	$287,5 \pm 15,44^{b}$	$423,33 \pm 7,45^{a,AB}$

a, b, c Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos em cada dia (Duncan, $p<0,05$)

A, B, C, D, E, F, G Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os dias, em cada tratamento (Duncan, $p<0,05$)

Através dos resultados de peso corpóreo obtido nesse experimento, observamos que os animais do grupo controle (GA), estavam em fim de crescimento, sendo que se observou ganho de peso até o dia 12. A partir do dia 12, o peso se manteve constante, caracterizando um platô. Isto indicaria que os animais atingiram seu crescimento corpóreo total (Gráfico 1). Já o grupo B não apresentou ganho ou perda de peso estatisticamente significante durante todo o período experimental (Gráfico 2). Os animais diabéticos tratados com insulina (GC) por sua vez, apresentaram um ganho de peso que durou até o dia 20, sendo que, com exceção de uma queda no dia 28, se manteve constante até o final do experimento (Gráfico 3).



A, B, C Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os dias nos animais do tratamento A (Duncan, p<0,05)

Gráfico 1 – Curva de ganho de peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) pertencentes ao grupo controle (Grupo A). Efeito dos dias sobre o peso dos animais a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 - 2006

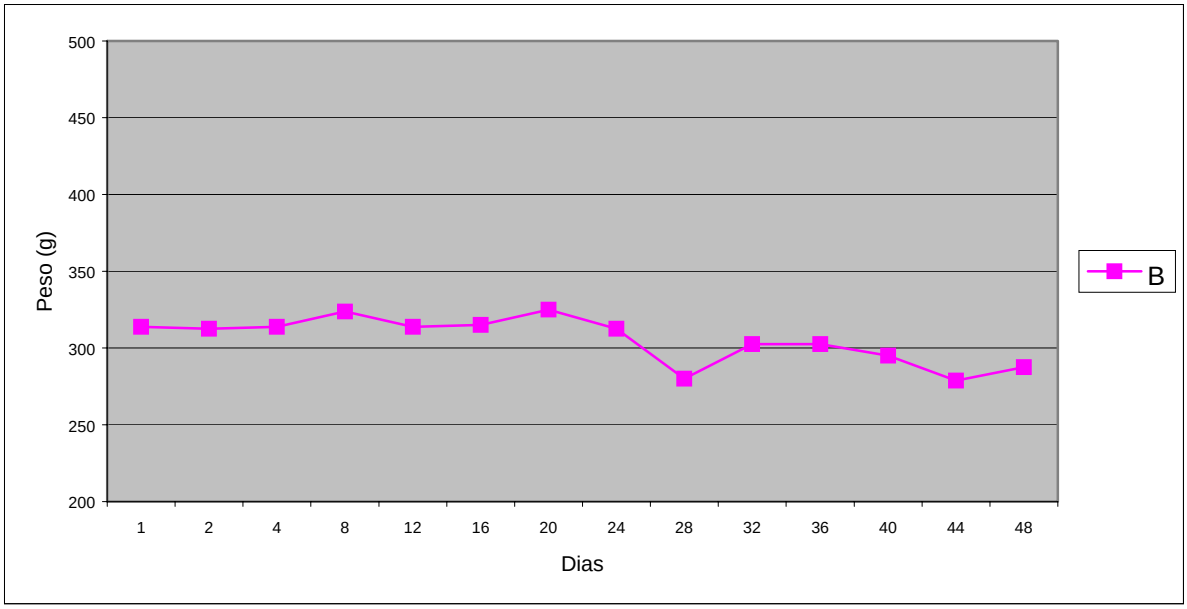
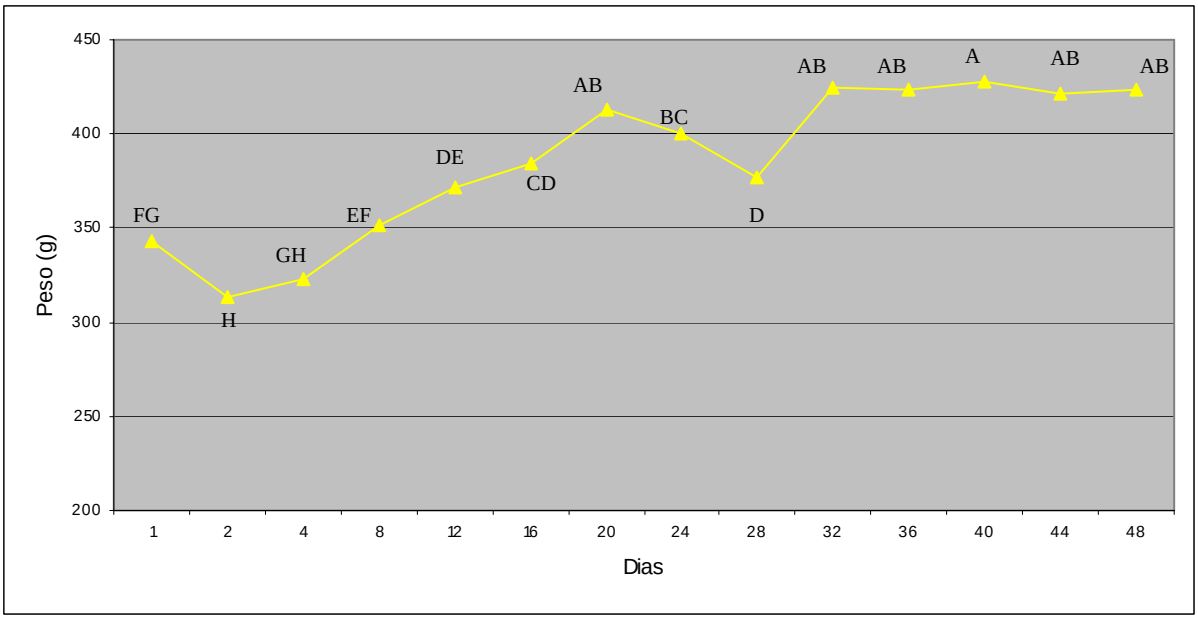


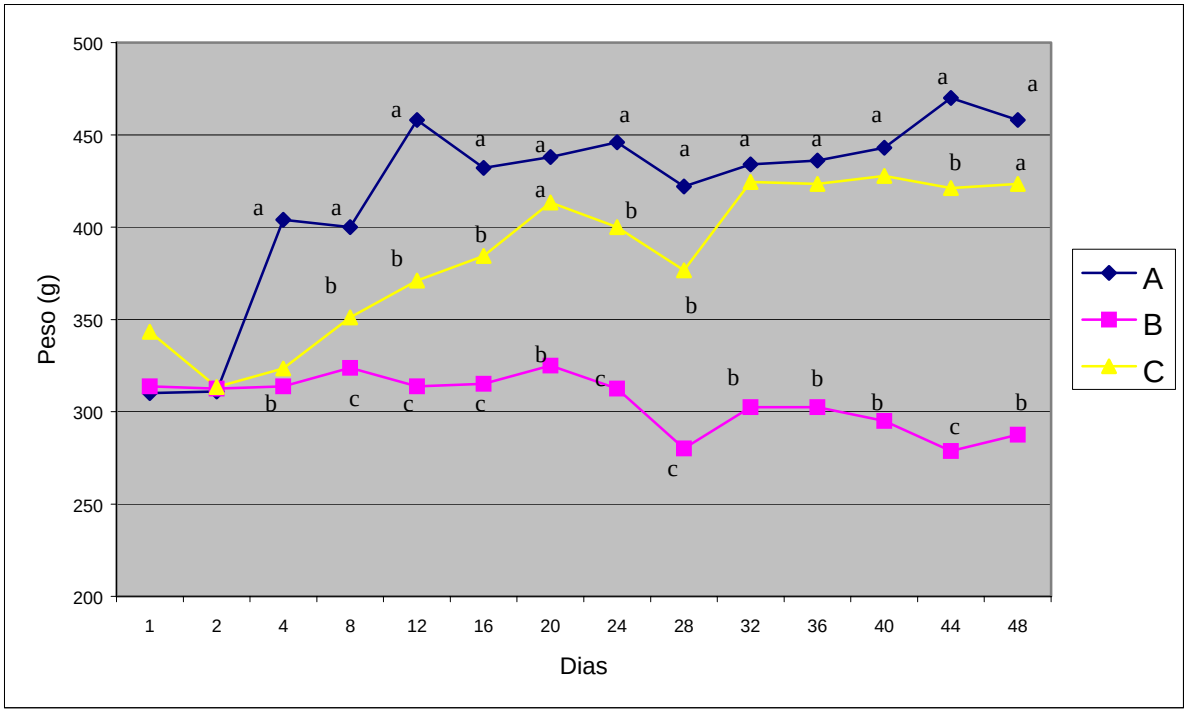
Gráfico 2 – Curva de ganho de peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) pertencentes ao grupo com diabetes induzida através de estreptozotocina (Grupo B). Efeito dos dias sobre o peso dos animais a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006



A, B, C, D, E, F, G Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os dias nos animais do tratamento C (Duncan, p<0,05)

Gráfico 3 – Curva de ganho de peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) pertencentes ao grupo com diabetes induzida através de estreptozotocina e submetidos a insulinoterapia (Grupo C). Efeito dos dias sobre o peso dos animais a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006

Na comparação do efeito dos tratamentos dia a dia, pode se verificar que o grupo diabético (GB), em comparação ao grupo controle, não apresentou ganho de peso corpóreo, sendo que a partir do dia 4 já se observa um déficit em relação ao grupo controle, déficit este que se manteve até o final do período experimental. Por fim, os animais diabéticos que não receberam insulinoterapia (GB), demonstraram ausência de crescimento corporal quando comparados com os grupos A e C. Ao se comparar o grupo B e C, observa-se também um ganho de peso estatisticamente maior no grupo C a partir do dia 8, sendo que também neste caso, os níveis permaneceram diferentes até o final do experimento. Na comparação entre os grupos A e C, observa-se que houve uma menor velocidade, ou um atraso do ganho de peso no grupo C quando comparado aos animais controle, sendo que apenas a partir do dia 20 os pesos apresentaram semelhança. Neste caso, a partir deste dia, excetuando-se os dias 24, 28 e 44, não foi possível verificar diferenças estatísticas entre os grupos A e C, mostrando que a insulinoterapia conseguiu impedir nos animais do grupo C a ausência de crescimento corporal observada nos animais do grupo B, porém a insulinoterapia não foi capaz de impedir o atraso no crescimento corpóreo observado nos animais do grupo C nos primeiros 20 dias do experimento. Verificou-se nesse caso, que além deste atraso no crescimento, a maioria dos dias em que foi mensurado o peso, os animais apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Além disto, em nenhum momento, as médias encontradas nos animais do grupo C foram numericamente comparáveis ao grupo A. Isto indicaria que caso o numero de animais utilizados fosse ligeiramente aumentado, talvez fosse possível verificar as diferenças estatísticas entre os grupos A e C, semelhante às diferenças encontradas nos níveis glicemicos. Porém, não foi possível provar diferenças estatísticas entre os grupos A e C no presente experimento (Gráfico 4).



a, b, c Letras diferentes em um mesmo dia indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos em cada dia (Duncan, p<0,05)

Gráfico 4 – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre o peso de ratos Wistar machos (98 dias de idade) a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 - 2006

Enfim, quando comparados os resultados de peso corpóreo dos três grupos, do inicio ao término do experimento ver figura 7, considerando mesma dieta (ração comercial), espécie, raça e idade, pode-se concluir que o diabetes causa uma ausência de crescimento corporal significativa, conforme observado nos animais diabéticos do Grupo B, porém os resultados obtidos a partir dos animais do Grupo C demonstraram que a insulinoterapia impediu essa ausência de crescimento corporal. É importante ressaltar que a insulinoterapia instituída nesses animais não foi capaz de impedir o atraso no crescimento corpóreo observados nos animais do grupo C nos primeiros vinte dias do experimento.

Figura 7 – Comparação do Animal saudável (esquerda), animal diabético com insulinoterapia (meio), com animal diabético sem insulinoterapia (direita). Observar diferença em relação à massa corpórea (Quadragésimo oitavo dia). São Paulo – São Paulo – 2006.

No que tange as alterações de peso corpóreo encontradas nesse experimento, conclui-se que, a ausência de crescimento corpóreo observada nos animais diabéticos (GB) seja decorrente da deficiência grave de insulina que, resulta em mobilização de substratos do músculo (aminoácidos, lactato e piruvato) e do tecido adiposo (AGL e glicerol) para o fígado, aonde são ativamente convertidos em glicose através da gliconeogenese, tendo como resultado final à hiperglicemia, perda de peso corpóreo ou diminuição da formação de massa muscular e de tecido adiposo (SHERWIN, 1997).

Os resultados dos níveis séricos de glicose dos três grupos estudados, estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 – Curva de glicemia (mg/dl) de animais dos grupos controle (A), diabéticos (B) e diabéticos submetidos a insulinoterapia (C), durante 48 dias em ratos Wistar machos (98 dias de idade) – São Paulo – São Paulo - 2005-2006

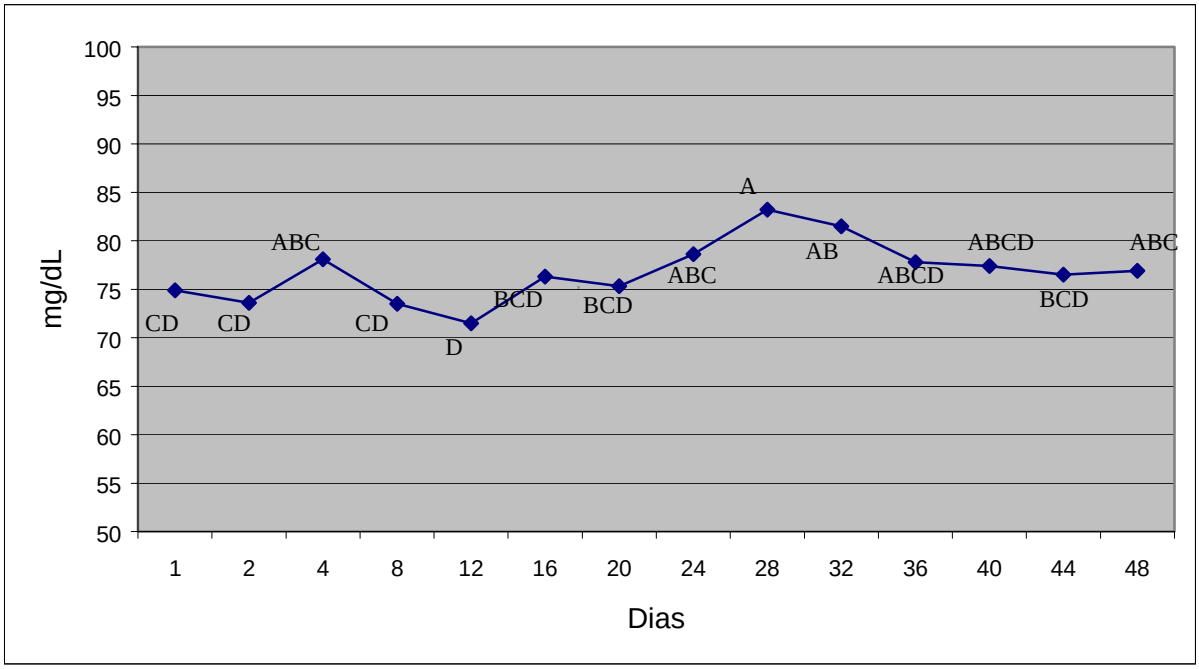
	Tratamentos X Glicemia		
Dias	**A**	**B**	**C**
1	$74{,}90 \pm 3{,}17^{CD}$	$83{,}87 \pm 2{,}90^{E}$	$76{,}33 \pm 1{,}5^{F}$
2	$73{,}60 \pm 2{,}52^{CD}$	$82{,}25 \pm 3{,}36^{E}$	$75{,}00 \pm 1{,}83^{F}$
4	$78{,}10 \pm 2{,}46^{a,ABC}$	$433{,}25 \pm 56{,}45^{b,ABC}$	$358{,}78 \pm 19{,}47^{b,B}$
8	$73{,}50 \pm 1{,}11^{a,CD}$	$371{,}12 \pm 28{,}33^{b,BCD}$	$422{,}22 \pm 28{,}77^{b,A}$
12	$71{,}50 \pm 1{,}39^{a,D}$	$358{,}75 \pm 18{,}83^{b,CD}$	$391{,}89 \pm 18{,}40^{b,AB}$
16	$76{,}30 \pm 1{,}43^{a,BCD}$	$383{,}62 \pm 17{,}73^{b,ABCD}$	$235{,}33 \pm 25{,}50^{c,CD}$
20	$75{,}30 \pm 1{,}97^{a,BCD}$	$325{,}50 \pm 23{,}23^{b,D}$	$180{,}44 \pm 28{,}28^{c,DE}$
24	$78{,}60 \pm 1{,}27^{a,ABC}$	$370{,}75 \pm 24{,}06^{b,BCD}$	$157{,}33 \pm 11{,}08^{c,E}$
28	$83{,}20 \pm 1{,}36^{a,A}$	$380{,}75 \pm 20{,}49^{b,ABCD}$	$192{,}78 \pm 25{,}06^{c,CDE}$
32	$81{,}50 \pm 1{,}78^{a,AB}$	$432{,}62 \pm 28{,}25^{b,ABC}$	$224{,}56 \pm 14{,}16^{c,CD}$
36	$77{,}80 \pm 1{,}73^{a,ABCD}$	$412{,}75 \pm 31{,}46^{b,ABCD}$	$244{,}56 \pm 20{,}70^{c,C}$
40	$77{,}40 \pm 2{,}09^{a,ABCD}$	$451{,}62 \pm 33{,}09^{b,ABC}$	$216{,}11 \pm 12{,}67^{c,CD}$
44	$76{,}50 \pm 2{,}06^{a,BCD}$	$475{,}87 \pm 28{,}78^{b,A}$	$202{,}22 \pm 6{,}27^{c,CDE}$
48	$76{,}90 \pm 2{,}0^{a,ABC}$	$467{,}0 \pm 56{,}16^{b,AB}$	$215{,}78 \pm 10{,}14^{c,CD}$

a, b, c Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos em cada dia (Duncan, $p<0{,}05$)

A, B, C, Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os dias, em cada tratamento (Duncan, $p<0{,}05$)

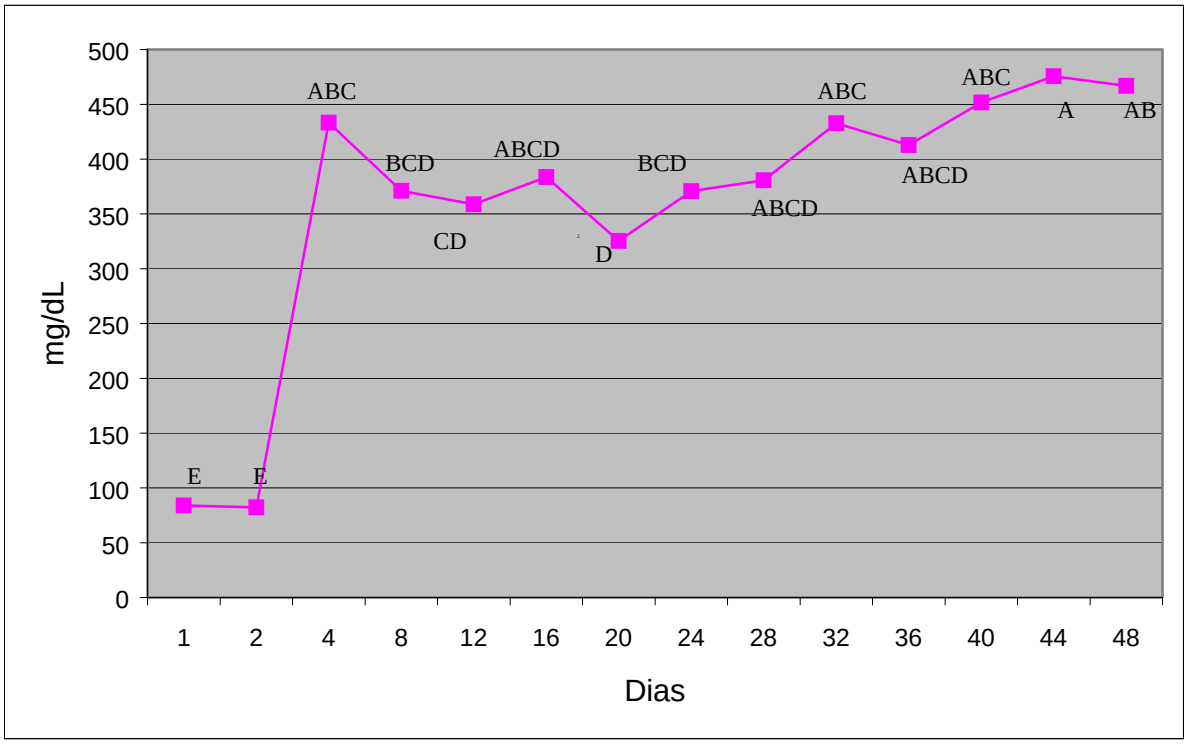
Através dos resultados de glicemia obtidos nesse estudo, observamos que os animais controle (GA) apresentaram níveis de glicemia relativamente constantes, com apenas alguns dias diferindo entre si. Sendo que apenas os dias 28 e 32 diferiram dos dois primeiros dias, considerados como basais para os animais de todos os grupos (Gráfico 5). Já os animais pertencentes ao grupo B, apresentaram níveis de glicemia semelhantes aos do controle nos dois primeiros dias, porém, no quarto dia do experimento, os animais pertencentes a esse grupo apresentaram um aumento abrupto da glicemia, que se manteve até o termino do experimento (Gráfico 6). Isto pode ser explicado, pois, a indução química da diabetes iniciou-se no

segundo dia, logo após a mensuração da glicemia. Os resultados indicaram que a aplicação da estreptozotocina foi eficiente para a indução do diabetes, sendo este efeito observado até o final do experimento.



A, B, C Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os dias nos animais do tratamento A (Duncan, p<0,05)

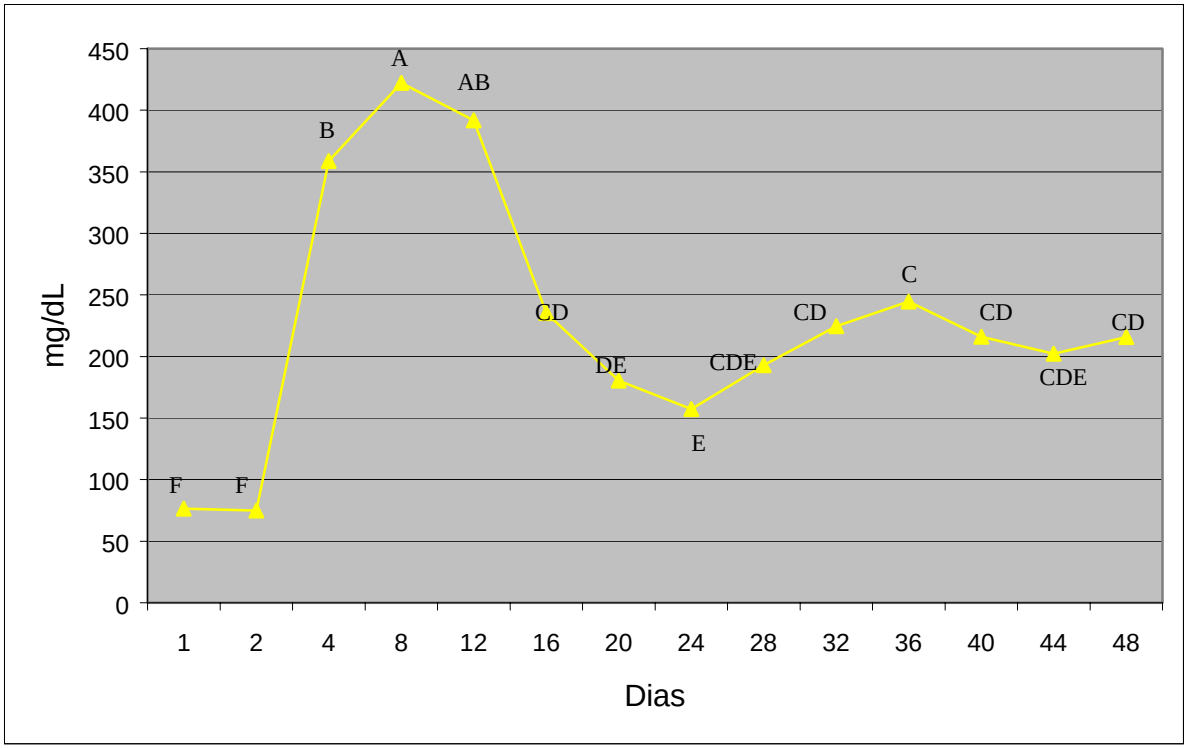
Gráfico 5 – Efeitos dos dias sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) normais (grupo A = controle) – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006



A, B, C Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os dias nos animais do tratamento B (Duncan, p<0,05)

Gráfico 6 – Efeitos dos dias sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) com diabetes induzida através de estreptozotocina (Grupo B) – São Paulo – São Paulo - 2005 - 2006

Os animais do grupo C apresentaram níveis de glicemia semelhantes aos do controle nos dois primeiros dias. A partir do quarto dia do experimento, os animais pertencentes ao grupo C apresentaram um aumento abrupto da glicemia, que se manteve até o décimo segundo dia do experimento. Isso pode ser explicado, pois, a indução química do diabetes nos animais do grupo C, assim como no grupo B, foi iniciada no segundo dia, logo após a mensuração da glicemia, sendo que a insulinoterapia só foi iniciada a partir do sexto dia. A partir do 16º dia observou-se um declínio da glicemia nos animais do grupo C, sendo que os níveis mantiveram-se abaixo dos níveis encontrados entre os dias 4 a 12 até o final do experimento. Isso indicaria que os efeitos da insulina, aplicada no dia 6, levaram cerca de 10 dias para provocarem a diminuição dos níveis de glicemia, sendo, porém eficientes para até o final do período experimental (Gráfico 7).

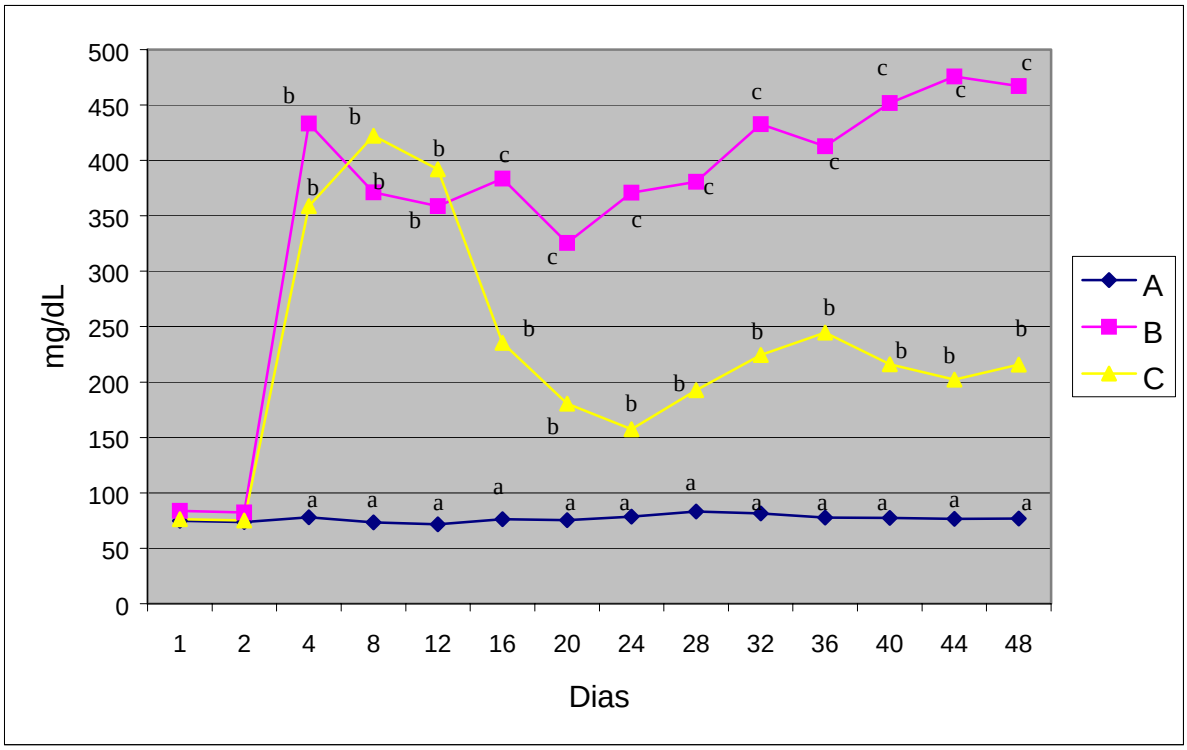


A, B, C Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os dias nos animais do tratamento C (Duncan, p<0,05)

Gráfico 7 – Efeitos dos dias sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) com diabetes induzida através de estreptozotocina e submetidos a insulinoterapia (grupo C) – São Paulo – São Paulo - 2005 - 2006

Comparando os três grupos dia a dia (Gráfico 8), verificamos que todos os grupos do experimento apresentaram níveis semelhantes de glicemia nos dois primeiros dias. A partir do quarto dia do experimento, observamos um aumento abrupto da glicemia dos animais dos grupos B e C. Isto pode ser explicado, pois, a indução da diabetes através da aplicação de estreptozotocina ocorreu apenas no segundo dia do experimento, sendo este efeito imediatamente observado nestes grupos. Os grupos B e C, apresentaram um perfil idêntico de glicemia até o décimo segundo dia. A partir do décimo segundo dia, os animais do grupo B mantiveram os níveis de glicemia constantes até o término do experimento. No entanto, a partir do décimo sexto dia, os animais do grupo C apresentaram uma queda dos níveis de glicemia em comparação ao grupo B (conseqüente a insulinoterapia), essa queda na glicemia, porém não chegou a ser suficiente para que o grupo C chegasse aos níveis glicemicos dos animais do grupo A. A queda de glicemia do grupo C indicou que a insulina foi eficiente para diminuir os níveis glicemicos de animais com

diabetes induzida. Porém, na dose administrada, tal dose não foi suficiente para levar os níveis glicêmicos à normalidade (situação comumente observada na rotina clínica).



a, b, c Letras diferentes na no mesmo dia indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos A, B e C (Duncan, p<0,05)

Gráfico 8 – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre a glicemia de ratos Wistar machos (98 dias de idade) a cada 4 dias, durante 48 dias – São Paulo – São Paulo - 2005 - 2006

Quanto aos resultados dos pesos testiculares (Tabela 3), foi verificado que os animais do grupo B demonstraram o menor peso testicular (média de peso testicular = 2,84 ± 0,41 gramas), quando comparados com os animais dos demais grupos (GA – média de peso testicular = 3,58 ± 0,15 gramas / GC – média de peso testicular = 3,36 ± 0,15 gramas). Ver figura 8.

Figura 8 – Comparação de tamanho testicular entre animal diabético sem insulinoterapia (esquerda) e animal saudável (direita), 48 dias após o início do período experimental. São Paulo – São Paulo – 2006.

Através da avaliação dos níveis séricos de testosterona (Tabela 3), foi constatado que os animais diabéticos do Grupo B, apresentaram níveis séricos de testosterona inferiores aos níveis observados nos animais normais (GA), sugerindo que ocorre uma diminuição na secreção de testosterona nos animais diabéticos (GB). Os valores de testosterona séricos obtidos a partir dos animais diabéticos com insulinoterapia (GC) se mostraram dentro dos padrões da normalidade quando comparados aos animais controles do Grupo A (Grupo C – média dos níveis de testosterona = 112,12 ± 16,98 ng/ml / Grupo A – média dos níveis de testosterona = 104,66 ± 22,87 ng/ml).

Os resultados obtidos através das dosagens de inibina B estão listados na tabela 3. Não foi possível verificar diferenças estatísticas entre os grupos A, B e C.

Através da avaliação dos níveis séricos de FSH (Tabela 3), foi constatado que os animais diabéticos do Grupo B, apresentaram níveis séricos de FSH inferiores aos níveis observados nos animais normais (GA), sugerindo que ocorre uma diminuição na secreção de FSH nos animais diabéticos (GB). Os valores de FSH obtidos a partir dos animais diabéticos com insulinoterapia (GC) se mostraram próximos, mas não iguais estatisticamente, aos valores de FSH dos animais controles do Grupo A.

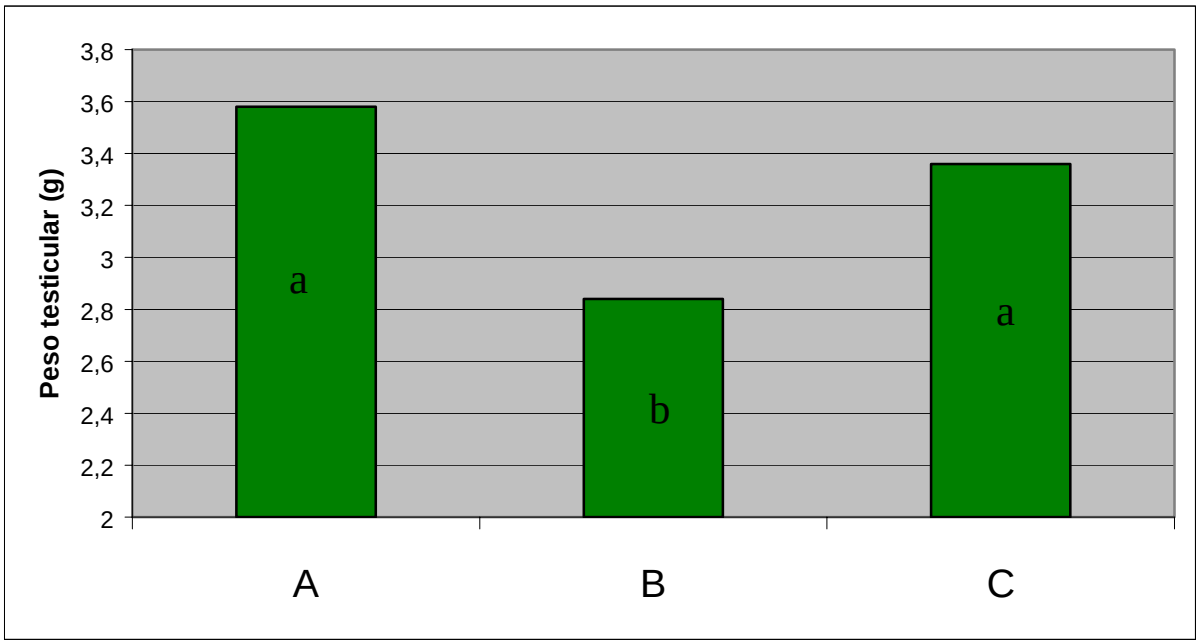
Tabela 3 – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) nas concentrações plasmática de inibina, testosterona e FSH e no peso testicular de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental. São Paulo – São Paulo – 2006

	A	**B**	**C**
Inibina (pg/mL)	54,28 ± 5,67	55,85 ± 9,74	42,46 ± 6,96
Peso testicular (g)	3,58 ± 0,15[a]	2,84 ± 0,41[b]	3,36 ± 0,15[a]
Testosterona (ng/mL)	104,66 ± 22,87[a]	67,85 ± 27,29[b]	112,12 ± 16,98[a]
FSH (ng/mL)	80,33 ± 0,75[a]	48,46 ± 0,48[b]	73,48 ± 0,99[c]

[a, b] Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (Ducan, $p<0,05$)

No que tange as alterações de peso testicular (Gráfico – 9), os resultados demonstraram que os animais diabéticos (GB), apresentaram uma média de peso testicular inferior aos animais dos outros grupos do experimento (GA – média de peso testicular = 3,58 ± 0,15 gramas / GB – média de peso testicular = 2,84 ± 0,41 gramas / GC – média de peso testicular = 3,36 ± 0,15 gramas). Através da avaliação comparativa entre os três grupos desse estudo, foi possível constatar que a insulinoterapia foi capaz de manter o peso e o tamanho testicular próximos da normalidade, pois nos animais diabéticos que receberam insulinoterapia (GC – média de peso testicular = 3,36 ± 0,15 gramas), observamos apenas uma discreta redução do peso testicular em relação aos animais do grupo controle (GA – média de peso testicular = 3,58 ± 0,15 gramas). Provavelmente o tamanho e o peso testicular se mostrou inferior nos animais diabéticos (GB), devido à ausência de

crescimento corpóreo e ou a diminuição dos níveis séricos de testosterona observada nesses animais.



[a, b] Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (Duncan, p<0,05)

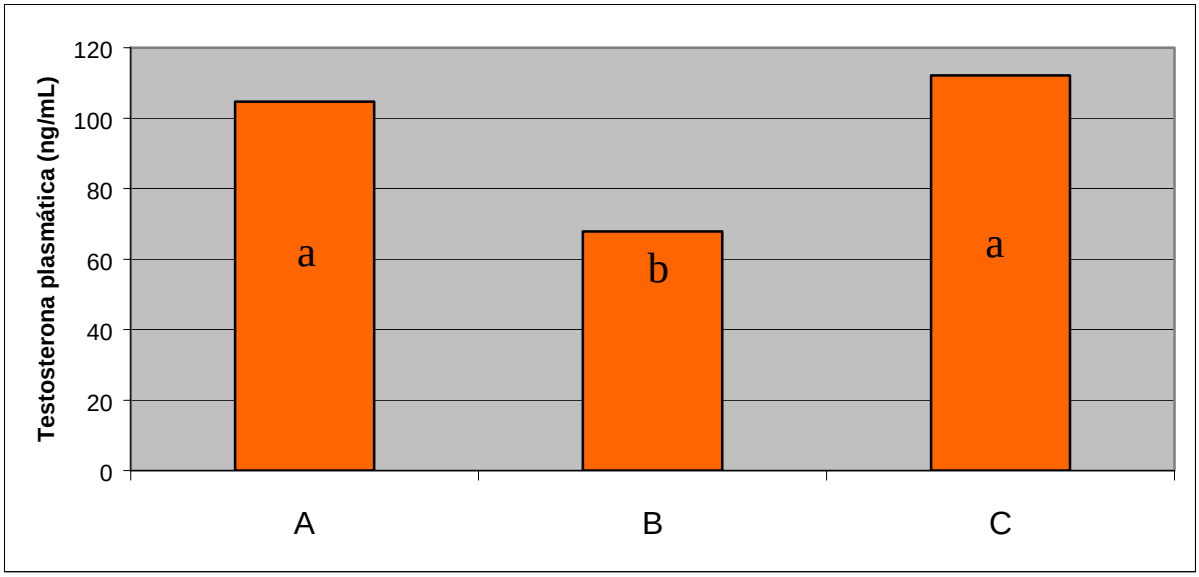
Gráfico 9 – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre o peso testicular de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006

Os animais diabéticos do presente trabalho apresentaram níveis séricos de testosterona (GB – 67,85 ± 27,29 ng/ml) bastante inferiores em relação aos animais controle (GA - 104,66 ± 22,87 ng/ml) e os animais diabéticos tratados com insulina (GC – 112,11 ± 16,98 ng/ml). (Gráfico 10).

Os mecanismos que levam a redução dos níveis séricos de testosterona nos ratos diabéticos ainda não foram cientificamente comprovados e ainda permanecem inconclusivos, porém um dos mecanismos pertinentes que possa explicar a diminuição dos níveis séricos de testosterona e a diminuição da função testicular, seria decorrente da ação direta da hiperglicemia sobre as células testiculares. É sabido que a hiperglicemia crônica observada no diabetes, desencadeia mecanismos de lesão celular (SHERWIN, 1997). O alto nível de glicose sanguínea aumenta a glicosilaçao não enzimática de proteínas, não apenas da hemoglobina como também das proteínas séricas, proteínas de membrana, as glicoproteinas de

baixa densidade (LDL), as proteínas dos nervos periféricos (tubulina) e as proteínas estruturais. Enfim a hiperglicemia crônica induz modificações disseminadas das proteínas celulares e estruturais que contribuem no comprometimento da função celular. Os produtos finais da glicosilaçao avançada (PFGA), se depositam nos tecidos levando a conseqüências funcionais adversas nas células (SHERWIN, 1997). Outro mecanismo bioquímico pelo qual a hiperglicemia pode comprometer a função celular, envolve a via do poliol, através da qual a glicose não fosforilada é reduzida a sorbitol pela aldose redutase. O acúmulo de sorbitol exerce efeitos osmóticos, podendo resultar em lesão celular. A ativação da via do poliol é regulada pela concentração intracelular de glicose, por conseguinte, varia de acordo com os níveis de glicose nos tecidos que não dependem de insulina, como por exemplo, os testículos (SHERWIN, 1997). Logo a diminuição dos níveis séricos de testosterona contatados nos ratos diabéticos desse experimento (GB), podem ser decorrentes de lesões nas células testiculares, conseqüentes da ativação dos mecanismos de lesão celular causado pela hiperglicemia crônica. Contudo observamos que a reposição de insulina através da administração exógena impediu a queda dos níveis de testosterona sérica (GC), contudo conclui-se que; é possível que a normalização dos níveis de glicemia seja capaz de amenizar ou talvez até impedir o aparecimento de lesões nas células testiculares nos pacientes diabéticos, mantendo dessa forma a produção de testosterona dentro dos padrões da normalidade. Porém outro mecanismo que explicaria a diminuição dos níveis de testosterona e diminuição da função testicular nos ratos diabéticos foi sugerido por Atlay et al. (2003). Segundo esse autor a neuropatia diabética, seria responsável por alterações funcionais no hipotálamo e hipófise, levando a uma falência testicular secundaria, decorrentes de disfunções no eixo neuroendócrino hipotálamo, hipófise e gônadas. Provavelmente a disfunção do eixo neuroendócrino hipotálamo, hipófise e gônadas induzida pelo diabetes leva a diminuição da resposta hipofisária ao GNRH, com diminuição da secreção de gonadotropinas (FSH e LH) e conseqüentemente diminuição da função testicular e diminuição da produção de testosterona. Bucholtz et al. (2000) demonstrou indícios que a insulina é capaz de modular a secreção de LH e de estimular a produção de esteróides, com isso esse mesmo autor levantou a hipótese de que o hipoinsulinismo observado no diabetes contribua para a diminuição dos níveis séricos de LH e de testosterona.

A testosterona produzida nas células de Leydig vai, desde o interstício que circunda as células de Leydig, para três áreas; vasos sanguíneos, vasos linfáticos ou túbulo seminífero. A maior parte da testosterona é transportada desde a célula de Leydig via sistema vascular sanguíneo. A presença de várias proteínas plasmáticas incluindo a globulina ligadora de hormônio sexual é importante não só para o transporte, mas também para a secreção de testosterona. Na ausência ou redução das proteínas plasmáticas ligadoras de testosterona, a produção de testosterona, diminui. Isso sugere que concentrações aumentadas de testosterona no interstício inibam a produção de testosterona (STABENFELDT; EDQVIST, 1996). Através das afirmações desses autores, podemos levantar, outra hipótese que possa contribuir para a explicação das baixas concentrações de testosterona observadas pacientes diabéticos. É sabido que pacientes diabéticos apresentam um aumento da glicosilaçao de proteínas (SHERWIN, 1997), logo se pressupõe que as concentrações de proteínas plasmáticas nesses pacientes estejam baixas, devido o alto consumo necessário para a alta taxa de glicosilaçao protéica. Contudo, segundo esses autores, pode-se levantar a hipótese de que pacientes diabéticos podem apresentar uma diminuição significativa das proteínas plasmáticas, conseqüentes à alta taxa de glicosilaçao protéica. Logo, a redução das proteínas plasmáticas resulta na em diminuição das proteínas ligadoras de testosterona, que por seguinte resultam em redução da produção de testosterona. Porém, para tornar essa hipótese verdadeira, será necessário mais estudos, acerca da fisiopatogenia do diabetes, envolvendo a comprovação da ligação dessa doença com a redução das proteínas plasmáticas e por seguinte redução da produção de testosterona.



[a, b] Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (Duncan, p<0,05)

Gráfico 10 – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre os níveis plasmáticos de testosterona de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006

Apesar da função hormonal das células de Leydig se mostrarem comprometida através da diminuição dos níveis séricos de testosterona nos animais diabéticos, a função hormonal das células de Sertoli parecem não sofrer alterações nos pacientes diabéticos, pois conforme os resultados obtidos neste experimento, os valores de inibina B demonstraram-se dentro da normalidade nos ratos diabéticos. (GB – média dos níveis séricos de inibina B = 55.85 ± 9,74 pg/ml) quando comparado aos animais controle (GA – média dos níveis séricos de inibina B = 54,28 ± 5,67 pg/ml). (Gráfico 11).

Apesar de termos observado nesse estudo que aparentemente o diabetes mellitus não afeta a função hormonal das células de Sertoli, é extremamente importante a realização de mais estudos que avaliem se o diabetes é capaz de provocar algum tipo de lesão nessas células e até que ponto a sua função pode ser comprometida por essa doença.

As células de Sertoli são importantes no controle do desenvolvimento das células germinativas, tanto a respeito da função nutritiva quanto da função reguladora (controle da passagem de moléculas). Além disso, a barreira

hematotesticular, formada principalmente pelos complexos “tight junctional” das células de Sertoli, tem como função a proteção das células haplóides. Como o espermatozóide se torna haplóide durante sua formação, ele não é reconhecido como “próprio” pelos mecanismos gerais de defesa do organismo (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

Ë sabido que a insulina protege o corpo contra a hipercalemia pela estimulação da entrada de potássio nos músculos e adipócitos. Portanto os pacientes diabéticos com hipoinsulinismo tendem a apresentar altos níveis de potássio no sangue (DICKSON, 1996). Todavia, em situações fisiológicas (animais sadios), as células de Sertoli secretam seletivamente íons de potássio para dentro do espaço abluminal, o potássio é importante nesse caso para a manutenção dos espermatozóides em um estado de quiescência, altas concentrações de potássio são inibidoras da motilidade espermática (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

Cameron ect al., 1985 realizou biópsia testicular e examinou a morfologia testicular de ratos e homens diabéticos, detectando diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, hialinização das paredes tubulares, oclusão do lúmen por debris celulares, vacuolização das células de Sertoli e Leydig, alterações microvasculares e invasão de colágeno extracelular no compartimento intersticial testicular (CAMERON et al., 1985).

Segundo Seetialakshmi et al. (1987), o diabetes mellitus em ratos, leva a diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, da contagem de espermatozóides e da motilidade espermática. Seethalakshmi et al. (1987), observaram que os ratos diabéticos que receberam insulinoterapia isolada e associação de insulina e testosterona, apresentaram reversão do diâmetro dos túbulos seminíferos e da motilidade espermática, já os ratos diabéticos que receberam apenas testosterona exógena, não apresentaram reversão da motilidade espermática. Porém, esse último grupo apresentou reversão do diâmetro dos túbulos seminíferos e contagem do número de espermatozóides.

Portanto considerando as afirmações de Stabenfeldt e Edqvist, 1996, sobre a função reguladora das células de Sertoli e a hipótese de que o diabetes pode causar alterações funcionais nas células de Sertoli, baseado nas alterações de histopatologia testicular de diabéticos observadas por Cameron et al., 1985, pode-se levantar uma nova hipótese que ajude a explicar a diminuição da motilidade

espermática demonstrada por Seetialakshmi et al. (1987). Logo, a diminuição da motilidade espermática em pacientes diabéticos, pode ser decorrente da associação entre a hipercalemia e diminuição da função reguladora das células de Sertoli. Contudo, são necessários mais estudos para avaliar se a função reguladora da célula de Sertoli é realmente afetada pelo diabetes.

A célula de Sertoli é também a principal fonte do líquido que é secretado para dentro do lúmen do túbulo seminífero (STABENFELDT; EDQVIST, 1996), logo alterações na função reguladora dessas células em diferentes níveis de gravidade, podem resultar na perda do controle da passagem de moléculas para dentro do lúmen do túbulo seminífero, podendo levar a alterações bioquímicas no líquido luminal. Alterações bioquímicas do líquido luminal podem afetar de diversas maneiras os espermatozóides, não só podendo levar ao comprometimento dos processos relacionados à fecundação como também podendo até gerar conseqüências diversas para os respectivos descendentes.

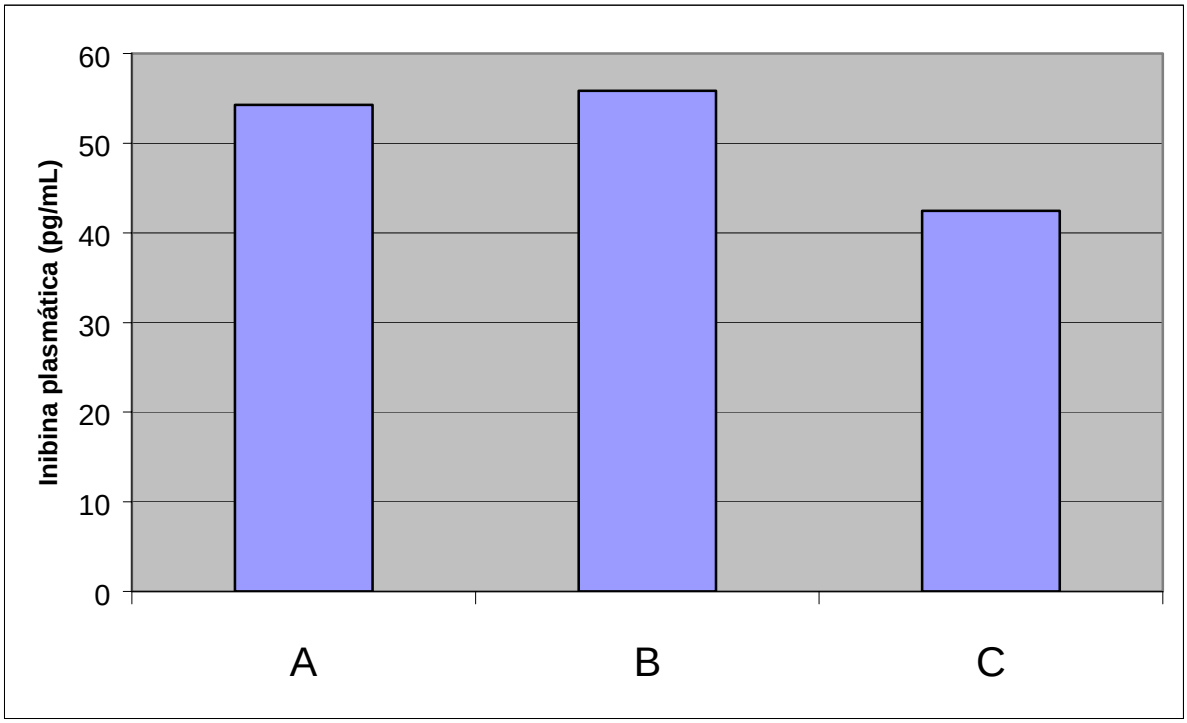
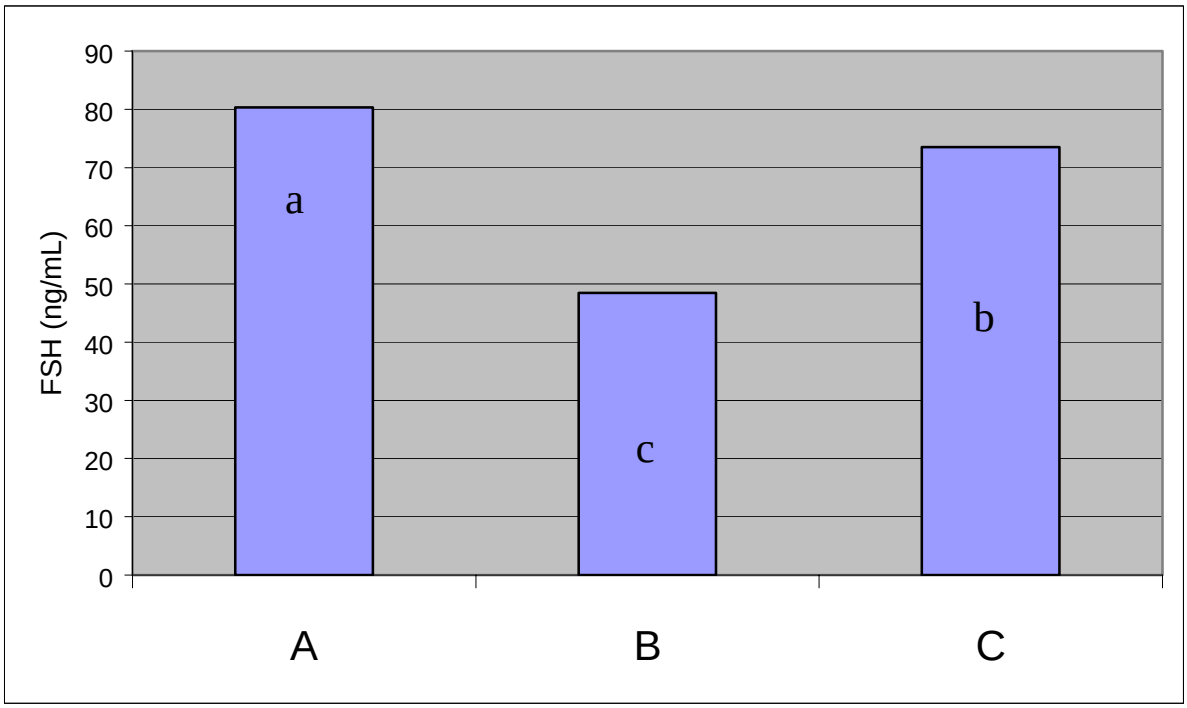


Gráfico 11 – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre os níveis de Inibina B de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006

Através da avaliação dos níveis séricos de FSH (Gráfico - 12), foi constatado que os animais diabéticos do Grupo B, apresentaram níveis séricos de FSH inferiores aos níveis observados nos animais normais (GA), sugerindo que ocorre uma diminuição na secreção de FSH nos animais diabéticos (GB). Conforme anteriormente observado por Seethalakshmi et al. (1987).

Os valores de FSH obtidos a partir dos animais diabéticos com insulinoterapia (GC) se mostraram próximos, porém estatisticamente inferiores, aos valores de FSH dos animais controles do Grupo A, indicando que a insulina não foi capaz de evitar a diminuição dos níveis de FSH de animais com diabetes induzida.



[a, b] Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (Duncan, p<0,05)

Gráfico 12 – Efeitos dos tratamentos A, B e C (controle, diabéticos e diabéticos submetidos a insulinoterapia, respectivamente) sobre os níveis plasmáticos de FSH de ratos Wistar machos (98 dias de idade), 48 dias após o início do período experimental – São Paulo – São Paulo - 2005 – 2006

Por fim os resultados obtidos neste estudo a partir da avaliação dos níveis séricos de Inibina B e FSH dos animais diabéticos sem insulinoterapia (GB), se tornam significativamente contraditórios. Pois o estímulo para a produção de inibina B pelas células de Sertoli dos testículos são principalmente altas concentrações sanguíneas de FSH, conseqüentemente, a inibina B produzida nos testículos age nas células hipofisárias, (Gonadotrópicos), suprimindo a secreção de FSH (ANDERSSON et al., 1998; KISHI et al., 2000), portanto a alta atividade da célula de Sertoli está relacionada às concentrações baixas de FSH, portanto um dos sinais de que o processo espermatogénico está diminuído; pelo menos no que concerne á atividade da célula de Sertoli, é um elevado nível de FSH no macho (SWENSON; REECE; DUKES, 1996).

Logo serão necessários mais estudos para compreendermos melhor o comportamento e os mecanismos de secreção desses dois hormônios nos animais diabéticos.

7 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que o diabetes mellitus leva ao aumento da glicemia, ausência de crescimento corpóreo, diminuição do peso e tamanho testicular e diminuição das concentrações séricas de testosterona e FSH. Porém através da avaliação dos níveis séricos de inibina B, foi constatado que o diabetes não promove nem redução, nem aumento das concentrações séricas desse hormônio.

Conclui-se também que a reposição exógena de insulina foi capaz de impedir a ausência de crescimento corpóreo, redução do peso testicular, diminuição dos níveis de testosterona e FSH, porém apesar da insulinoterapia ter impedido a ausência de crescimento corpóreo, não foi capaz de impedir o atraso no desenvolvimento corpóreo observado nos animais do grupo C (GC) nos primeiros vinte dias do experimento.

REFERÊNCIAS

ANDERSSON, A.; MULLER, J.; SKAKKEBAEK, E. N. Different roles of prepuberal and postpuberal germ cells and sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 12, p. 4451-4458, 1998.

ATLAY, B.; CETINKALP, S.; DOGANAVSARGIL, B.; HEKIMGIL, M.; SEMERCI, B. Streptozotocin-induced effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 2, p. 828-831, 2003.

BIRCHARD, J. S.; SHERDING, G. R. **Manual saunders clínica de pequenos animais**. Sao Paulo. Editora Roca Ltda,1998. p. 283-291.

BOLZÁN, D. A.; BIANCHI, S. M. Genotoxicity of streptozotocin, **Mutation Research,** v. 512, p. 121-134, 2002.

BUCHOLTZ, C. D.; CHIESA, A.; PAPPANO, N. W.; NAGATANI, S.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.; FOSTER, L. D. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin inthe diabetic male lamb. **Biology of Reproduction,** v. 62, p. 1248-1255, 2000.

BUZZARD, J. J.; LOVELAND, L. K.; O`BRYAN, K. M.; O`CONNOR, E. A.; BAKKER, M.; HAYASHI, T.; WREFORD, G. N.; MORRISON, R. J.; KRETSER, M. D. Changes in Circulating and Testicular Levels of Inhibin A and B and Activin A During Postnatal Development in the Rat. **The Endocrine Society**, v. 145, n. 7, p. 3532-3541, 2004.

BRENNA, O.; QVIGSTAD, G.; BRENNA, E.; WALDUM, H. L. Cytotoxicity of streptozotocin on neuroendocrine cells of the pancreas and the gut. **Digestive Diseases and Sciences,** v. 48, n. 5, p. 906-910, 2003.

CAGNON, V. H. A.; CAMARGO, A. M.; ROSA, R. M.; FABIANI, R.; PADOVANI, C. R.; MARTNEZ, F.E. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabets (C57BL/6J). **Tissue & Cell,** v. 32, n. 4, p. 275-283, 2000.

CAI, L.; CHEN, S.; EVANS, T.; DENG, X. D.; MUKHERJEE, K.; CHAKRABARTI, S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. **Urological Research,** v. 28, p. 342-347, 2000.

CALVO, C. J.; BARANAO, S. L. J.; TESONE, M.; CHARREAU, H. E. Hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in the streptozotocin-induced diabetic male rat. **Journal of Steroid Biochemistry ,** v. 20, n. 3, p. 769-772, 1982.

CAMERON, F. D.; MURRAY, T. F.; DRYLIE, D. D. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testis from impotent diabetic men. **The Anatomical Record,** v. 213, p. 53-62, 1985.

DICKSON, M. W. Glândulas Endócrinas In: SWENSON, J. M.; REECE, O. W.; **Dukes, fisiologia dos animais domésticos.** 11 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1996. p. 571 - 602 .

FAERMAN, I.; VILAR, O.; RIVAROLA, A. M.; ROSNER, M. J.; JADZINSKY, N. M.; FOX, D.; PEREZ, L. A.; BERNSTEIN-HAHN, L.; SACACENI, D. Impotence and diabetes: studies of androgenic function in diabetic impotent males. **Diabetes,** v. 21, n. 1, p. 23-30, 1972.

HASSAN, A. A.; HASSOUNA, M. M.; TAKETO, T.; GAGNON, C.; ELHILALI, M. M. The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. **The Journal of Urology,** v. 149, p. 148-154, 1993.

HERR, R. R.; JAHNKE, A. D.; ARGOUDELIS, A. D. The structure of Streptozotocin, **Journal of the American Chemical Society,** v. 89, p. 4808 – 4809, 1967.

HOSOKAWA, M.; DOLCI, W.; THORENS, B. Differential sensitivity of GLUT1 and GLUT2- expressing B cells to streptozotocin. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 289, p. 1114-1117, 2001.

JACKSON, L. F.; HUTSON, J. Altered responses to androgen in diabetic male rats. **Diabetes,** v. 33, p. 819-824, 1984.

KALTER, H. Reproductive toxicology in animals with induced and spontaneous diabetes. **Reproductive Toxicology,** v. 10, n. 6. p. 417-438, 1996.

KISHI, H.; ITOH, M.; WADA, S.; YUKINARI, Y.; TANAKA, Y.; NAGAMINE, N.; JIN, W.; WATANABE, G.; TAYA, K. Inhibin is an important factor in the regulayion of FSH secretion in the adult male hamster. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism,** v. 278, n. 4, p. 744-751, 2000.

KONRAD, J. R.; MIKOLAENKO, I.; TOLAR, F. J.; LIU, K.; KUDLOW, E. J. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic B-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-B-d-glucosaminidase. **The Biochemical Journal,** v. 356, p. 31-41, 2001.

KRINKE, J. G. **The handbook of experimental animals the laboratory rat,** Philadelfia, Academic Press, p.151-173, 2000.

LEE, J.; HO-YOUNG, Y.; YANG, J.; SHIN, J.; KWON, J.; KIM, C. Characterization of Streptozotocin-induced diabetic rats and pharmacodynamics of insulin formulations. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** v. 67, n. 11, p. 2396-2401, 2003.

MORGAN, N. G.; CABLE, H. G; NEWCOMBE, N. R.; WILLIAMS, G. T. Treatment of cultured pancreatic B- cells with Streptozotocin induces cell death by apoptosis. **Bioscience Reports,** v.14, p. 243 – 250, 1994.

NICOLAU, J.; MATOS, A. J.; SOUZA, N. D.; NEVES, B. L.; LOPES, C. A. Altered glycogen metabolism in the submandibular and paratid salivary glands of rats wiyh streptozotocin-induced diabetes. **Jornal of Oral Science**, v. 47, n. 2, p. 111-116, 2005.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, L. M.; NADKAMI, V. M. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. **Cancer Chemotherapy Reports,** v. 2, n. 29, p. 91-98, 1963.

SAIN, K. S.; THOMPSON, C.; WINTERFORD, C. M.; WALKER N. I.; CAMERON, D. P. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic B – cell line, INS-1, **Biochemistry and Molecular Biology International,** v. 39, p. 1229 -1236, 1996.

SALARDI S.; ZUCCHINI S.; CICOGNANIC A.; BARBERI E.; CACCIARI E. **Hormone Research,** v. 57, p. 205 –208, 2002.

SEETHALAKSHMI, L.; MENON, M.; DIAMOND, D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. **The Journal of Urology,** v. 138, p. 190-194, 1987.

SHERWIN, S. R. Diabetes Mellitus. In: BENNETT, C. J.; PLUM, F. **Tratado de medicina interna**, 20. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1997. p. 1391 – 1413.

STABENFELDT, H. G.; EDQVIST, E. L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, J. M.; REECE, O. W.; **Dukes, fisiologia dos animais domésticos.** 11 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1996. p. 603 - 614.

STEGER, W. R. Testosterone replacement fails to reverse the adverse effects of streptozotocin-induced diabetes on sexual behavior in the male rat. **Pharmacology Biochemistry & Behavior,** v. 35, p. 577-582, 1990.

STEGER, W. R.; AMADOR, A.; LAM, E.; RATHERT, J.; WEIS, J.; SMITH, S. M. Streptozotocin- induced deficts in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. **Endocrinology,** v. 124, n. 4, p. 1737-1743, 1989.

SUDHA, S.; VALLI, G.; JULIE, M. P.; RUNAKARAN, J.; GOVINDARAJULU, P.; BALASUBRAMANIAN, K. Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes,** v. 107, p. 14-20, 1999.

SWENSON, J. M.; REECE, O. W.; **Dukes, fisiologia dos animais domésticos.** 11 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1996. p. 606 á 611.

TANAKA, T.; NAGATANI, S.; BUCHOLTZ, C. D.; OHKURA, S.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.; FOSTER, L. D. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. **Biology of Reproduction,** v. 62, p. 1256-1261, 2000.

WABREK, J. A. Sexual dysfunction associated with diabetes mellitus. **The Journal of Family Practice,** v. 8, n. 4, p.735-740, 1979.