



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

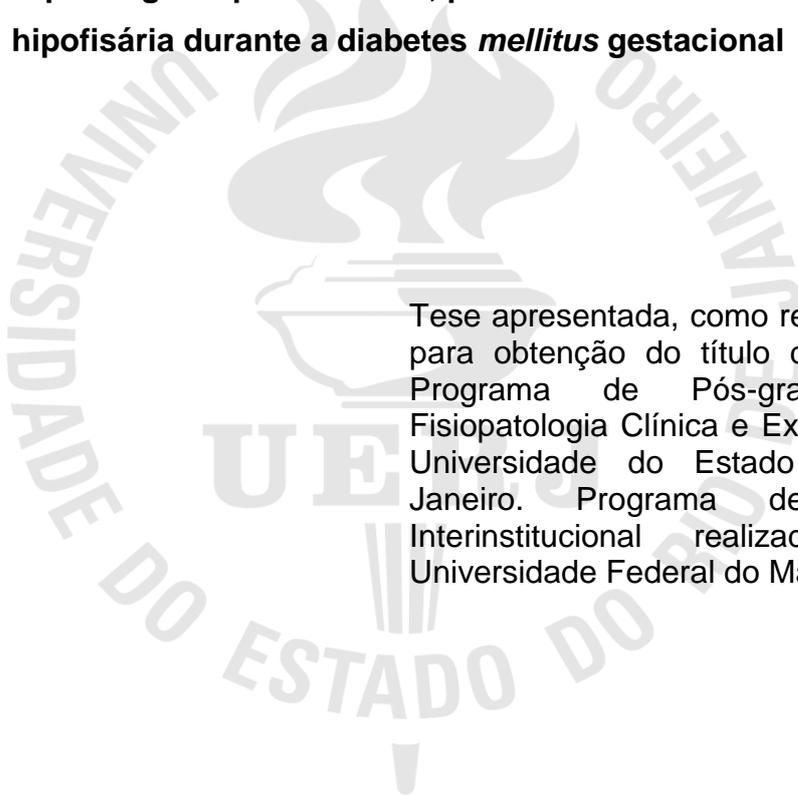
Leonardo Carvalho Silva

**Alterações histopatológicas pancreáticas, placentárias e na matriz  
extracelular hipofisária durante a diabetes *mellitus* gestacional**

Rio de Janeiro  
2013

Leonardo Carvalho Silva

**Alterações histopatológicas pancreáticas, placentárias e na matriz extracelular hipofisária durante a diabetes *mellitus* gestacional**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciane Maria Oliveira Brito

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Leonardo Carvalho  
Alterações histopatológicas pancreáticas, placentárias e na matriz extracelular hipofisária durante a diabetes *mellitus* gestacional / Leonardo Carvalho Silva. – 2013.  
76 f.

Orientadora: Patrícia Cristina Lisbôa da Silva.  
Coorientadora: Luciane Maria Oliveira Brito.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão

1. Diabetes na gravidez – Teses. 2. Diabetes mellitus gestacional. 3. Placenta – Teses. 4. Hipófise – Teses. 5. Matriz extracelular – Teses. I. Silva, Patrícia Cristina Lisbôa da. II. Luciane Maria Oliveira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 618.3:616.379-008.64

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Leonardo Carvalho Silva

**Alterações histopatológicas pancreáticas, placentárias e na matriz extracelular hipofisária durante a diabetes *mellitus* gestacional**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Aprovada em 26 de março de 2013.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciane Maria Oliveira Brito  
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Celly Cristina Alves do Nascimento Saba  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elaine de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento  
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista a minha inesquecível mãe Maria de Lourdes Carvalho Silva (in memoriam),mulher resiliente mãe dedicada,educadora de várias gerações exemplo a ser seguido. A senhora foi e será sempre pra mim, exemplo de mulher, de amiga, e de mãe. Dedico a ela essa conquista e todas as minhas futuras vitórias.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Obrigado Senhor por ser meu sustentáculo e nunca deixar que eu esmorecesse.

À Minha saudosa e amada mãe Maria de Lourdes Carvalho Silva, (in memoriam)

Pelo amor que me foi dado enquanto habitou entre nós. Obrigado pelo amor incondicional pelo exemplo de retidão, de ética e de sabedoria, determinantes em todos os momentos de minha vida.

À Professora Dra. Luciane Oliveira Brito pela orientação, dedicação e ensinamentos durante todos esses anos de convivência. A concretização desse trabalho deve-se ao seu empenho, e sem dúvida nenhuma, por ter acreditado e investido em mim. O trabalho termina, mas a amizade e admiração são eternas...

À Profa Dra Patrícia Cristina Lisboa da Silva por ter aceitado orientar esse trabalho e o fez com dedicação e sábias intervenções nos momentos propícios. Obrigado Profa Patrícia, serei sempre agradecido...

À Doutoranda Haissa Oliveira Brito pela imensa ajuda na concretização deste trabalho, pelas orientações nos momentos certos, pelos ensinamentos paciência e atenção. O trabalho seria mais difícil e na realidade não teria iniciado e nem chegado ao fim sem sua interveniência, muito obrigado mesmo.

À minha querida companheira e esposa Nair Nelma Campos Silva pela amizade, carinho, dedicação, respeito e amor sempre ao meu lado, minha fortaleza.

Aos meus filhos Rafael e Raul Campos Silva com certeza eles são a minha maior vitória tenho orgulho de nesta vida ser o pai de vocês e não tenham dúvidas que por vocês sempre lutarei até o fim. Obrigado pelos filhos maravilhosos que vocês são.

Ao meu irmão e amigo Calixto pela amizade de muitos anos, pelo entusiasmo desde o começo e por estar sempre disposto a me ajudar, um beijo no seu coração.

Aos meus irmãos Marcelo, Fernando e Rachel com quem tenho a honra de dedicar e compartilhar esse momento, amo todos vocês. Essa conquista é de todos nós.

A todos aqueles que, pelo compromisso com o conhecimento ou pela força da amizade se disponibilizaram a ajudar e o fizeram com atenção ímpar em especial a Profa Doutora Ana Lúcia Abreu de UEMA e a graduanda Joyce Leal .

À Profas.Célia Clavichiolo e Rosana e Histotécnólogo Herculano, da Universidade Federal do Paraná (UFPR) pela imensa ajuda nos exames histopatológicos e análise da matriz extracelular.

Aos professores e funcionários do DEMED III da UFMA

A todos os professores do DINTER UERJ/UFMA

Aos animais de experimentação, meu eterno respeito e gratidão.

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

Não vos ensoberbais do que sabeis, porquanto esse saber tem limites estreitos no mundo em que habitais. Suponhamos sejais sumidades em inteligência neste planeta; nenhum direito tendes de envaidecer-vos. Se Deus, em seus desígnios, vos fez nascer num meio onde pudestes desenvolver a vossa inteligência, é que quer que a utilizeis para o bem de todos.

*Ferdinando- Espírito protetor (O Evangelho  
(Segundo o Espiritismo)*

## RESUMO

SILVA, Leonardo Carvalho. **Alterações histopatológicas pancreáticas, placentárias e na matriz extracelular hipofisária durante a diabetes *mellitus* gestacional**. 2013. 76 f. Tese (Doutorado) em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro e Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2013.

A Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) pode ser definida como intolerância a carboidrato durante a gravidez e estima-se que pode afetar 10-22% de todas as pacientes grávidas. Durante a gravidez podem surgir diversas complicações para o feto como risco elevado de aborto espontâneo, anormalidades congênitas e morbidade e mortalidade neonatal. Entretanto, podem surgir também alterações morfofuncionais em diversos órgãos da mãe diabética, porém isso não é bem estabelecido. Investigar se haverá ou não alterações bioquímicas e histopatológicas em diversos órgãos, como hipófise, útero, placenta e pâncreas de ratas grávidas com diabetes mellitus durante e no final da gravidez e compará-las. Além disso, investigar se há alteração na matriz extracelular (MEC) da hipófise desses animais. No 5º dia de vida, ratas Wistar foram divididas em dois grupos: um tratado com estreptozotocina (Grupo Diabético / DIAB), na dose de 90 mg/kg, subcutâneo e outro grupo, que foi tratado com veículo (tampão citrato/CTR). Aos 90 dias de vidas, foram submetidas ao cruzamento. Após isso, foram sacrificadas no 11º e 21º dia de gravidez. Foram avaliados glicemia e bioquímica materna e número de implantes. O pâncreas, útero, placenta e hipófises foram coradas com Hematoxilina e Eosina e somente as hipófises foram coradas com Masson e Picrosirius, para avaliação da MEC. Os animais diabéticos tanto do 11º quanto do 21º dia apresentaram uma redução no número de implantes, menor peso e maior glicemia e colesterol total, em relação aos animais controle independente do dia da gravidez. Não foi verificada diferença dos níveis de triglicerídeos entre os grupos não diabéticos e diabéticos, independente dos dias. Entretanto, os animais diabéticos que finalizaram o período de gestação apresentaram uma maior glicemia materna em relação ao grupo diabético do 11º dia. Pâncreas de ratas diabéticas do 21º dia apresentaram vacuolização intracitoplasmática das ilhotas, insulite, migração de células inflamatórias, espessamento da parede do vaso e fibrose periductal e vascular. Essas alterações foram verificadas com bem menor intensidade nos animais diabéticos do 11º dia. Foi verificado que a placenta de animais diabéticos apresenta congestão na interface materno-fetal, migração celular, maior concentração de vasos maternos e fetais, mas em forma irregular, necrose e vacuolização. A hipófise de animais diabéticos mostraram células cromóforas agregadas, aumento da espessura de fibras de colágeno vermelhas da MEC, em contraste com o controle, que foi visualizado fibras em verde e em formato de feixe. A diabetes desempenhou um total remodelamento da hipófise. Gravidez de animais diabéticos mostraram maior dano ao pâncreas e placenta, especialmente no final da gravidez. Em consequência dessa alteração, esses animais diabéticos apresentaram hiperglicemia, maior colesterol total, porém menor peso materno, número de implantes e sem alterações nos triglicerídeos. Esse é o primeiro estudo a demonstrar remodelamento tecidual em alguns elementos da MEC na hipófise, como espessamento da camada da MEC e fibras de colágeno em verde. Alterações da MEC da hipófise são provavelmente devido ao processo de diabetes na gestação.

Palavras-chave: Gravidez. Diabetes mellitus. Placenta. Hipófise. Matriz extracelular.

## ABSTRACT

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) can be defined as carbohydrate intolerance during pregnancy and it may affect 10-22% of all pregnant patients. During pregnancy can surge lots of complications to the fetus such as high risk of spontaneous abortion, congenital abnormalities and neonatal morbidity and mortality. However, it can also surge morphofunctional alterations in several organs of the diabetic mother, but it has not been well established. To investigate if there is going to be biochemical and histopathological alterations in several organs, such as pituitary, uterus, placenta and pancreas of pregnant diabetic rats during and in the end of pregnancy and compared them. Furthermore, to investigate if there is pituitary alteration of the extracellular matrix (ECM) in these animals. On the 5<sup>th</sup> day of life, Wistar rats were divided in two groups: one treated with streptozotocin (Diabetic Group/DIAB), with the dose of 90 mg/kg, subcutaneous and another group, treated with vehicle (citrate buffer/CTR). At 90 days of life, they were mated. After, they were sacrificed at 110 and 210 days of pregnancy. Were evaluated maternal glycemia and biochemistry and implant numbers. The pancreas, uterus, placenta and pituitary were stained with Hematoxylin and Eosin and only the pituitary were stained with Masson and Picrosirius, for ECM evaluation. Diabetic animals of 110 days as well as 210 days during pregnancy showed a reduced implant numbers, reduced weight and higher glycemia and total cholesterol, compared with control animals independent of pregnancy day. It was not verified difference in triglycerides levels between non diabetic and diabetic animals, independent of the day. However, diabetic animals that concluded the gestational period showed a higher maternal glycemia compared with 110 day diabetic group. Pancreas of 210 days diabetic animals showed islets intracytoplasmic vacuolization, insulinitis, inflammatory cell migration, thickness of wall vessel and periductal and vascular fibrosis. These alterations were verified in low intensity in 110 day diabetic animals. It was verified at the placenta of diabetic animal congestion in the interface maternal-fetal, cell migration, higher concentration of maternal and fetal vessels, but in irregular shape, necrosis and vacuolization. The pituitary of diabetic animals showed chromophobe cells aggregation, stiffness of red collagen fibers of ECM, in contrast of control, that was visualized green ones and in bundle shape. Diabetes performed a total tissue remodeling in pituitary. Pancreas of diabetic pregnant animals showed a more damage pancreas and placenta, especially in the end of pregnancy. In consequence of these alterations, these diabetic animals presented hyperglycemia, higher total cholesterol, but low maternal weight, implant numbers and no changes in triglycerides. This study is the first to demonstrate that during experimental gestational diabetes occurs a tissue remodeling of some elements of ECM in pituitary, such as stiffness of ECM and presence of red collagen fibers. Control animals presented a thin ECM layer and green collagen fibers. Pituitary alterations in ECM probably are due diabetes process during pregnancy.

Keywords: Pregnancy. Diabetes mellitus. Placenta. Pituitary. Extracellular matrix.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura da estreptozotocina.....	18
Figura 2	Tipos de hormônios lactogênicos durante a gravidez em roedores	25
Figura 3	Elementos da Matriz Extracelular.....	26
Tabela	Tipos de colágeno e localizações.....	29
Figura 4	Integração de sinais e vias de transdução ativadas pelas metaloproteinases.....	31
Figura 5	Respostas placentais em resposta ao insulto da diabetes.....	34
Figura 6	Peso maternal de ratas diabéticas e não-diabéticas durante e no final da gravidez.....	43
Figura 7	Número de implantes de ratas não-diabéticas e diabéticas durante e no final da gravidez.....	44
Figura 8	Glicemia de ratas diabéticas e não diabéticas durante e no final da gravidez.....	46
Figura 9	Colesterol total de ratas diabéticas e não diabéticas durante e no final da gravidez.....	47
Figura 10	Triglicérides de ratas diabéticas e não diabéticas durante e no final da gravidez.....	48
Figura 11	Histopatológico de pâncreas de ratas diabéticas ou não, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por hematoxilina e eosina (HE, 400X).....	50
Figura 12:	Histopatológico de placenta de ratas não-diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Hematoxilina e Eosina (HE, 400x).....	52
Figura 13	Histopatológico de placenta de ratas diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por hematoxilina e eosina (HE, 400x).....	53
Figura 14	Histopatológico de hipófises de ratas diabéticas ou não, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Masson (Masson, 200x).....	55

Figura 15	Histopatológico de hipófises de ratas não diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Picrosirius (Masson, 100x).....	56
Figura 16	Histopatológico de hipófises de ratas diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Picrosirius (Masson, 200x e 600x).....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM2- Diabetes Mellitus 2  
EUA – Estados Unidos da América  
IL-10-Interleucina 10  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
GAGs – Glicosaminoglicanos  
TIDA – neurônios tubeloinfundibulares  
TRH – Hormônio Liberador de Tiroxina  
MEC – Matriz Extracelular  
GPs – Glicoproteínas  
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas  
PL – Lactogênio placentário  
rPL I – Lactogênio placentário I  
rPLII – Lactogênio placentário II  
Zn – Zinco  
STZ – estreptozotocina  
DEX – dexametasona  
NG2- condroitim sulfato  
DG- Diabetes Gestacional  
DMG-Diabetes Mellitus Gestacional

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 OBJETIVOS.....	35
1.1 Objetivo geral .....	35
1.2 Objetivos específicos .....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Animais.....	36
2.2 Drogas e soluções.....	37
2.3 Protocolos experimentais.....	37
2.4 Coleta de sangue para dosagens bioquímica e glicêmica.....	39
2.5 Coleta dos órgãos para histopatologia.....	39
2.6 Análise estatística.....	41
3 RESULTADOS.....	42
3.1 Peso maternal e número de implantes em ratas diabéticas e não diabéticas durante e no final da gravidez.....	42
3.2 Perfil bioquímico maternal em ratas não diabéticas e diabéticas durante e no final da gravidez.....	45
3.3 Análise histopatológica do pâncreas de grávidas não diabéticas e diabéticas durante e no final da gestação.....	49
3.4 Análise histopatológica placentária não diabéticas e diabéticas durante e no final da gestação.....	51
3.5 Análise histopatológica e da matriz extracelular de hipófises de ratas não diabéticas e diabéticas durante e no final da gravidez	54
4 DISCUSSÃO.....	58
5 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

## INTRODUÇÃO

### ***Diabetes mellitus tipo 2***

O termo diabetes melito ou *mellitus* (DM) consiste em um grupo de disfunções metabólicas de etiologia múltipla, caracterizadas por hiperglicemia crônica com alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, resultantes de um déficit na produção de insulina, na sua ação sobre os tecidos alvos, ou em ambos (ADA, 2012). Apesar dos avanços referentes ao conhecimento sobre o DM, este ainda constitui um grave problema de saúde pública tanto no contexto brasileiro como mundial, haja vista sua incidência crescente e elevada morbidade e mortalidade (BARBOSA, 2006). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, cerca de 366 milhões de indivíduos serão afetados pela doença em 2030; no Brasil, a prevalência aumentará para 11,3 milhões no mesmo período (RATHMANN e GIANI, 2004).

Os indivíduos portadores de DM tipo 2 (DM2) apresentam uma história de progressão lenta da doença e muitas vezes são assintomáticos ou diagnosticados na presença de condições como Insuficiência Coronariana, Neuropatia, Nefropatia, entre outras (ADA, 2008).

Considera-se como disfunção fundamental no DM2, a resistência elevada à insulina, resultando no fracasso da insulina para estimular a captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo, bem como sua incapacidade de suprimir a produção de glicose hepática de forma satisfatória (MARTIN, WARRAM et al., 1992; LILLIOJA, MOTT et al., 1993). As alterações teciduais podem relacionar-se a um processo de gênese de produtos de glicação avançada que, ao formarem ligações cruzadas com proteínas ou interações com receptores celulares, promovem estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores

inflamatórios (MONNIER, 2003). Estudos afirmam, ainda, que o desenvolvimento desse tipo de diabetes está relacionado a uma predisposição genética, provavelmente de penetrância variável e de natureza poligênica (FROGUEL, VELHO *et al.*, 1993; MEDICI, HAWA *et al.*, 1999; OKAMOTO, NAKAE *et al.*, 2004). Alguns pesquisadores já identificaram pelo menos 27 genes confirmados ou potencialmente envolvidos na susceptibilidade do paciente à DM2 (FLOREZ, 2008).

De forma geral, o DM2 envolve dois mecanismos patogênicos principais. Um deles consiste no declínio progressivo da função das células da ilhota pancreática, acarretando em uma secreção reduzida de insulina e inadequada supressão de glucagon. O outro é caracterizado pela resistência periférica à insulina, com consequente declínio das respostas metabólicas a esse hormônio (AIZAWA, ASANUMA *et al.*, 1996).

As células endócrinas no pâncreas estão localizadas nas ilhotas de Langerhans e são classificadas em dois tipos:  $\alpha$  e  $\beta$ . Em seres humanos, estas células encontram-se espalhadas em toda a ilhota em associação com a microcirculação, enquanto em roedores, as células  $\alpha$  estão agrupadas no núcleo e as células  $\beta$ , na periferia. As células  $\beta$  compreendem o maior percentual da massa endócrina pancreática, sendo responsáveis por produzir insulina e amilina, em resposta à elevação do nível plasmático de glicose. Já as células  $\alpha$  secretam glucagon quando o nível de glicose diminui (CABRERA *et al.*, 2006). Essa interação representa a resposta ideal para controlar os níveis glicêmicos e mantê-los dentro do limite estreito de homeostase, mesmo quando há grande variação na ingestão de alimento.

Após uma refeição, os níveis de glicose plasmática estão mais elevados nos indivíduos com DM2, se comparado aos normais. Além disso, o pico de insulina

no plasma demonstra-se retardado e, em contraste com o padrão de normalidade, há um ligeiro aumento do glucagon. *A priori*, o marco inicial da elevação da glicose é determinado pelo aumento da resistência à sua utilização pelos diferentes tecidos. O uso da glicose permanece normal até o nível glicêmico de 140 mg/dl, devido ao mecanismo compensatório de aumento da secreção de insulina pelas células  $\beta$ ; os níveis maiores acompanham-se de um declínio da insulinemia sérica, promovendo a intolerância à glicose e DM2 (DEFRONZO, 2009).

Sabe-se também que com o progredir da intolerância à glicose para o DM2 há uma diminuição progressiva da massa de células  $\beta$ , propiciada pelo aumento da apoptose dessas células, que torna-se superior à taxa de neoformação da ilhota; com isso, a produção de insulina é insuficiente para controlar a hiperglicemia (BUTLER *et al*, 2003). Outro componente importante do mecanismo de hiperglicemia associada a DM2 é a elevação da taxa de produção basal de glicose pelo fígado, que pode ser elucidada pela supressão prejudicada do glucagon (GROOP *et al*, 1989).

O estudo de DM experimental em animais é realizado com a administração de duas drogas diabetogênicas mais utilizadas, a Alloxana e a estreptozotocina (Fig.1). Ambas são análogas citotóxicas da glicose. Sua citotoxicidade ocorre por vias diferentes e seus mecanismos em ação ocorrem no pâncreas. A estreptozotocina é mais eficaz e mais específica para as células beta do pâncreas que a aloxana (RAKIETEN *et al*, 1963). A estreptozotocina (STZ) é um agente antimicrobiano e foi utilizado como agente alquilante quimioterápico (WHITE, 1963). Em 1963, Rakieten e colaboradores descreveram, pela primeira vez, que essa droga tinha este efeito diabetogênico. Essa ação foi descrita como diabetes induzida pela estreptozotocina e é causada pela necrose específica de células beta do pâncreas e desde então, tem

sido a droga de escolha para indução de DM em animais via estresse oxidativo.

Desde que se descobriu que a STZ é um doador de óxido nítrico (NO) e que essa molécula está relacionada com a destruição das células das ilhotas pancreáticas, tem sido proposto que essa molécula contribui com o dano induzido pela STZ ao DNA (KRÖNCKE *et al.*, 1995, MORGAN *et al.* 1994). A participação do NO no efeito citotóxico da STZ foi confirmado em diversos experimentos (TURK *et al.* 1993, KRÖNCKE *et al.* 1995). A STZ é captada pelas células beta pancreáticas pelo transportador de glicose GLUT-2. A redução da expressão desse transportador tem sido descrito como preventivo na ação diabetogênica da STZ (SCHNEDL *et al.*, 1994, THULESEN *et al.*, 1997). Estes efeitos na homeostase da glicose e da insulina refletem as anormalidades induzidas por essa toxina nas células beta. Inicialmente, a biossíntese da insulina, secreção de glicose e metabolismo da glicose (ambos oxidação da glicose e consumo de oxigênio) são todos afetados (NUKATSUKA *et al.*, 1990).

Os efeitos da STZ em diferentes órgãos tem sido extensivamente estudado. Essa droga possui várias ações biológicas, incluindo produção de lesão celular crônica e aguda, carcinogênese, teratogênese e mutagênese (MAGEE & SWANN, 1969). Além de diabetogênica, ela é hepatotóxica, nefrotóxica e também pode causar úlcera gástrica (PIYACHATURAWAT *et al.*, 1988).

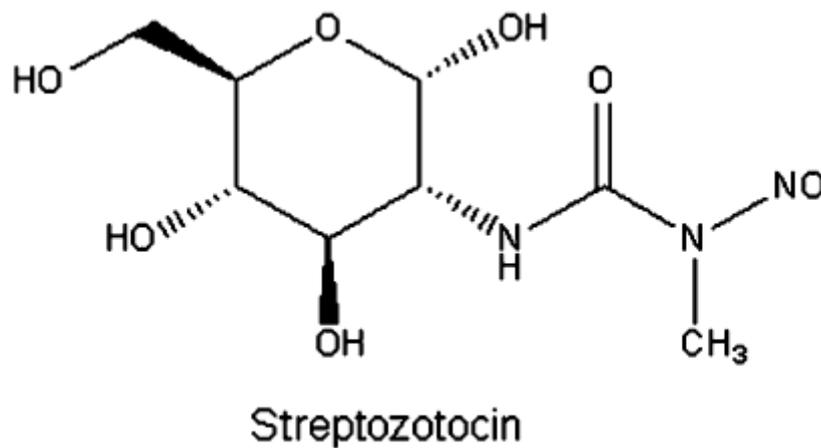


Figura 1 – Estrutura da estreptozotocina. Fonte: KRÖNCKE *et al.* 1995

### ***Diabetes Mellitus Gestacional***

Um aumento significativo de gravidez em mulheres com diabetes tem sido observado nos Estados Unidos da América (EUA) entre 1999 e 2005, aumentando de 10 a 21% (LAWRENCE *et al.*, 2008). A Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) causa alterações desde fertilização até todo o período ao longo da gravidez até o final. Isso pode predispor a mãe a algumas complicações da diabetes como retinopatia e nefropatia ou acelerar o curso dessas complicações se elas já estão presentes. A DMG em geral leva a alterações no crescimento fetal. Todas essas alterações estão intimamente relacionadas com o controle baixo de glicemia durante o período de organogênese e, infelizmente, ainda é bastante prevalente. Hiperglicemia durante o período pré-concepcional é provavelmente o maior fator teratogênico existente, mas a obesidade, hipertensão e outros fatores associados com a síndrome metabólica também podem ser relevantes (JOYANOVIC & PETTITT, 2001).

Tanto a DM2 quanto a DMG ocorrem quando células beta pancreáticas não conseguem aumentar a demanda de insulina devido a resistência insulínica. A insulina é secretada de células beta pancreáticas em picos secretórios a cada intervalo de 4 a 5 minutos, com a secreção de insulina sendo modulada pelos picos. No entanto, quando há uma demanda muito alta por insulina, a homeostase da glicose não pode ser mantida, portanto, é necessário um aumento da liberação de insulina pelas células beta existentes e um aumento adaptativo de massa de células beta é requisitado. A massa de célula beta é mantida por um balanço dinâmico entre morte celular apoptótica e replicação para produzir novas células. Quando há um aumento por insulina além de flutuações normais por causa de mudanças na dieta ingerida, o balanço é prontamente modificado em favor de replicar ou reduzir a apoptose para aumentar a massa de célula beta. Isso normalmente é um processo demorado, mas ocorre rapidamente em determinadas situações, como a gravidez, quando a insulina precisa aumentar rapidamente.

A disfunção endometrial durante a diabetes pode ser transitória ou permanente dependendo do grau e da duração da doença. Infertilidade entre mulheres diabéticas é um problema pouco estudado e a avaliação do estado endometrial nesses casos não é bem estabelecido. A baixa incidência de diabetes em pacientes inférteis pode ser a razão para pouca pesquisa atual neste assunto. Embora alterações neuroendócrinas e no eixo uterino tenham sido notado em estudos experimentais. GARRIS e colaboradores (1998) concluíram que a incompetência reprodutiva é caracterizada pela aciclicidade reprodutiva e desenvolvimento folicular ovariano comprometido, redução de síntese de hormônios esteroides ovarianos, sensibilidade reduzida e responsividade ao metabolismo celular endócrino estimulado e aumento na atrofia endometrial .

Durante a gravidez, a diabetes pode causar alterações reprodutivas que podem aumentar aborto espontâneo, anormalidades congênitas e mortalidade e morbidade neonatal (VAN ASSCHE et al, 1998; ERIKSSON et al, 2003).

Hiperglicemia durante a embriogênese tem sido associado a defeitos no nascimento durante gravidez complicada pelo diabetes (Damasceno et al, 2002). As anomalias geralmente acometem, o sistema nervoso central, coração e vasos grandes, rins e esqueleto axial (SCHAEFER-GRAF et al, 2000).

Os índices de aborto são três vezes mais comuns com associação entre diabetes e gestação. Por mais que exista avanço na obstetrícia e no manejo adequado da diabetes, os riscos de morbidade e mortalidade são aumentados em mulheres com diabetes e sua progênie (Diabetes and Pregnancy Group, 2003; Dunne et al, 2003). Estresse oxidativo em excesso tem sido implicado como sendo uma das causas da patologia e a complicações da DMG (ZAO E REECE, 2005).

Alguns estudos sugerem que a DMG é um estado de inflamação crônica causados pela hiperglicemia com diversas ações focando em duas citocinas mais importantes: a interleucina 10 (IL-10) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). As ações dessas citocinas parecem ser antagônicas e dependentes de um balanço entre elas, que podem ser orquestradas pela ação específica de imunossupressão da IL-10. Durante esse período específico, sua ação imunossuprimida tem um papel crucial na regulação do balanço de sinais pró- e anti-inflamatórios, e remodelamento e crescimento placentário, que também é extremamente importante para que se tenha um parto favorável (MORELI et al, 2012). O TNF- $\alpha$  tem uma característica de ação inflamatória, e é um fator adicional diabetogênico durante a gravidez. A perda do controle da produção dessas citocinas, com o aumento do TNF- $\alpha$ , esta relacionado com o risco de desenvolver complicações obstétricas, particularmente perda fetal

recorrente, síndromes hipertensivas e restrição de crescimento fetal. No entanto, os estudos ainda são controversos e os estudos experimentais são escassos, e portanto ainda não totalmente definidos (COUGHLAN et al, 2001; MOLLER, 2000).

A prolactina é hormônio mais liberado durante a gravidez e a lactação. No entanto, a prolactina é bem conhecida como sendo ativa em vários sistemas que não estão relacionados com reprodução. O aumento da secreção de prolactina durante a gravidez é um mecanismo adaptativo muito importante para a expansão e aumento de células beta pancreáticas para assegurar uma adequada capacidade secretória de insulina quando a resistência a insulina é exacerbada pela gravidez. No entanto, embora as mulheres grávidas possuam um aumento nos níveis de prolactina, esses níveis exibem consideráveis variações como resultado na desregulação de glicose durante a gravidez, embora os efeitos dessas variações da prolactina fisiologicamente sejam desconhecidos.

A prolactina é considerada como hormônio adaptativo, e existem tentativas de racionalizar como um simples hormônio exerce ampla e diversas funções neuroendócrinas. A prolactina é produzida predominantemente por células lactotróficas da adeno-hipófise. No entanto, também pode ser gerada em sítios extra-hipofisários, como células do sistema imune, decidual, mamária, epitelial e adiposas (BEN JONATHAN et al, 1996; PRIGENT-TESSIER et al, 1999; HUGO et al, 2006; FREEMAN et al, 2000).

A secreção de prolactina é controlada principalmente pelo efeito inibitório da dopamina, produzida pelos neurônios tuberoinfundibulares (TIDA) localizados no núcleo arqueado do hipotálamo. A dopamina é liberada a partir dos terminais nervosos na eminência mediana e transportada por meio dos vasos portais para a

hipófise, ativando os receptores D2 dos lactotrofos presentes nessa glândula (FREEMAN et al., 2000).

Vários estímulos fisiológicos, como o aleitamento, o estresse e o aumento de estrogênio, elevam a secreção da prolactina pituitária por meio da inibição dos PIFs ou da liberação de PRFs (prolactin-releasing factors). Além desses, ocitocina, hormônio liberador de tireotrofina (TRH), hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), vasopressina e angiotensina II podem aumentar os níveis de prolactina. A neuroregulação da prolactina é multifatorial, estabelecido por um sistema regulador duplo, que envolve um controle inibidor e também estimulador pelo sistema hipotalâmico-hipofisário.

Durante a gravidez, o aumento da secreção de estrogênio estimula o crescimento e proliferação dos lactotrofos, resultando no aumento do hormônio prolactina e, assim, no preparo da glândula mamária para a lactação pós-parto. No período de lactação, a estimulação de cada mamilo pela sucção do recém-nascido eleva a secreção de prolactina a curto prazo, por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido. Sabe-se que o processo de amamentação ativa os neurônios opióides do hipotálamo, que diminuem a secreção de dopamina, bem como seu efeito inibitório sobre os lactotrofos (DE GREEF et al., 1981; ARBOGAST; VOOGT, 1991).

As alterações dos processos de produção de prolactina durante a gravidez e lactação propiciam as mudanças fisiológicas que ocorrem na mãe que mantém um estado prolongado de hiperprolactinemia. Os níveis séricos de prolactina variantes podem ser classificados em três fases distintas: no início, na metade e no final da gravidez. Nos roedores, a secreção de prolactina no início da gravidez é iniciada pela cópula. O acasalamento induz um reflexo neuroendócrino que promove a

secreção de prolactina duas vezes por dia, resultando em picos por 8-10 dias. O pico começa aproximadamente na metade do período noturno. Os níveis de prolactina, em seguida, retornam ao nível basal antes da segunda onda, conhecido como o pico diurno. Os picos de prolactina promovem o resgate do corpo lúteo do ciclo estral anterior, instituindo uma secreção contínua de progesterona, necessária para a manutenção do início da gravidez (GUNNET; FREEMAN, 1983).

Os neurônios TIDA também apresentam um padrão semicircadiano de atividade durante o início da gravidez, com reduções periódicas na secreção de dopamina durante os picos de prolactina e com a ativação desses neurônios para finalizar esses picos e restaurar a secreção basal de prolactina (DEMAREST et al., 1983; ARBOGAST; VOOGT, 1998).

A segunda fase corresponde à metade da gravidez, em que os picos de prolactina cessam devido ao aumento sustentado da liberação de dopamina pelos neurônios TIDA e associado ao aparecimento da secreção de outro hormônio, o lactogênio placentário (PL). O PL é estruturalmente homólogo à prolactina (VOOGT, 1996), e atua sobre os receptores estimulando a síntese e liberação de dopamina e inibindo a secreção de prolactina pela hipófise materna (LEE; VOOGT, 1999).

Já foram identificadas duas formas de PL em ratos, o lactogênio placentário I (rPL-I) e II (rPL-II) (Figura 2). O primeiro está presente desde o oitavo dia de gravidez e apresenta picos por volta da segunda semana, enquanto que o segundo é detectado por volta do décimo dia até próximo ao período do parto. Ambos ligam-se também aos receptores de prolactina (PRLR) e ativam o sistema de feedback, inibindo a secreção de prolactina. Como o rPL-I está presente primeiramente, é mais provável que ele estabeleça o sinal que finaliza os picos de prolactina no início da gravidez, enquanto o rPL-II mantém esta inibição da secreção de prolactina durante

o restante do período gestacional. Dessa forma, a partir da interrupção dos picos de prolactina até momentos próximos do termo (final da gestação), a atividade dos neurônios TIDA encontra-se elevada e a secreção de prolactina materna é suprimida (ANDREWS et al., 2001).

A última fase da secreção de prolactina durante a gravidez ocorre cerca de 24-36 horas antes do parto, quando há uma alteração visível dos mecanismos que controlam sua secreção. Mesmo com a presença contínua de rPL-II, os níveis de prolactina começam a elevar-se, gerando um grande pico noturno (GRATTAN; AVERILL, 1990). Este pico pré-parto de prolactina ocorre apesar dos níveis de PL permanecerem elevados, sugerindo um rompimento nos mecanismos normais de feedback negativo que controlam sua liberação.

Segundo FUJINAKA et al. (2007), os lactogênios apresentam um efeito protetor direto nas células beta do pâncreas de roedores contra, pelo menos, dois indutores distintos de morte celular, a STZ e dexametasona (DEX), via duas proteínas intracelulares sinalizadoras, JAK2 e STAT5.

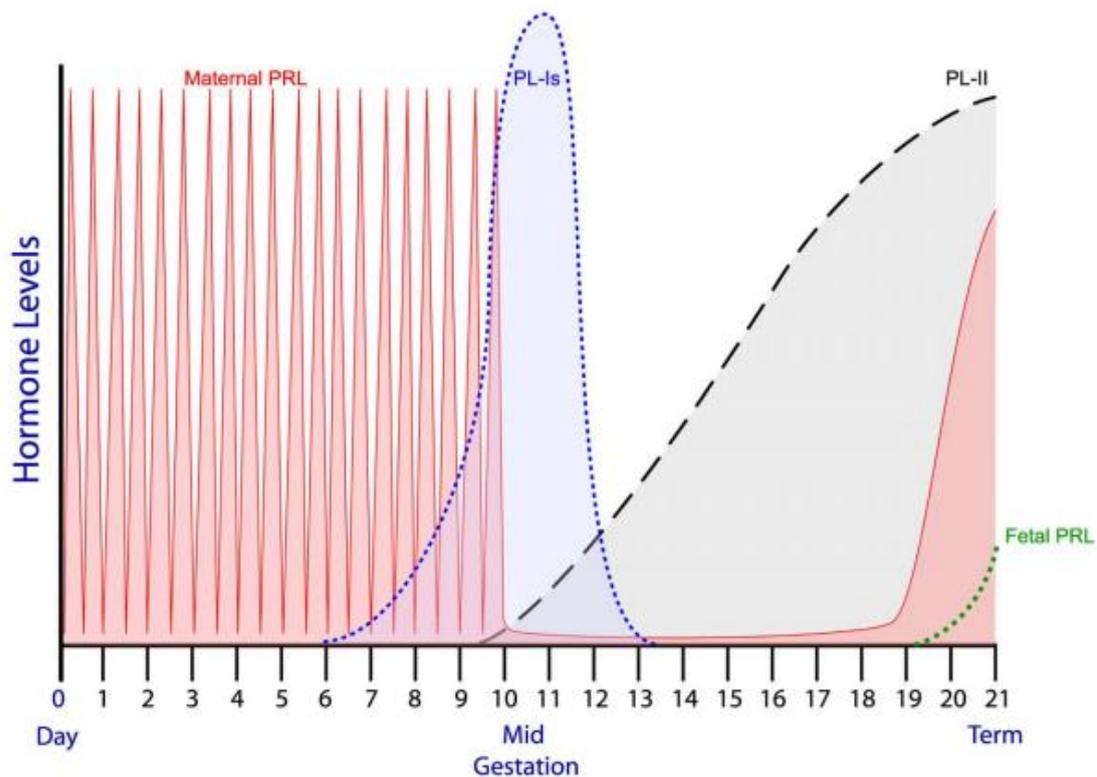


Figura 2. Tipos de hormônios lactogênicos durante a gravidez em roedores  
 Fonte:SOARES et al, 2004.

Após o parto, a secreção de prolactina se torna intimamente ligada ao estímulo de sucção pelo recém-nascido, o que resulta em um aumento proporcional da secreção desse hormônio. Esta liberação coordenada de prolactina é causada por uma diminuição da atividade dos neurônios TIDA induzida pela sucção, resultando na redução da secreção de dopamina no sangue portal (SELMANOFF; GREGERSON, 1985).

### ***Elementos da Matriz Extracelular***

A matriz extracelular (MEC) é um conjunto de agregados supramoleculares constituído por colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas (GPs), que mantém as células associadas possibilitando a organização dos tecidos e a sobrevivência celular (AOUDJIT e VUORI, 2001).

A função estrutural desempenhada pela MEC está relacionada com a resistência mecânica conferida pelas fibrilas de colágeno; ao papel essencial estabelecido pela elastina e proteoglicanos na elasticidade, resiliência do tecido, inter-relações entre a célula e a matriz, bem como a coesividade proporcionada pelas glicoproteínas (laminina, fibronectina, entactina, trombospondina) (HAY, 1984; 1991; JACKSON; BUSCH; CARDIN, 1991).

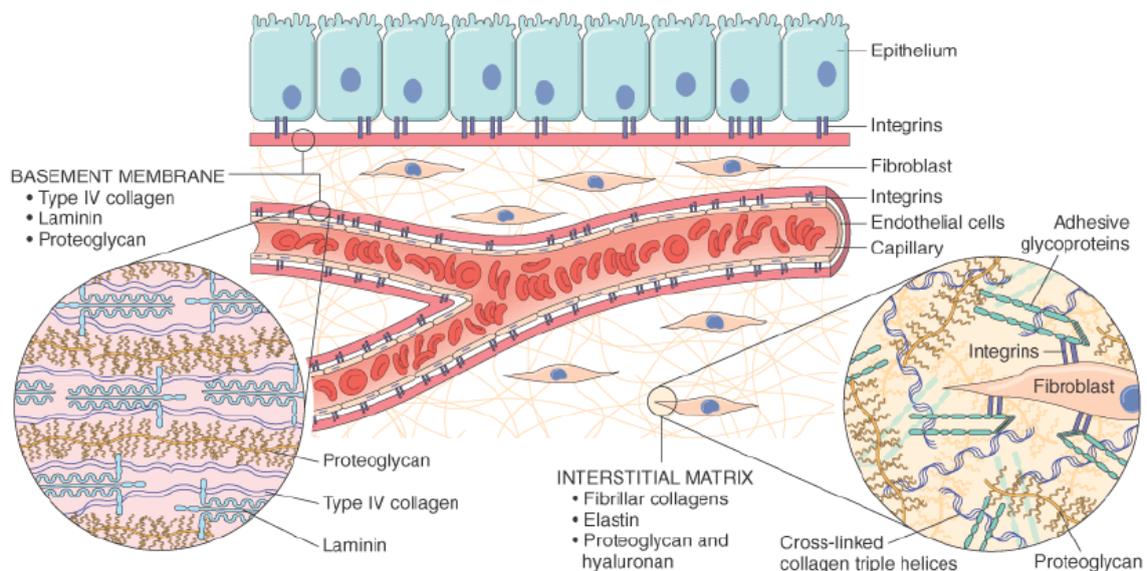


Figura 3- Componentes majoritários da matriz extracelular (MEC), incluindo colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas. Fonte: ROBBINS, 2005.

A MEC é constituída por uma grande variedade de moléculas, inclusive

aquelas que a atravessam ou que nela permanecem temporariamente (Fig.3). As macromoléculas que compõe a base estrutural da matriz são classificadas em quatro grandes grupos, embora esteja bem estabelecido que estas diferentes macromoléculas estão funcionalmente associadas.

- a) Os tipos geneticamente diferentes de colágeno;
- b) As moléculas que constituem o sistema elástico;
- c) As glicoproteínas estruturais; e
- d) Os glicosaminoglicanos (GAGs) e os monômeros e agregados de proteoglicanos (PGs).

Por anos, se atribuída a função da MEC meramente estrutural, porém sabe-se hoje, que ela participa ativamente de vários processos, tanto no sistema nervoso periférico, quanto no central. Várias proteínas presentes na matriz extracelular, por exemplo, podem modificar reações imunes, seqüestrando ou liberando fatores de crescimento, ou interagindo com células do sistema imune ou células da glia (MOHAN et al,2010).

Devido a gama de componentes presentes na MEC e a metodologia empregada no estudo, iremos focar nas fibras colágeno. As fibras de colágeno são formadas por três cadeias peptídicas dispostas em hélice denominadas de cadeias alfas. Cada cadeia alfa consiste de três partes: uma região central composta por unidades repetitivas de três aminoácidos, Glicina-X-Y que se estende por 1.000 resíduos de aminoácidos. Os resíduos são geralmente a prolina e a hidroxiprolina. Possuem duas regiões denominadas de propetídeos amino e carboxil terminal. A estrutura molecular em hélice triplas das cadeias peptídicas forma a molécula do

procolágeno. Baseado na seqüência genética dos diferentes tipos de colágeno, estes podem ser divididos em sub-famílias (ver Tabela 1).

- 1) Colágenos fibrilares - Tipos I, II, III, V e XI, constituídos por moléculas que formam fibrilas com estriações em diversos tecidos;
- 2) Colágenos associados a fibrilas – Tipos IX, XII e XIV, estão associados aos colágenos fibrilares;
- 3) Colágenos de cadeia curta – Tipos VIII e X, fazem parte de matrizes extracelulares específicas (ver Tabela 1);
- 4) Colágenos das lâminas basais – compreende os vários tipos de moléculas de colágeno conhecido como do Tipo IV; e
- 5) Outros tipos de colágenos – Tipos VI, VII e XIII, formam estruturas especializadas em vários tecidos. O tipo VI forma microfibrilas e estão associados aos colágenos fibrilares; o tipo VII forma as fibrilas de ancoragem.

Por muitos anos foi atribuída ao colágeno uma função apenas de suporte e resistência mecânica. No entanto, resultados obtidos nas últimas décadas mostraram que os colágenos estão envolvidos nos fenômenos de adesão e diferenciação celular (HAY, 1984). Estudos com proteoglicanos de condroitim sulfato (NG<sub>2</sub>), componentes integrais de membrana, demonstram que este PG interage com colágeno tipo VI. O proteoglicano de heparam sulfato - sindecam-1 – interage com colágenos I, III e V (BERNFIELD et al., 1992). Colágeno tipo IV inibe a adesão e a proliferação celular de células endoteliais (UNDERWOOD; BEAN; WHITELOCK, 1998).

Tabela 1 – TIPOS DE COLÁGENOS E LOCALIZAÇÕES.

TIPO	CONSTITUINTE	OCORRÊNCIA
I	$\alpha 1(I)$	Muitos tecidos conjuntivos, especialmente pele, osso, tendões e ligamentos.
	$\alpha 2(I)$	
II	$\alpha 1(II)$	Cartilagem, humor vítreo e córnea.
III	$\alpha 1(III)$	Pele, músculo, etc..
	$\alpha 1(IV)$	
	$\alpha 2(IV)$	
IV	$\alpha 3(IV)$	Todas as membranas basais.
	$\alpha 4(IV)$	
	$\alpha 5(IV)$	
	$\alpha 6(IV)$	
	$\alpha 1(V)$	
V	$\alpha 2(V)$	Na maioria dos tecidos intersticiais e no sistema nervoso.
	$\alpha 3(V)$	
	$\alpha 4(V)$	
	$\alpha 1(VI)$	
VI	$\alpha 2(VI)$	Na maioria dos tecidos intersticiais / conjuntivos.
	$\alpha 3(VI)$	
VII	$\alpha 1(VII)$	Fibrilas de ancoragem.
VIII	$\alpha 1(VIII)$	Em muitos tecidos.
	$\alpha 2(VIII)$	
IX	$\alpha 1(IX)$	Em cartilagens e em tecidos que contêm colágeno tipo II.
	$\alpha 2(IX)$	
X	$\alpha 3(IX)$	Em cartilagens e em tecidos que contêm colágeno tipo II.
	$\alpha 1(X)$	
XI	$\alpha 1(XI)$	Em cartilagens calcificadas e hipertróficas.
	$\alpha 2(XI)$	
XII	$\alpha 3(XI)$	Em cartilagens e em tecidos que contêm colágeno tipo II.
	$\alpha 1(XII)$	
XIII	$\alpha 1(XIII)$	Em tecidos que contêm colágeno tipo I.
XIV	$\alpha 1(XIV)$	Em muitos tecidos.
XV	$\alpha 1(XV)$	Em tecidos que contêm colágeno tipo I.
XVI	$\alpha 1(XV)$	Muitos tecidos em contato com a membrana basal.
XVII	$\alpha 1(XVI)$	Em muitos tecidos.
XVIII	$\alpha 1(XVII)$	Hemidesmosomos da pele.
XIX	$\alpha 1(XVIII)$	Muitos tecidos em contato com a membrana basal.
XIX	$\alpha 1(XIX)$	Muitos tecidos em contato com a membrana basal.
Tipos adicionais	4 cadeias $\alpha$	

Adaptado de MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2001.

O colágeno, às vezes, pode se depositar na MEC, como no caso da hipertrofia ventricular esquerda, promovendo alterações na estrutura da MEC e modificando a função do órgão. Para degradar o colágeno e vários outros componentes da MEC, existe uma família de enzimas chamadas de Metaloproteinases (MMPs). As MMPs são grupo de endopeptidases dependentes de cálcio e que também contêm zinco ( $Zn^{2+}$ ).

Basicamente, as MMPs são compostas de um sítio catalítico contendo  $Zn^{2+}$  e cálcio e de um pró-peptídeo ligado ao sítio catalítico por uma ligação sulfidrilada. Por terem propriedades potencialmente destrutivas, as MMPs são sintetizadas como pró-formas, enzimaticamente inativas e denominada de zimogênios (Nagase & Woessner, 1999). Assim, a ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação deste por outras proteases, tais como plasmina, ou por MT-MMPs (MMPs do tipo membrana) (MURPHY & NAGASE, 2008).

As MMPs degradam várias proteínas da matriz extracelular quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas e são expressas em vários tipos celulares e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias (SCHULZ, 2007; VISSE, 2003).

A atividade das MMPs pode ser regulada por vários fatores como citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e estresse oxidativo. Essa regulação pode ser feita em três níveis: indução da transcrição gênica, modificação pós-traducional e interação das MMPs com seus inibidores teciduais endógenos, os TIMPs (inibidores teciduais de MMPs). Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a razão de MMPs e TIMPs (Fig.4). Entretanto, em processos patológicos como a hipertensão arterial, ocorre um desequilíbrio. Dessa razão, levando à degradação excessiva das proteínas da MEC e,

consequentemente, ao remodelamento vascular patológico ( VISSE & NAGASE, 2003).

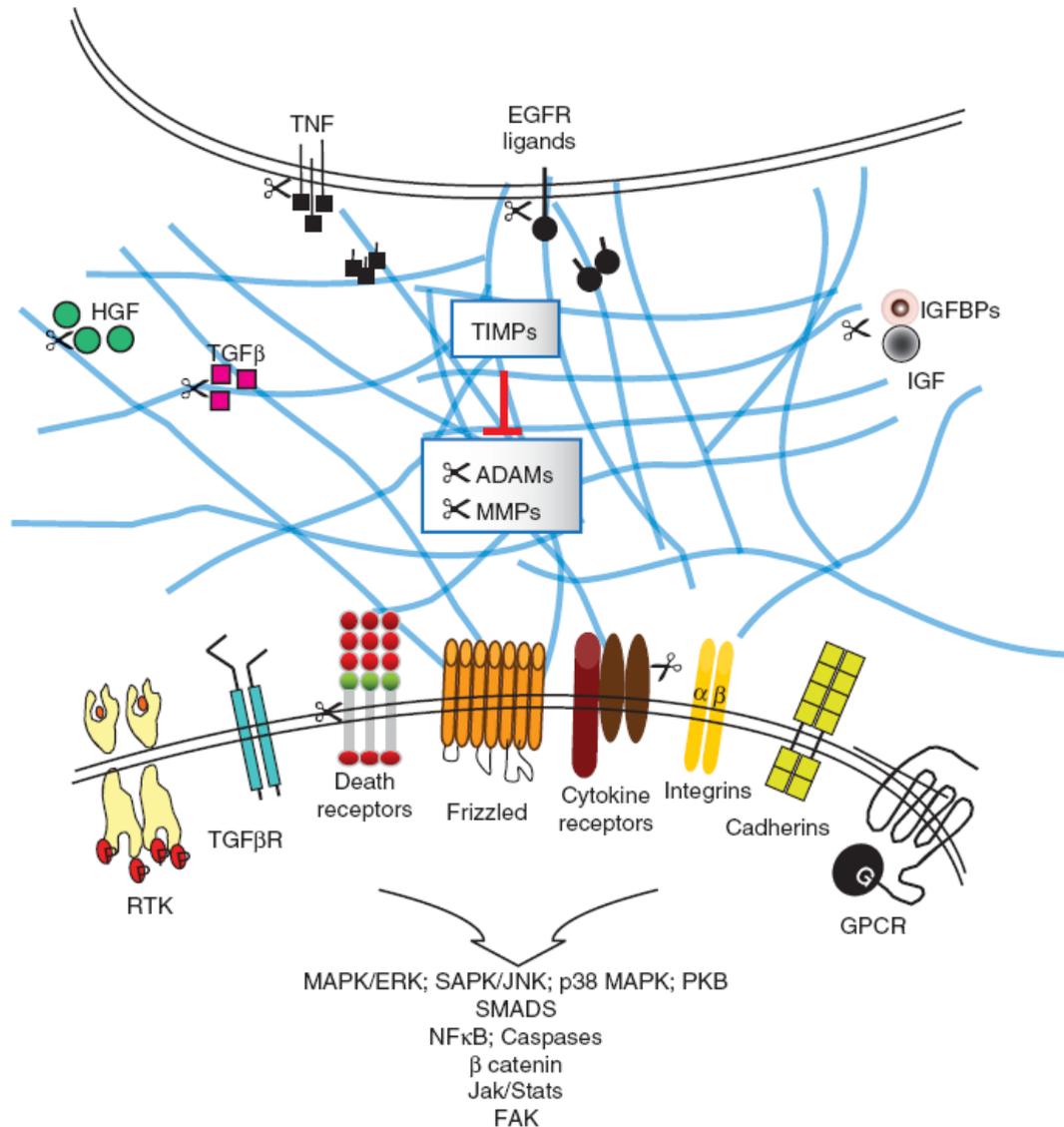


Figura 4- Integração de sinais e vias de transdução ativadas pelas MMPs. As TIMPs juntamente com MMPs e proteases ADAM operam a nível de interface estroma-epitélio para afetar a viabilidade do fator de crescimento pela regulação da liberação de fatores que se ligam a MEC, mostrando os ligantes de superfície celular e citocinas ou seus respectivos receptores, bem como altera a liberação de fatores complexados com suas proteínas de ligação. ADAM, desintegrina e uma MMP; EGFR, receptor do fator de crescimento epidermal; GPCR, receptor acoplado a proteína G; HGF, fator de crescimento hepatócito; IGF, fator de crescimento similar à insulina; IGFBPs, proteínas de ligação de IGF; MMP, matriz de MMPs; RTK, receptor

de tirosina quinase; TGF $\beta$ , fator de crescimento transformador beta; TIMP, inibidor tecidual das MMPs; TNF, fator de necrose tumoral. FONTE: VISSE & NAGASE, 2003.

Sua relação com o colágeno, é que além da degradação, a deposição de colágeno também pode ocorrer em resposta a um aumento de MMPs. (PARKS, WILSON, LÓPEZ-BOADO, 2004; WU, SCHMID-SCHONBEIN, 2011).

### ***Matriz Extracelular e Diabetes Mellitus Gestacional***

Existem poucos trabalhos sobre alterações na matriz extracelular em quaisquer órgãos durante o a diabetes mellitus gestacional. Sabe-se que durante a lactação, para que haja devida liberação de leite, é necessário que haja recrutamento de toda a maquinaria da MEC para ejeção do leite materno. Os microfilamentos de actina e as fibras de colágeno do tipo I das células mioepiteliais promovem uma contratilidade nas estruturas luminal e acinar para facilitar a ejeção de leite. O repertório das proteínas que compõem a MEC na glândula mamária mudam de composição e degradação dependendo do estágio da gravidez em que se encontram, pois são também regidas pelos hormônios, principalmente pela prolactina ( KHOKHA & WERB, 2011).

Conforme comentado anteriormente, durante esse período há aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1) e TNF- $\alpha$  , principalmente liberada pela placenta, que podem induzir respostas pleiotrópicas sinérgicas que podem afetar profundamente a produção de proteínas da MEC. O aumento da expressão de fibronectina, laminina-1 e MMPs podem induzir resposta fibrótica e alterar a integridade da estrutura das células endoteliais placentárias, bem

como em outros tipos celulares (RUAN et al, 2002; RICHARDSON et al, 1995; ESTEVE et al, 2002). O aumento de MMPs podem também influenciar na angiogênese degradando moléculas da matriz, perdendo a rede celular e liberando fatores de crescimento sequestrados pela MEC (COUSSENS et al, 2001). Em suma, pela figura pode ser verificado o dano que a diabetes pode causar na placenta e como a mesma reage a esses insultos. Em ratos, o miométrio durante a gravidez possui quatro fases sequenciais. A primeira fase, no começo da gravidez, é caracterizado por hiperplasia das células do músculo liso. Na segunda fase, no meio da gestação, ocorre hipertrofia dessas células musculares e da síntese da MEC. Na terceira fase, no final da gravidez, as células assumem um fenótipo contráctil e finalmente, na quarta fase, as células musculares se tornam ativas e desencadeiam o parto (FAVARO et al, 2010). O crescimento miometrial e remodelamento durante a gravidez depende do aumento da síntese das proteínas da MEC (SHYNLOVA et al, 2004). Colágenos, elastinas e proteoglicanos tem sido detectados previamente no miométrio de mulheres grávidas (NISHINAKA & FUKUDA, 1991).

Essas alterações da matriz também podem ser verificadas nos próprios embriões de mães diabéticas. Esse aumento na expressão de componentes da MEC durante o desenvolvimento dos embriões estabelece uma causa nas anormalidades que ocorrem nas complicações crônicas da diabetes e propõe uma nova via de investigação para o mecanismo de teratogenicidade na DMG (CAGLIERO et al, 1993), ou seja, implica-se que essas alterações da MEC estariam envolvidas na teratogenicidade.

Assim, existem poucos relatos de alterações da MEC durante a DMG, com ênfase na placenta e pâncreas,. Além disto, há uma escassez de estudos que

relatam alterações da MEC na hipófise de mães diabéticas durante o período gestacional.

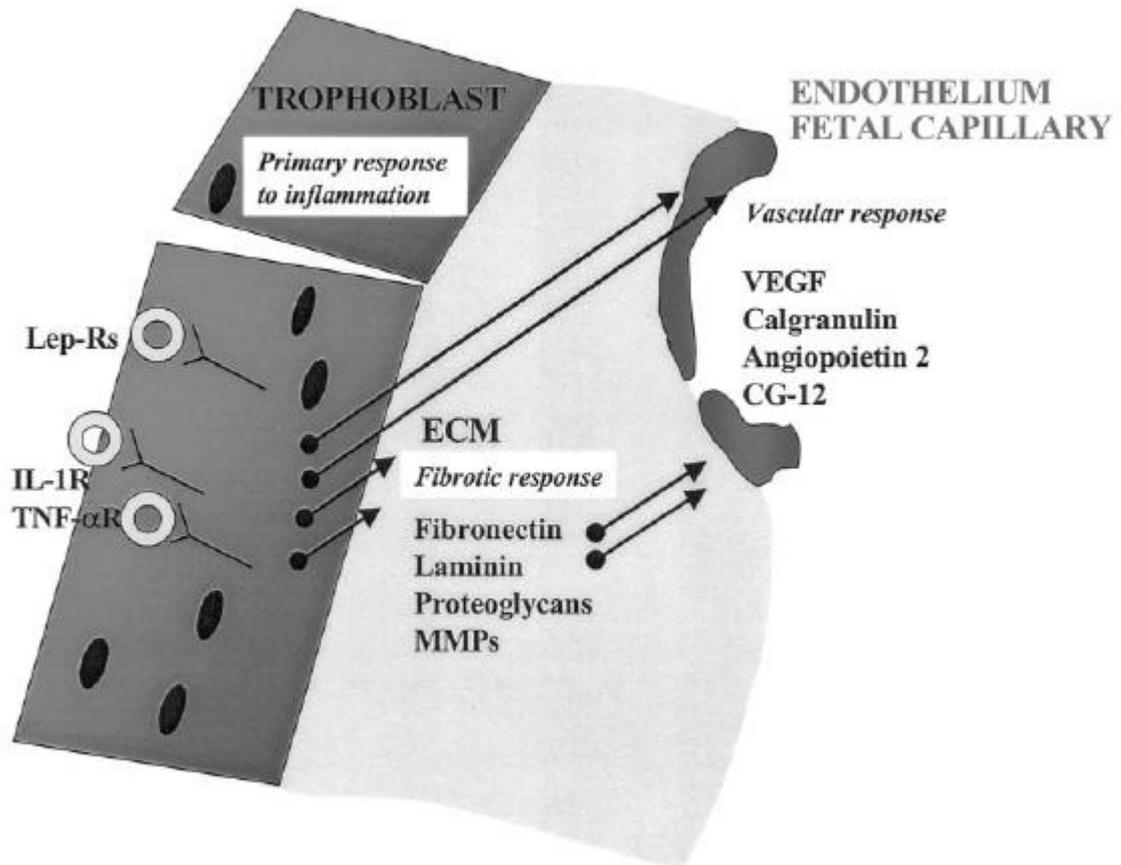


Figura 5. Respostas placentárias em resposta ao insulto da diabetes. A resposta primária à diabetes é o recrutamento de TNF- $\alpha$  , IL-1 e receptores de leptina presentes no sinciotrofoblasto do sangue materno. A transdução de sinal através desses receptores desencadeia uma cascata de eventos intracelulares levando a um excesso de componentes da MEC caracterizado por uma resposta fibrótica e reação vascular. A soma dos pontos de modificação a uma desorganização severa da estrutura da placenta pode ser verificada por essa figura. Lep-Rs, isoforma curta do receptor de leptina; IL-1R, receptor de IL-1. FONTE: RADAELLI et AL., 2003.

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo geral**

Investigar os aspectos bioquímicas e histopatológicas de órgãos reprodutivos e na matriz extracelular hipofisária, durante e no final da gestação de ratas diabéticas.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as alterações bioquímicas de ratas grávidas diabéticas ou não durante e no final da gestação.

- Analisar as alterações histopatológicas de pâncreas e placentas de ratas grávidas diabéticas ou não, durante e no final da gestação

- Analisar a estrutura da matriz extracelular de hipófises de ratas grávidas diabéticas ou não, durante e no final da gestação

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizadas ratas fêmeas neonatas (*Rattus norvegicus*), da variedade Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais (mães e crias) foram adaptados e durante todo o período experimental foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno (43x30x15) em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), A alimentação foi feita com ração comercial de composição conhecida (Nuvilab-CR1, NUVITAL Nutrientes Produtos Veterinários Ltda. – Curitiba – PR) e água esterilizada oferecida *ad libitum*. O alimento, a água para beber e a serragem que serve de forragem nas gaiolas passaram pelo processo de esterilização antes de serem oferecidos aos animais. O biotério e as gaiolas foram limpos e desinfetados com solução de cloro, semanalmente. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo dois dias antes dos experimentos e ficaram agrupados em um número máximo de cinco animais por gaiola. Os experimentos foram conduzidos entre 07h00min e 19h00min.

Todos os procedimentos experimentais foram 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 da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (no.protocolo 002/2010)(Anexo I).

## 2.2 Drogas e soluções

3.3.1. Cloridrato de quetamina - Fort Dodge, BR

3.3.2. Xilasina 2% s/v - Synthec do Brasil

3.3.3. Streptozotocina - SIGMA *Chemical Company*, St. Louis, MO, USA

3.3.4. Tampão citrato - Laboratório Simiens-SP

3.3.6. Formol - Laboratório Simiens-SP

3.3.7. Solução salina estéril 0,9% - Halex Istar, BR

## 2.3 Protocolos experimentais

No segundo dia de vida, os animais foram divididos em dois grupos: a) animais diabéticos tratados com estreptozotocina, b) animais tratados com tampão citrato. Para tanto, as ratas foram devidamente pesadas e mantidas em jejum durante 4 horas antes da administração de quaisquer drogas. Os animais que foram induzidos diabetes, foram tratados com estreptozotocina diluída em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5, na dose de 90 mg/Kg de peso corpóreo e administradas via intraperitonal, seguindo o modelo experimental de diabetes neonatal ( PERMUTT et AL,1984;MALOFF & BOYD,1986). As ratas controle receberam pela mesma via de administração tampão citrato em volume equivalente à droga diabetogênica calculada para uma rata do mesmo peso. A ração foi novamente oferecida aos animais 30 minutos após o tratamento.

Aos 21 dias de vida, cada rata foi pesada e a glicemia foi determinada colhendo-se uma gota de sangue por punção com lanceta em uma das patas

traseiras e pressionada levemente para que a gota de sangue fosse capilarizada pela glicofita, que foi lida em glicosímetro específico (*One Touch Ultra* –Johnson & Johnson). Somente permaneceram para o acasalamento, os animais cuja diabetes foi confirmada.

A partir do dia 60º de vida, após pesagem e dosagem da glicemia 68 ratas foram colocadas no regime/proporção 2:1 com o rato procriador macho Wistar para cruzamento. Ao final do 2º dia, foi verificada a confirmação da prenhez através da pesquisa de esperma no canal vaginal. O procedimento de visualização dos espermatozóides consistiu em injetar delicadamente 30 µl de soro fisiológico com auxílio de micropipeta na vagina de cada animal e logo em seguida, visualizado o esfregaço em uma lâmina comum. O objetivo de tal procedimento foi visualizar as células espermáticas através do microscópio de luz (Axiolab Standard 2.0, Carl Zeiss) usando aumento final de 100 X. A presença de espermatozóides indicou o primeiro dia de gravidez (dia zero).

Os animais CTR e DIAB foram subdivididos em quatro grupos:

- Ratas controle sacrificadas no 11º dia de prenhez (CTR 11D);
- Ratas controle sacrificadas no 21º dia de prenhez (CTR 21D);
- Ratas diabéticas sacrificadas no 11º dia de prenhez (DIAB 11D) e
- Ratas diabéticas sacrificadas no 21º dia de prenhez (DIAB 21D).

A partir desses dias, foram realizados todos os procedimentos a seguir descritos.

#### **2.4 Coleta de sangue para dosagens bioquímica e glicêmica**

Os animais, previamente a coleta de sangue, permaneceram em jejum durante 4 horas. Após devida anestesia com quetamina e xilasina, foram coletadas em torno de 2 ml de sangue por via caudal. Logo em seguida, foi centrifugado à 3000rpm por 3 minutos para separação do soro. O material foi imediatamente encaminhado para análise dos níveis de glicemia em jejum, colesterol total e triglicerídeos, utilizando kits comercialmente disponíveis (Wiener e Usch, *Life Sciences Inc.*).

#### **2.5 Coleta dos órgãos para histopatologia**

Nos dias 11 e 21, os animais dos seus respectivos grupos, foram anestesiados com quetamina e xilasina para retirada de órgãos para análise histopatológica. Após tricotomia e anti-sepsia da pele da região ventral dos animais, foi realizada uma incisão na pele, e posterior incisão da camada muscular e peritoneal, para retirada do pâncreas, útero, placenta e hipófise. Durante a coleta, os implantes uterinos foram comparados com o número de crias removidas para avaliar possíveis perdas. No mesmo animal, foi realizada a craniotomia e retirada as hipófises. Os órgãos foram imediatamente imersos em formol tamponado a 10% e encaminhados para emblocamento. Os cortes histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo Minot. Após cortado o material incluso em parafina, o mesmo foi desparafinado e hidratado para posterior coloração, empregando-se diferentes colorações como descrito abaixo (BEÇAK & PAULETE, 1976).

Colorações utilizadas:

## **1- COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA**

Essa coloração visa analisar a arquitetura morfológica. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris por 50 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos, 2 vezes com água destilada e corados com eosina, durante um minuto. Após a coloração, foram lavados com água destilada, desidratadas em série crescente de etanol (70% a 100%, por 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes de 5 minutos cada etapa) e montados com Entelan (BEÇAK & PAULETE,1976).

## **2- COLORAÇÃO COM TRICRÔMIO DE MASSON**

Essa coloração visa analisar a arquitetura morfológica e colágeno. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com hematoxilina de Regaud durante 30 min, a 50° C, foram lavados com água destilada, depois água corrente durante 5 min. Em seguida, foram corados durante 5 minutos na fucsina ácida de Masson, enxaguar com água destilada, corar com solução aquosa a 1% de ácido fosfomolibdico e logo após, com azul de anilina acético de Masson durante 2 a 4 min. Após a coloração, foram lavados com água destilada, desidratadas em série crescente de etanol (70% a 100%, por 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes de 5 minutos cada etapa) e montados com Entelan (BEÇAK & PAULETE,1976).

## **3- COLORAÇÃO COM PICROSIRIUS**

A coloração de Sirius Red analisa a matriz de fibras colágenas do tecido. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram corados com picrosirius por 1 hora, passados por uma solução de HCl 0,01 N por 2 minutos e lavados em água destilada durante dois minutos. Foram então corados com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavados em água corrente por 10 minutos e desidratados em soluções crescentes de etanol (90 a 100% por 5 minutos cada etapa), diafanizados com xilol (2 vezes de 5 minutos cada etapa) e montados com Entelan (MONTES & JUNQUEIRA, 1991; MONTES, 1996).

## 2.6 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e avaliados por análise de variância com um critério (*ANOVA – One way*). Quando encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o teste para comparações múltiplas de Newman-Keuls foi aplicado. O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico *GraphPad Prism version 5.00 for Windows, San Diego California USA*.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 **Peso maternal e número de implantes em ratas diabéticas e não diabéticas durante e no final da gravidez**

Os grupos diabéticos apresentaram menor peso materno, independente do dia, estatisticamente significativo em relação aos grupos controles do 11º e 21º dia (Fig.6).

Foi verificado menor número de implantes foi nos grupos diabéticos, em ambos os períodos da gestação, quando comparado com os grupos controle do 11º e 21º dia(Fig.7).

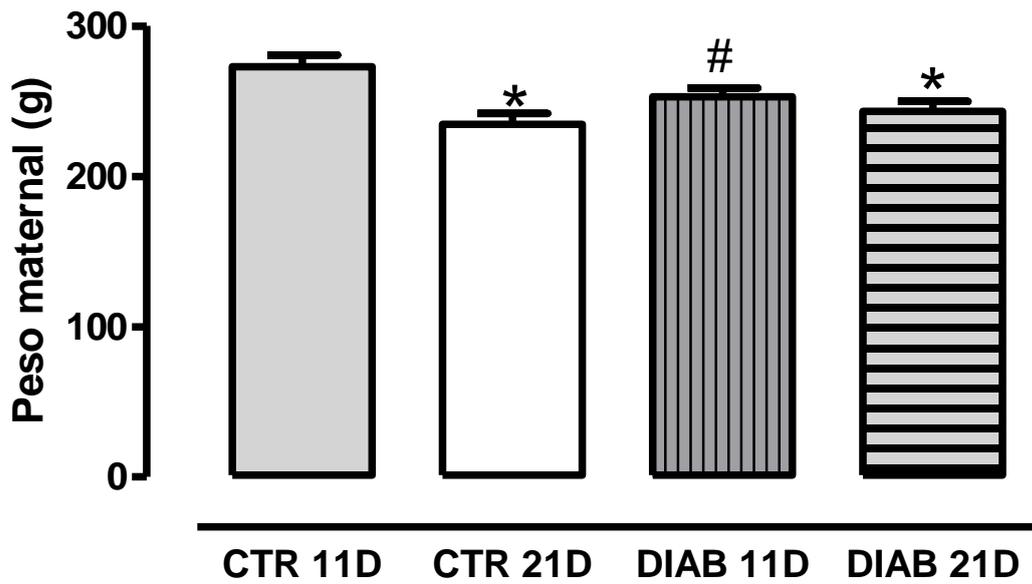


Figura 6: Peso materno durante a gravidez de ratas diabéticas (DIAB) e não-diabéticas (CTR) no 11º e 21º dia.

\* diferença significativa em relação ao grupo Controle 11D,  $p < 0,05$

# diferença significativa em relação ao grupo Controle 11D,  $p < 0,05$

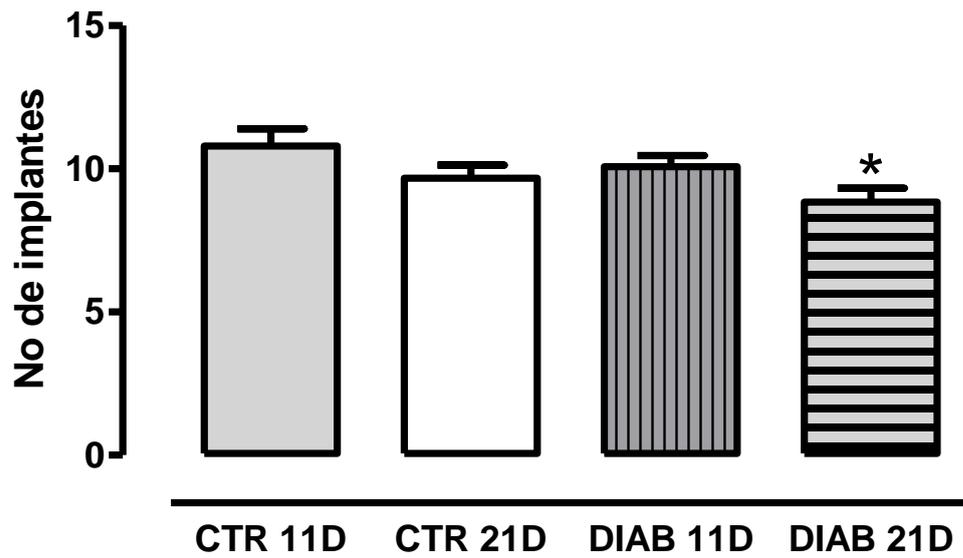


Figura 7 : Número de implantes durante a gravidez de ratas diabéticas (DIAB) e não-diabéticas (CTR) no 11<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia.

\* diferença significativa em relação ao grupo Controle 11D,  $p < 0,05$

### **3.2 Perfil bioquímico maternal em ratas não diabéticas e diabéticas durante e no final da gravidez**

A glicemia e o colesterol total das ratas diabéticas grávidas, tanto do 11º dia quanto do 21º dia, foram maiores e estatisticamente significativo em relação aos grupos controle, de qualquer período da gestação(Fig.8 e 9).

Não foi verificado diferença estaticamente significativa em relação aos níveis de triglicerídeos em todos os grupos diabéticos e não-diabéticos (Fig.10).

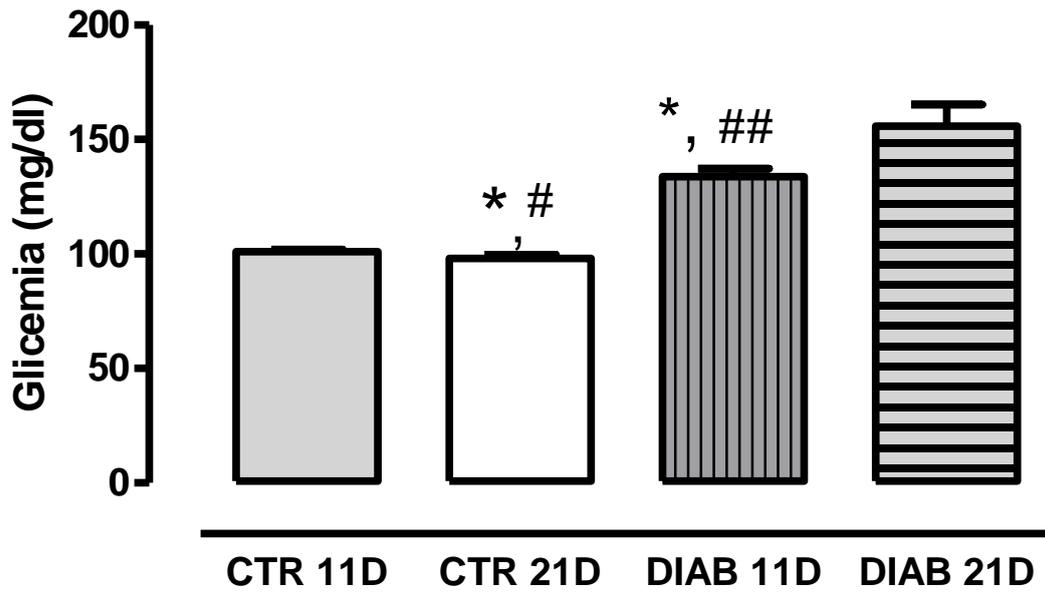


Figura 8: Glicemia de ratas diabéticas (DIAB) e não diabéticas (CTR) no 11<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia.

# diferença significativa em relação ao grupo Diabético 11D,  $p < 0,05$

## diferença significativa em relação ao grupo Diabético 11D,  $p < 0,05$

\* diferença significativa em relação ao grupo Diabético 11D,  $p < 0,05$

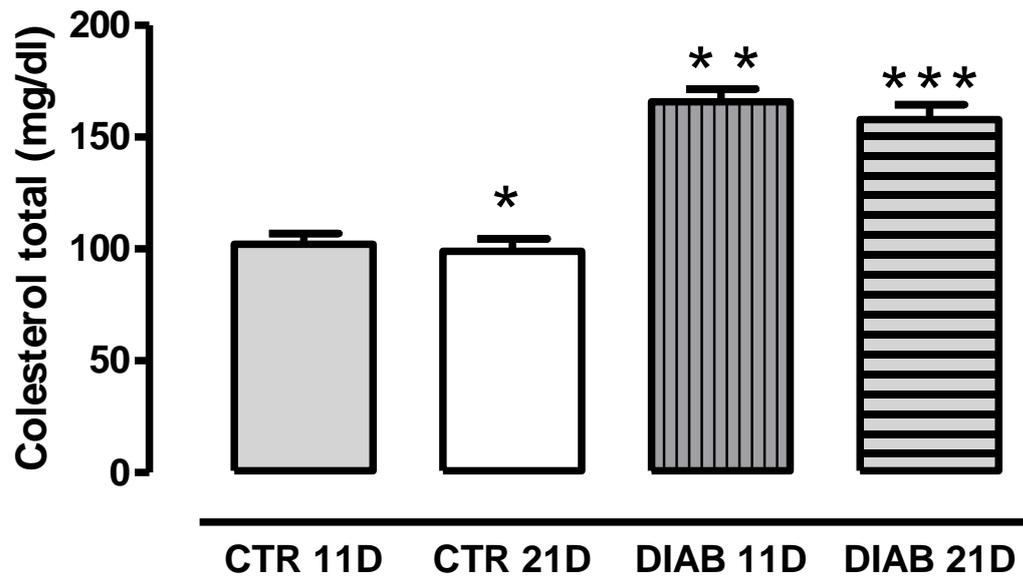


Figura 9: Colesterol total de ratas diabéticas (DIAB) e não diabéticas (CTR) no 11<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia.

\* diferença significativa em relação ao grupo Diabético 11D,  $p < 0,05$

\*\* diferença significativa em relação ao grupo Diabético 21D,  $p < 0,05$

\*\*\* diferença significativa em relação ao grupo Diabético 21D,  $p < 0,05$

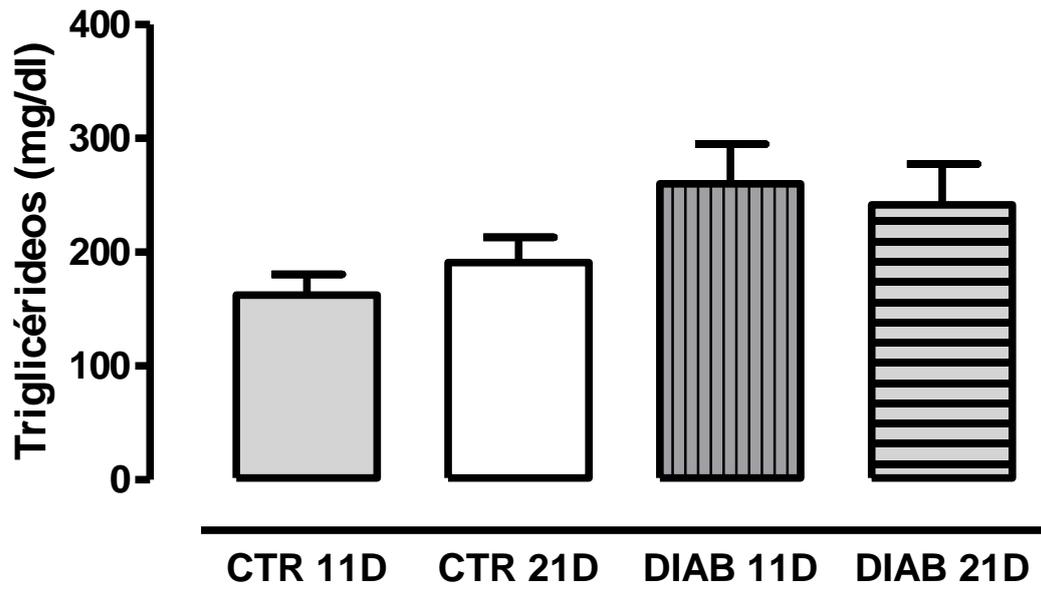


Figura 10: Triglicérides de ratas diabéticas (DIAB) e não diabéticas (CTR) no 11<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia.  $P > 0,05$ .

### **3.3 Análise histopatológica do pâncreas de grávidas não diabéticas e diabéticas durante e no final da gestação**

Os animais diabéticos no 11<sup>o</sup> dia de gestação apresentaram vacuolização citoplasmática das células das ilhotas de Langerhans, variando de leve a moderada. Também foi evidenciado infiltração linfocitária da ilhota, concomitante a maior concentração de linfócitos na luz de vasos sanguíneos adjacentes. Outras alterações como necrose de células isoladas e insulite associada também foram verificadas.

O grupo de animais diabéticos do 21<sup>o</sup> dia de gestação apresentaram vacuolização citoplasmática moderada das células das ilhotas de Langerhans. Foi evidenciado infiltração linfocitária da ilhota, necrose de células isoladas e insulite associada. Na luz dos vasos adjacentes é escassa a presença de células inflamatórias. Há espessamento evidente da parede de vasos sanguíneos e fibrose periductal e perivascular(Fig.11) .

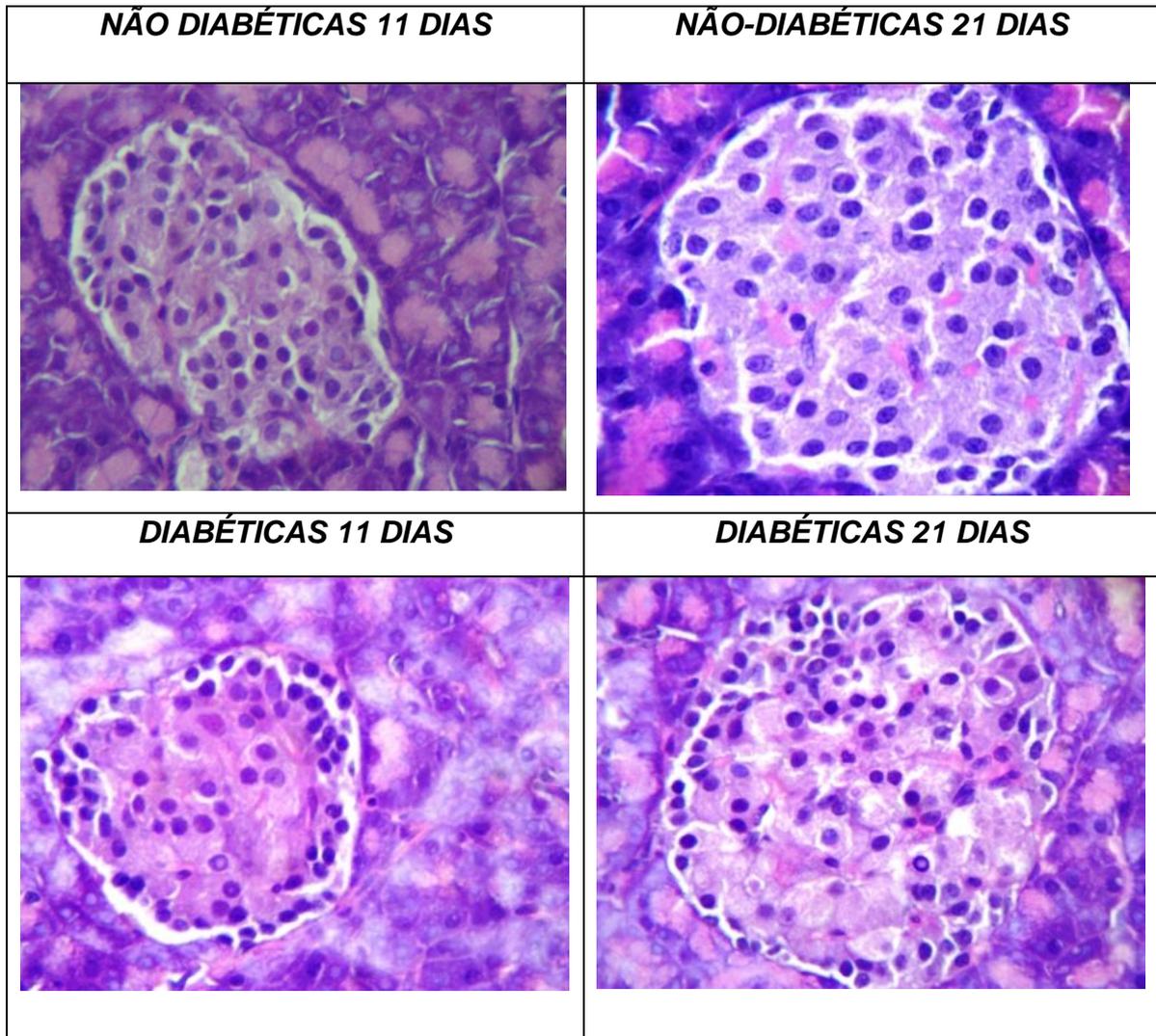


Figura 11 – Histopatológico de pâncreas de ratas diabéticas ou não, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por hematoxilina e eosina (HE, 400x). Evidenciou-se 11º dia de animais diabéticas, vacuolização infiltração linfocitária, necrose de células isoladas e insulite. No 12º dia de animais diabéticas, células inflamatórias, espessamento da parede dos vasos sanguíneos e fibrose periductal e perivascular.

### **3.4 Análise histopatológica placentária não diabéticas e diabéticas durante e no final da gestação**

Ratas diabéticas grávidas de 11 dias de gestação apresentaram congestão na interface materno-fetal e também uma concentração de vasos maternos e fetais, os quais se mostraram mais delgados e com formato irregular. Foi evidenciado necrose de trofoblastos gigantes isolados com vacuolização de espongiotrofoblastos, indicando degeneração destas células.

As lesões observadas nas ratas diabéticas grávidas de 21 dias foram semelhantes, mas com intensidade bem maior. Foram visualizados trofoblastos gigantes, além de necrose e vacuolização difusa (Fig.13)

Nos grupos de animais não-diabéticos, tanto dos grupos 11<sup>o</sup> quanto do 21<sup>o</sup> dia, não foram evidenciadas nenhuma alteração morfológica anormal (Fig.12).

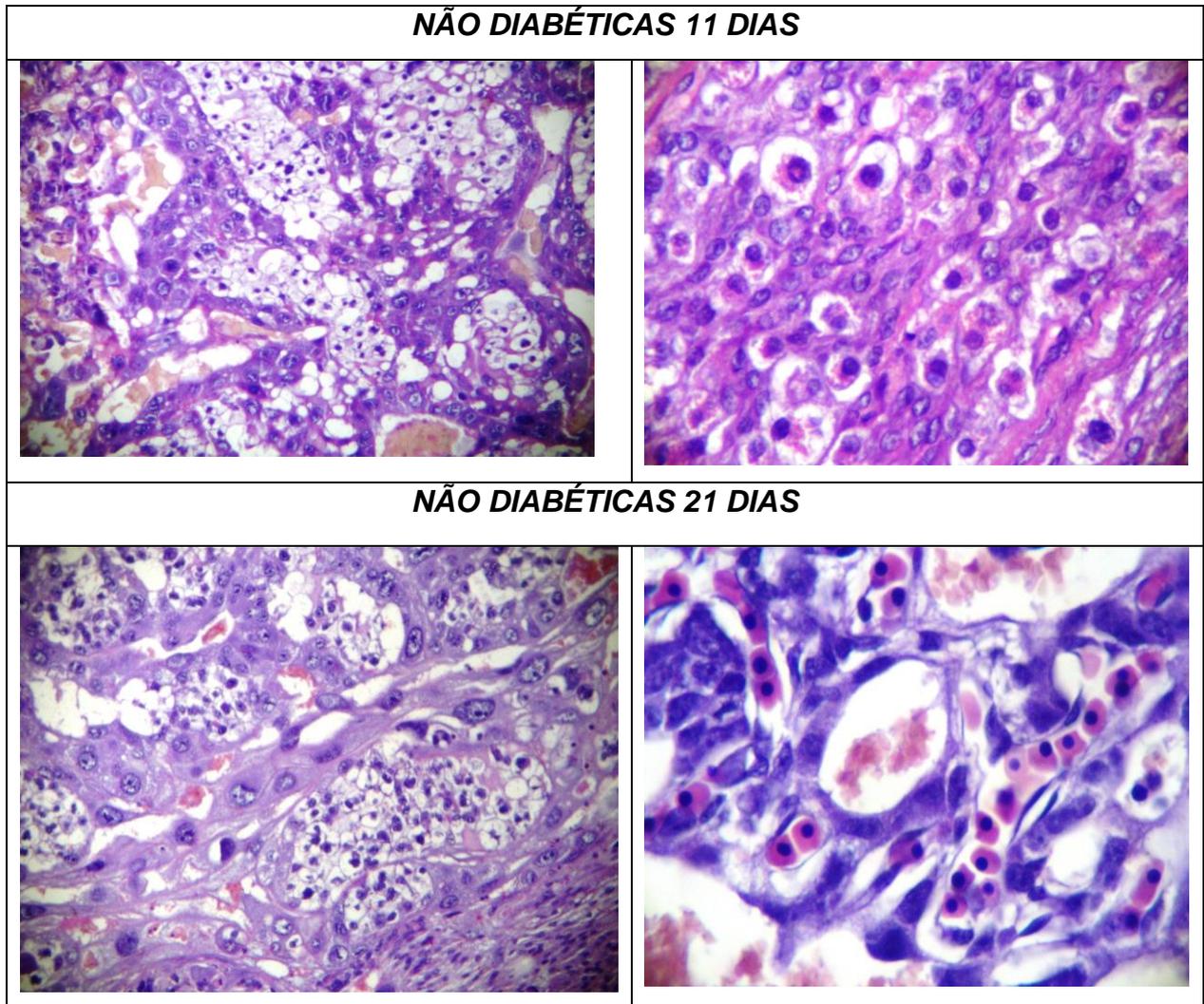


Figura 12 – Histopatológico de placenta de ratas não-diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Hematoxilina e Eosina (HE, 400x). Não foram evidenciados nenhuma alteração morfológica anormal.

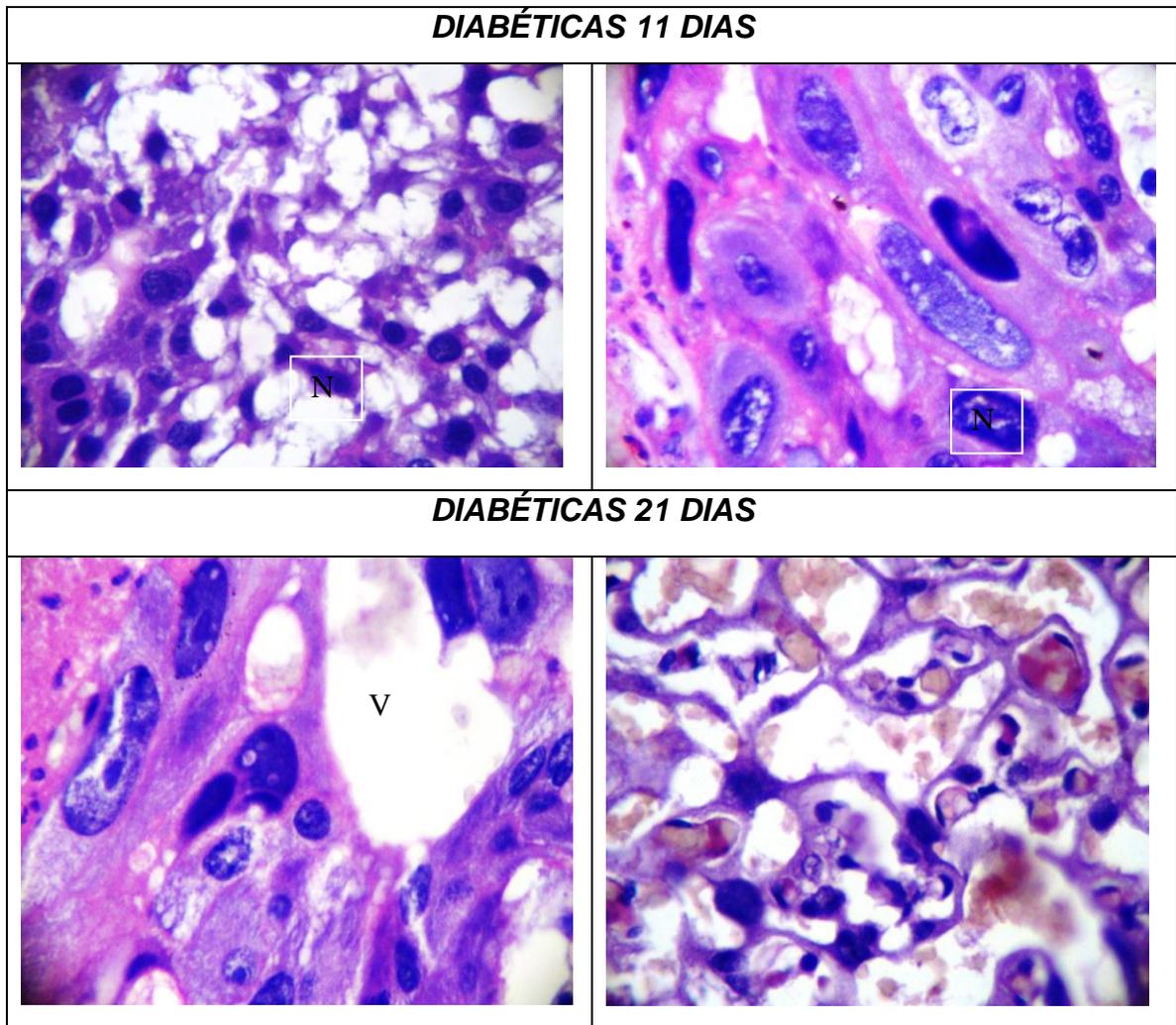


Figura 13 – Histopatológico de placenta de ratas diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por hematoxilina e eosina (HE, 400x). Legendas: N, necrose; V, vacuolização. Evidenciou-se no 11º dia de ratas diabéticas congestão na interface materno-fetal, mais delgada e irregular, necrose de trofoblastos gigantes isolados, vacuolização de espongiotrofoblastos e degeneração. No 21º dia da gestação de animais diabéticas, lesões semelhantes com intensidade maior e trofoblastos gigantes, necrose e vacuolização difusa.

### **3.5 Análise histopatológica e da matriz extracelular de hipófises de ratas não diabéticas e diabéticas durante e no final da gravidez**

O grupo controle não diabético do dia 11 não apresentou espessamento da matriz extracelular, e apresentou coloração de fibras colágenas verdes (tipo III) de maneira sutil e em formas de feixes. As células cromóforas podem ser melhor visualizadas na periferia do órgão (Fig.14).

As adeno-hipófises das ratas diabéticas de 11 e 21 dias de gestação apresentaram maior concentração de células cromóforas, comparativamente aos animais controle. Os animais diabéticos do 11<sup>o</sup> dia apresentaram maior espessamento de fibras de colágeno com tonalidade avermelhada (tipo I). As células cromóforas apresentaram um aumento em seu número e mudança no padrão de formação celular. Nesses animais, as células formaram um aspecto aglomerado, permanecendo no meio do tecido. Seu citoplasma também se apresentou mais denso. Foi verificado nítido remodelamento do tecido em parte do órgão e mudança no parênquima tecidual (Fig.14 e 15).

Os animais diabéticos do 21<sup>o</sup> dia apresentaram todas as características supracitadas, porém de maneira amplificada (Fig.14 e 15).

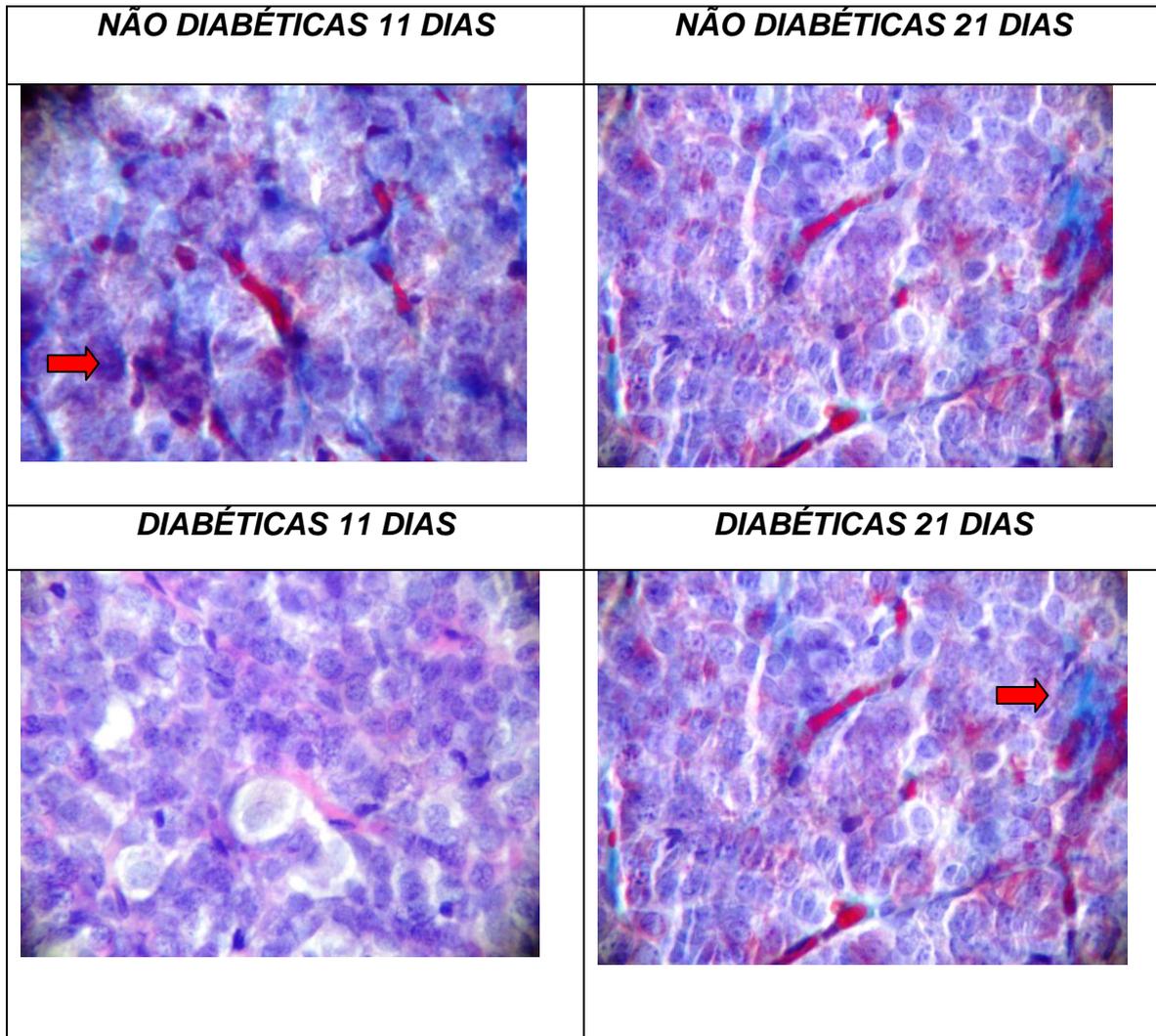


Figura 14 – Histopatológico de hipófises de ratas diabéticas ou não, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Masson (Masson, 200x). Setas vermelhas: Indicação de fibras de colágeno coradas em azul .

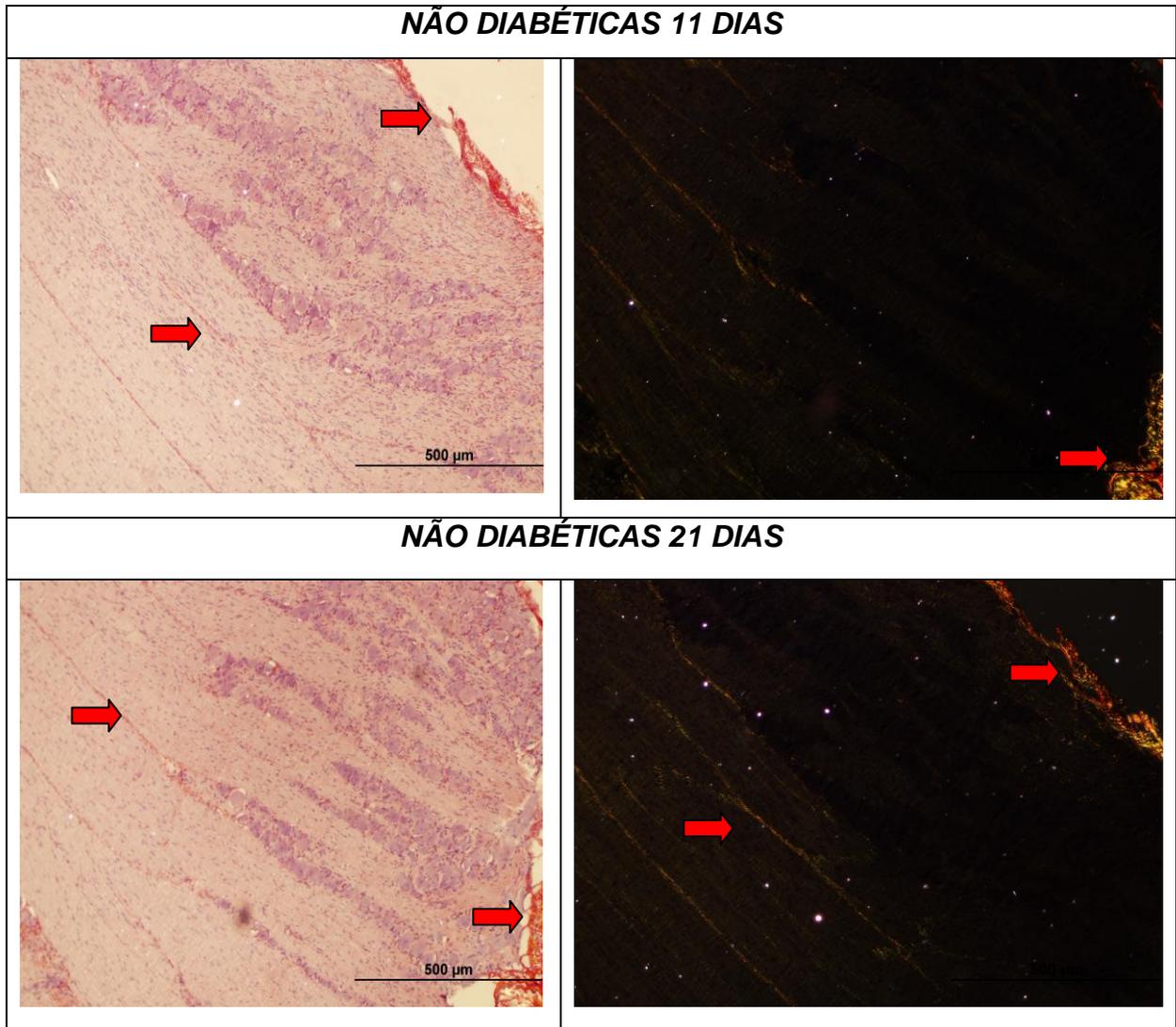


Figura 15 – Histopatológico de hipófises de ratas não diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Picrosirius (Masson, 100x). Setas vermelhas indicam as fibras de colágeno marcadas em vermelhas e amarelo.

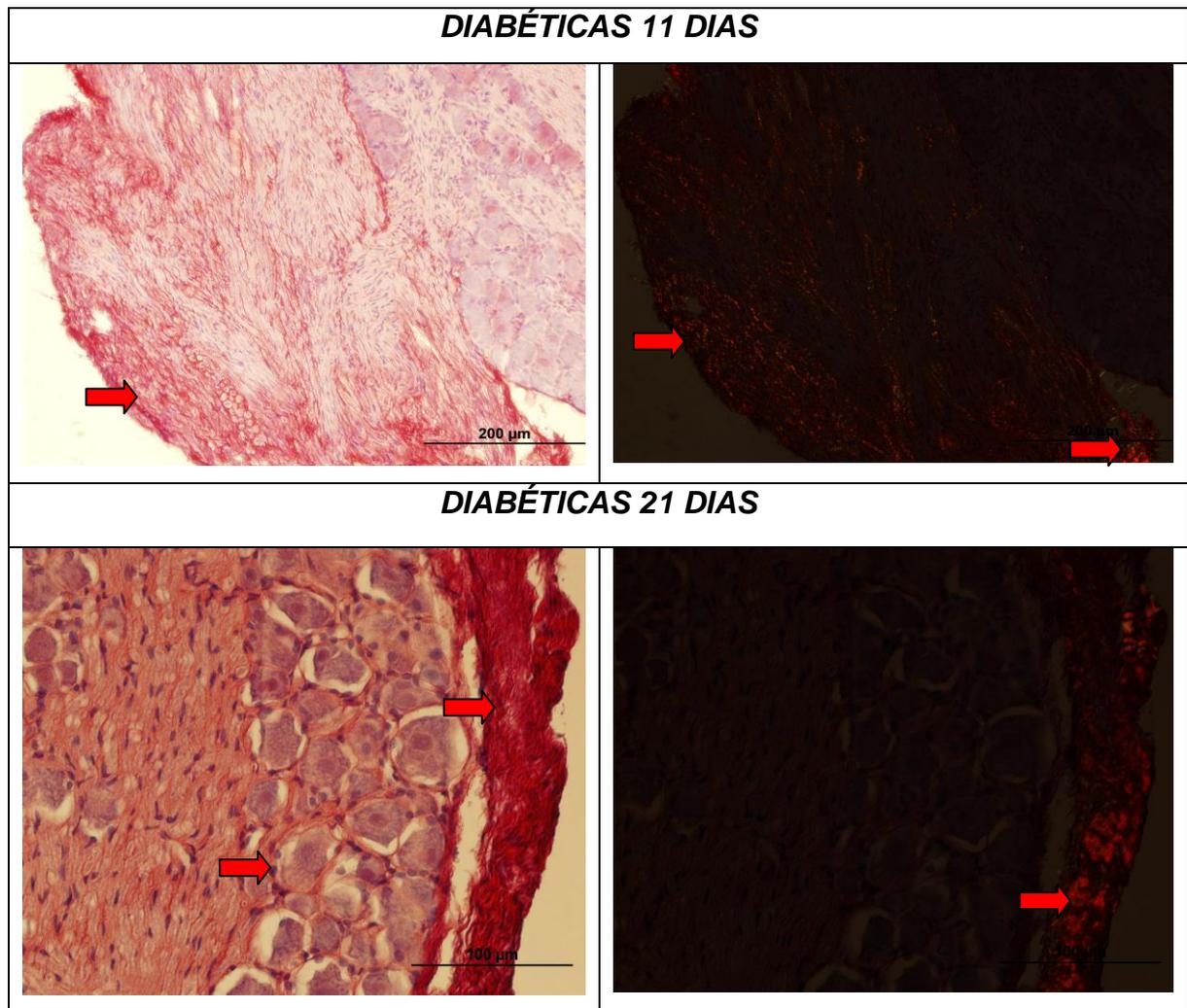


Figura 16 – Histopatológico de hipófises de ratas diabéticas, durante (11D) ou final (21D) da gestação corados por Picosirius (Masson, 200x e 600x). No 11º e 21º dia dos animais não-diabéticos foi evidenciado maior concentração de células cromóforas. Nos animais diabéticos do 11º dia houve maior espessamento de fibras de colágeno (tipo I) com tonalidade avermelhada, citoplasma denso e remodelamento do tecido. No 21º dia, ocorrem as mesmas alterações de maneira amplificada.

#### 4 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste estudo sugerem que ratas diabéticas, independente do período gestacional (seja no 11<sup>o</sup> dia, quanto no 21<sup>o</sup> dia) apresentem hiperglicemia, aumento de colesterol total, redução de peso e de número de implantes, porém sem alterações nos níveis de triglicerídeos. Entretanto, animais diabéticos que se encontram na fase mais avançada da gestação, aos 21 dias, apresentam diversas alterações pancreáticas, como vacuolização citoplasmática de ilhotas, necrose e insulite, alterações placentárias, como necrose, degeneração tecidual e vacuolização e alterações hipofisárias, como aumento na concentração de células cromóforas. Em especial, foi verificado remodelamento tecidual da matriz extracelular da hipófise. Essa mudança pode ser atribuída ao estado de diabetes mellitus, uma vez que os animais controle apresentaram fibras colágenas verdes, em feixe e em pouca quantidade, ao contrario do que pode ser verificado nos animais diabéticos, que foram fibras colágenas espessas, vermelhas e com formato em rede.

A DM2 é uma alteração metabólica caracterizada por hiperglicemia, secreção insuficiente de insulina e insensibilidade a este hormônio. Sua incidência é associada com maiores taxas de morbidade e mortalidade. Na gravidez complicada pela diabetes, hiperglicemia e alterações no metabolismo lipídico estão associados com ambas complicações maternas e fetais (ROLO et al, 2006; METZER et al, 2002; MERZOUK et al, 2000) .

No presente estudo, foi verificado que as ratas diabéticas, dos dias 11 e 21, prenhas apresentaram um quadro de hiperglicemia, aumento de colesterol total, porém sem alteração nos níveis de triglicerídeos, quando comparado com os grupos não-diabéticas, dos mesmos dias. O pâncreas desses animais diabéticos do dia 11

apresentaram vacuolização citoplasmática das ilhotas de Langerhans, de leve a moderada, insulite, necrose e infiltração linfocitária. Os animais do mesmo grupo, do 21º dia , apresentaram lesões mais severas, quando comparadas com a do dia 11, apresentando, além das características acima, necrose, espessamento de vasos e fibrose periductal e perivascular.

Aparentemente a redução de peso dos animais diabéticos durante a gravidez, independente do período, pode estar relacionada com alterações no hormônio de crescimento causado pela indução de diabetes no período neonatal. A DM descompensada em seres humanos e em animais de experimentação está frequentemente relacionada com alteração no crescimento corporal (KANAKA-GANTENBEIN et al. 2003), perda de músculo (SWANSTON-FLAT et al, 1990) e perda de proteínas do tecido (CHATTERJEA & SHINDE, 2002). TAKADA e colaboradores (2007) observaram que ratos com indução de diabetes neonatal com estreptozotocina desenvolvem condições clássicas de diabetes, como hiperglicemia, hipoinsulinemia e resistência insulínica. O quadro de diabéticos desenvolvido pode ser comparado com diabetes moderada pois os níveis de glicemia permaneceram entre 120 e 300 mg/dl, resultados compatíveis com outros estudos (IESSI et al, 2012; ), inclusive com o primeiro estudo a definir este parâmetro (PORTHA et al, 1979; PORTHA AND SERRADAS, 1991; SINZATO, 2009; SAITO et al., 2010; IESSI et al.,2010).

No entanto, MOVASSAT e colaboradores (1997) demonstraram que ratos com indução neonatal de diabetes, atinge a vida adulta com níveis glicêmicos normalizados. Isso pode ser atribuído ao fato de que pode ocorrer regeneração de células beta-pancreáticas por outros mecanismos como as alterações hormonais,

como a liberação de lactogênio placentário, estrogênio e progesterona (TRIADOU et al. 1982), porém isso ainda não foi verificado em nossos animais.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, foi verificado um aumento nos níveis de colesterol total nos animais diabéticos nos dias 11 e 21 (gestação tardia) da prenhez em relação aos grupos controle, porém não houve alteração nos níveis de triglicerídeos em nenhum dos grupos.

Existem poucos estudos, tanto em animais quanto em seres humanos, focando o metabolismo de lipoproteínas durante o estado de diabetes mellitus na gravidez. Na gestação não-diabética, há uma redução na formação da gordura maternal na gestação tardia (PIPE et al, 1979; KNOOP et al, 1979). Este é resultado de um aumento na lipólise e tecido adiposo, aonde nesse período, há maior circulação de combustíveis lipídicos para as necessidades maternas na presença de aumento de demanda fetal por glicose e aminoácidos (SWESLOKI & KROMER, 1989). A lipólise é aumentada para promover uma fonte alternativa de combustível para produção de energia (KISSEBAH, 1992). Evidências recentes sugerem que a duração da diabetes, alterações de hormônios gestacionais e o tratamento utilizado para tratar pacientes grávidas diabéticas, podem contribuir para os efeitos diversos da DMG (KNOOP et al, 1994). Alguns estudos correlacionam o aumento da prolactina plasmática e estrogênio durante a gravidez com o aumento de triglicerídeos e a progesterona, foi correlacionada com o aumento do colesterol total (MILLER et al, 1990;GLUEKE et al,1975). Entretanto, estes hormônios ainda não foram dosados em nosso estudo.

KNOOP et al (1994) sugerem que a duração da diabetes durante a gravidez contribua para a síntese de hormônios placentários e hiperlipidemia. Esse efeito já foi demonstrado in vitro (HAUGE et al,1993). COUCH et al (1998) verificaram que

houve aumento dos níveis de prolactina, progesterona e estradiol nas pacientes diabéticas e grávidas e todos estão envolvidos no metabolismo de triglicerídeos. A interação entre estrógeno e progesterona pode favorecer hipertrigliceridemia .

Quanto as alterações histomorfológicas pancreáticas, ratas diabéticas grávidas apresentaram vacuolização citoplasmática das ilhotas de Langerhans, infiltração leucocitária, necrose, espessamento de vaso, fibrose periductal e perivascular. Estes achados podem ser atribuídos ao tratamento com estreptozotocina neonatal, que induziu danos permanentes desse órgão. Outra hipótese seria o aumento do estresse oxidativo pancreático associado à progressão da diabetes mellitus (KAKKAR *et al.*, 1998) e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido hipotetizado como um mecanismo adicional de morte celular de células beta na patogênese dessa patologia (Robertson, 2004). Alguns estudos recentes, também sugerem que a diabetes seja uma patologia de cunho inflamatório e aparentemente, durante a gravidez, esse processo inflamatório é amplificado e disseminado, o que podem parte explicar essas alterações vistas.

No presente estudo, os animais diabéticos, independente do período, apresentaram menor peso materno e número de implantes, sendo que o contrário foi visto nos grupos de ratas não-diabéticas grávidas. Pode-se atribuir o menor peso, como consequência do menor número de implantes e vice-versa. A placenta dos animais diabéticos no final da gestação (21 dias) apresentou, vacuolização difusa, variação na concentração de vasos materno-fetais, lesões necróticas e degenerativas mais severas que as do dia 11. Essa redução de peso maternal pode ser atribuída a danos causados pelas células beta-pancreáticas induzidas pela estreptozotocina, que reduz a secreção de insulina e outras alterações hormonais

como hormônio do crescimento e IGF-1, que também contribuem para redução do peso (KIM et al, 2006).

A placenta é crucial para transferir nutrientes da mãe para o feto. Todas essas alterações no tecido placentário visualizadas durante a diabetes podem comprometer os mecanismos de troca materno-fetal, impedindo que o embrião tenha um suprimento adequado de alimento, impedindo que tenha o desenvolvimento adequado e reduzindo o número de implantes. Alterações na placenta durante o diabetes mellitus foram verificadas em seres humanos e em ratas (DIAMANT et al, 1991; GEWOLB et al, 1986; PADMANABHAN et al, 1990), porém não em período diferentes da gestação. O agravamento da celularidade a medida que progride a gestação pode ser atribuída ao maior aumento das atividades metabólicas como um todo da gestação, como flutuações hormonais mais frequentes.

Nas mulheres com DM descontrolada, abortos são frequentes (ERIKSSON et al, 2000). Sabe-se que, em ratas diabéticas, há um número de reabsorções maior e um aumento nas taxas de perdas pós-implantação desencadeando uma redução no número de fetos com vida (VOLPATO et al, 2008). O aumento no tamanho da placenta, que normalmente ocorre é insuficiente para o desenvolvimento fetal.

Outras hipóteses podem explicar esse aumento de perdas na fase de implantação embrionária, como o fato de que a hiperglicemia poderia alterar as células totipotentes desde o zigoto até um ponto de restauração, prevenindo que haja desenvolvimento embrionário. Foi verificado que na diabetes moderada gestacional, há uma redução na contratilidade uterina, anormalidades durante a gravidez e menor número de implantes, corroborando nossos dados (JAWERBAUM et al, 1994). Alguns pesquisadores também atribuem essas alterações à uma alteração hidroeletrolítica na placenta. Foi demonstrado que há uma redução no

fluxo materno-fetal unidirecional de cálcio e magnésio através da placenta de ratas diabéticas. Essa redução do fluxo de cálcio pode, em parte, explicar o efeito da expressão do transporte de componentes da placenta envolvidos no transporte de cálcio (HUSAIN et al, 1994), o que pode contribuir para formação dos nossos achados de vacuolização intracitoplasmática.

Outro fator seria a ocorrência de alterações na composição bioquímica da placenta, como alterações lipídicas (BITSANIS et al, 2006) e da matriz extracelular durante a diabetes mellitus gestacional. Para que o blastocisto possa se implantar, células de trofoblastos tem que invadir o estroma endometrial e migrar através da MEC maternal. Sabe-se que a diabetes tem um efeito direto sobre a distribuição e expressão de diversas moléculas da MEC na placenta, como colágenos do tipo I e III, os proteoglicanos, decorin e biglicano, estão distribuídos ao longo da placenta em diferentes estágios, expressão de laminina reduzida no final da gravidez e fibronectina é detectada somente no termo. Além disso, a fibronectina pode ser detectada na região do labirinto de placenta de ratas diabéticas em vários estágios, sugerindo que alterando o microambiente da interface materno-fetal, a diabetes pode desencadear anormalidades no desenvolvimento da prole (GIACHINI et al, 2007).

Finalmente, investigamos mudanças na matriz extracelular de hipófises de ratas diabéticas grávidas, nos dia 11 e 21, através do estudo de um de seus componentes, o colágeno. Existem várias técnicas de colorações que conseguem diferenciar colágeno e fibras musculares. Algumas abrangentes, como as tricrômicas de Mallory e Masson, e outras mais específicas como o Picrosirius.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que demonstra o remodelamento da MEC em hipófise de ratas diabéticas ao longo da gravidez. Foi verificado que nas ratas prenhas sem diabetes, a hipófise apresentou menos células

cromóforas, com feixes de fibras de colágeno em verdes (tipo III) e sutis, sem espessamento da matriz extracelular. No entanto, a hipófise de ratas diabéticas do dia 11 apresentou uma quantidade maior e em forma de aglomerado de células cromóforas, citoplasma mais denso com nítido remodelamento tecidual da matriz extracelular, aumento da espessura da MEC e fibras de colágeno em vermelho (tipo I), sendo que no final da gestação (21º dia), todas essas características encontram-se potencializadas.

A MEC compromete uma variedade de proteínas versáteis e polissacarídeos arranjados na rede celular associada com superfície. Ela é requisitada para muitas funções celulares especializadas e consiste em várias combinações de moléculas como colágenos, elastina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que formam tanto fibras ou poros. Proteínas multiadesivas também são importantes constituintes da MEC e receptores de superfície celular, como os receptores de prolactina, também se ancoram na MEC (ALBERTS et al. 1994). Entretanto, devido a gama de componentes presentes na MEC, iniciamos o estudo pelas fibras de colágeno.

As fibras de colágeno do tipo I são relativamente espessas (2 a 10 µm) e em cortes histológicos, elas se apresentam intimamente amontoadas e fortemente birrefringentes. Já as fibras de colágeno tipo III (fibras de reticulina) são fibras mais individuais e finas (0,5 a 1,5 µm) e fracamente birrefringentes (MONTES & JUNQUEIRA,1991). Ambos estão presentes em grandes quantidades no desenvolvimento do feto humano e de animais (RUTKA et al, 1987).

A adeno-hipófise é formada por células acidófilas, basófilas e cromóforas. As células acidófilas são somatotrofos (produzem GH) e lactotrófos (produzem prolactina), as basófilas produzem hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio tirotrófico (TSH) e gonadotrofinas (FSH e LH) (MATSUNO et al, 1996), enquanto as

cromóforas, também são produtoras de hormônios (ASA et al, 1998; CHAO et al, 1991). Os lactotrofos parecem ser mais suscetíveis à indução de morte celular promovido pela diabetes que outros tipos celulares (ARROBA et al, 2003; ARROBA et al, 2005; ARROBA et al, 2006). O aumento de apoptose dos lactotrofos pode, em parte, reduzir os níveis de prolactina em pacientes diabéticos ou animais (ARROBA et al, 2003). A redução de prolactina pode resultar em redução ou atraso na produção de leite observada em algumas mulheres diabéticas (HARTMANN & CREGAN, 2001) e animais diabéticos induzidos com estreptozotocina (IKAWA et al, 1992; LAU et al, 1993).

A hipófise anterior normalmente é composta de células glandulares e células foliculares, ambas com vários tipos de elementos da MEC ao redor (KAIDZU et al, 2000). A MEC regula as funções celulares da hipófise. et al (2001) tem demonstrado que a fibronectina, laminina e tipo de colágeno I pode inibir a produção do ACTH em condições fisiológicas. Fibras de colágeno produzidos pelos lactotrófos podem regular a função de células da hipófise.

Em nosso estudo, podemos sugerir que esse remodelamento da MEC encontrado nos animais diabéticos, pode ser atribuído, em parte, aos hormônios da gravidez, que aumentam com o passar da gravidez e com isso podem estar agravando o remodelamento cada vez mais, conforme verificado entre os animais diabéticos de 11 e 21 dias. Entretanto, não foi possível correlacionar os níveis de nenhum hormônio às alterações da MEC encontradas, pois não foi possível dosar os mesmos.

Estudos posteriores são necessários para entender de maneira mais clara a regulação da produção de colágeno por essas células e o papel do próprio colágeno na hipófise durante a DMG.

## 6 CONCLUSÃO

- O modelo experimental de DMG apresentaram hiperglicemia, aumento de colesterol total , sem alterações nos triglicerídeos, independente do período gestacional. No entanto, foi verificado uma redução de peso materno e número de implantes nessas ratas.

- O modelo experimental de DMG causou dano pancreático nas ratas diabéticas, evidenciado por vacuolização citoplasmática moderada das células das ilhotas de Langerhans, infiltração linfocitária da ilhota, necrose, insulite, espessamento da parede de vasos sanguíneos e fibrose periductal e perivascular.

- O modelo experimental de DMG causou dano placentário nas ratas diabéticas, caracterizado por congestão na interface materno-fetal, aumento da concentração de vasos maternos e fetais, os quais se mostram mais delgados e com formato irregular. Detectamos necrose de trofoblastos gigantes isolados com vacuolização de espongiotrofoblastos.

- Demonstramos pela primeira vez o remodelamento da MEC em hipófises de ratas grávidas diabéticas, evidenciado por um aumento do número de células cromóforas, aglomeradas, maior espessamento de fibras de colágeno com tonalidade avermelhada (tipo I), portanto, caracterizando mudança no padrão de formação celular.

## REFERÊNCIAS

AIZAWA, T. et al. Analysis of the pancreatic beta cell in the mouse with targeted disruption of the pancreatic beta cell-specific glucokinase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 229, n. 2, p. 460-465, dec. 1996.

ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York: Garland Science, 1994. p. 973–978.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, New York, v. 35 Suppl. 1, p. S64-71, jan. 2012.

ANDREWS, Z. B.; KOKAY, I. C.; GRATTAN, D. R. Dissociation of prolactin secretion from tuberoinfundibular dopamine activity in late pregnant rats. *Endocrinology*, Springfield, v. 142, n. 6, p. 2719-2724, jun. 2001.

ARBOGAST, L. A.; VOOGT, J. L. Endogenous opioid peptides contribute to suckling-induced prolactin release by suppressing tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid levels in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology*, Springfield, v. 139, n. 6, p. 2857-2862, jun. 1998.

AREY, B. J.; FREEMAN, M. E. Activity of oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus mirrors the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology*, Springfield, v. 130, n. 1, p. 126-132, jan. 1992.

ARROBA, A. I. et al. The number of lactotrophs is reduced in the anterior pituitary of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, Berlin, v. 46, n. 5, p. 634-638, may. 2003.

ARROBA, A.I.; LECHUGA-SANCHO, A.M.; FRAGO, L.M.; ARGENTE, J.; CHOWEN, J.A. Increased apoptosis of lactotrophs in streptozotocin-induced diabetic rats is followed by increased proliferation. *J Endocrinol*, v.191, 55-63, 2006.

ARROBA, A.L.; FRAGO, L.M.; ARGENTE, J.; CHOWEN, J.A. Activation of caspase 8 in the pituitaries of streptozotocin-induced diabetic rats: implication in increased apoptosis of lactotrophs. *Endocrinology*, v.146, p.4417-24, 2005.

ASA S.L. *Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Pituitary Gland*. 1st ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1998, p. 47-150.

ATHA, D. H.; BREW, S. A.; INGHAM, K. C. Interaction and thermal stability of fluorescent labeled derivatives of thrombin and antithrombin III. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v. 785, n. 1-2, p. 1-6, feb. 1984.

BARBOSA, G. R. *Atividade física e doença arterial coronariana: revisando a literatura*. 2006. 145 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

- BEN-JONATHAN, N. et al. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, Baltimore, v. 17, n. 6, p. 639-669, dec. 1996.
- BITSANIS, D. et al. Gestational diabetes mellitus enhances arachidonic and docosahexaenoic acids in placental phospholipids. *Lipids*, Chicago, v. 41, n. 4, p. 341-346, apr. 2006.
- BONNER-WEIR, S. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab*, New York, v. 11, n. 9, p. 375-378, nov. 2000.
- BOULOT, P. et al. French multicentric survey of outcome of pregnancy in women with pregestational diabetes. *Diabetes Care*, New York, v. 26, n. 11, p. 2990-2993, nov. 2003.
- BUTLER, A. E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, New York, v. 52, n. 1, p. 102-110, jan. 2003.
- CABRERA, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 103, n. 7, p. 2334-2339, feb. 2006.
- CAGLIERO, E.; FORSBERG, H.; SALA, R.; LORENZI, M.; ERIKSSON, U, J, Maternal diabetes induces increased expression of extracellular matrix components in rat embryos. *Diabetes*, v. 42, p. 975-80, 1993.
- CATALANO, P. M.; KIRWAN, J. P. Maternal factors that determine neonatal size and body fat. *Curr Diab Rep*, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 71-77, aug. 2001.
- CHAO, J. C.; REYES, C. V.; CHINOY, M. Null cell adenoma of the pituitary gland. *South Med J*, Birmingham, v. 84, n. 10, p. 1239-1242, oct. 1991.
- CHATTERJEA, M.N.; SHINDE, R. *Text Book of Medical Biochemistry*. 5th ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2002. p. 317
- COUCH, S. C. et al. Elevated lipoprotein lipids and gestational hormones in women with diet-treated gestational diabetes mellitus compared to healthy pregnant controls. *J Diabetes Complications*, New York, v. 12, n. 1, p. 1-9, jan./feb. 1998.
- COUGHLAN, M. T. et al. Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med*, Chichester, v. 18, n. 11, p. 921-927, nov. 2001.
- COUSSENS, L. M. et al. Models for gain-of-function and loss-of-function of MMPs. Transgenic and gene targeted mice. *Methods Mol Biol*, Clifton, v. 151, p. 149-179, feb. 2001.
- DAMASCENO, D. C. et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci*, Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 235-244, aug. 2002.

- DE GREEF, W. J.; PLOTSKY, P. M.; NEILL, J. D. Dopamine levels in hypophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology*, Basel, v. 32, n. 4, p. 229-233, apr. 1981.
- DEFRONZO, R. A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*, New York, v. 58, n. 4, p. 773-795, apr. 2009.
- DEMAREST, K.T.; DUDA, N.J.; RIEGLE, G.D.; MOORE, K.E. Placental lactogen mimics prolactin in activating tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain Res.*, V.272, p.175-8,1983.
- DIAMANT, Y. Z. The human placenta in diabetes mellitus. *Isr J Med Sci*, Jerusalem, v. 27, n. 8-9, p. 493-497, aug./sep. 1991.
- DUNNE, F. et al. Pregnancy in women with Type 2 diabetes: 12 years outcome data 1990-2002. *Diabet Med*, Chichester, v. 20, n. 9, p. 734-738, sep. 2003.
- ERIKSSON, U. J. et al. Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models. *Diabetes*, New York, v. 40 Suppl 2, p. 94-98, dec. 1991.
- ERIKSSON, U. J.; CEDERBERG, J.; WENTZEL, P. Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies. *Rev Endocr Metab Disord*, Boston, v. 4, n. 1, p. 79-93, mar. 2003.
- ESTEVE, P. O. et al. Protein kinase C-zeta regulates transcription of the matrix metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF-alpha in glioma cells via NF-kappa B. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 277, n. 38, p. 35150-35155, sep. 2002.
- FAVARO, R. R. et al. Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early pregnancy of mice. *Int J Exp Pathol*, Oxford, v. 91, n. 5, p. 426-435, oct. 2010.
- FLOREZ, J. C. Clinical review: the genetics of type 2 diabetes: a realistic appraisal in 2008. *J Clin Endocrinol Metab*, Springfield, v. 93, n. 12, p. 4633-4642, dec. 2008.
- FREEMAN, M. E. et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Ver*, Washington, v. 80, n. 4, p. 1523-1631, oct. 2000.
- FROGUEL, P. et al. Genetic determinants of type 2 diabetes mellitus: lessons learned from family studies. *Diabete Metab*, Paris, v. 19, n. 1, p. 1-10, jan./feb. 1993.
- FUJINAKA, Y., et al. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 282, n. 42, p. 30707-30717, oct. 2007.
- FUJIWARA, K. et al. In situ hybridization reveals that type I and III collagens are produced by pericytes in the anterior pituitary gland of rats. *Cell Tissue Res*, Berlin, v. 342, n. 3, p. 491-495, dec. 2010.

- GARRIS, D. Diabetes (db/db) mutation-induced endometrial epithelial lipoapoptosis: Ultrastructural and cytochemical analysis of reproductive tract atrophy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, London, v. 3, n. 1, p. 15, apr. 2005.
- GARRIS, D. R. et al. Structural, metabolic and endocrine analysis of the diabetes (db/db) hypogonadal syndrome: relationship to hypophyseal hypercytolipidemia. *Cell Tissue Res*, [S.l.], v. 319, n. 3, p. 501-512, mar. 2005.
- GARRIS, D. R. Estrogenic stimulation of ovarian follicular maturation in diabetes (db/db) mutant mice: restoration of euglycemia prevents hyperlipidemic cytoatrophy. *Cell Tissue Res*, Berlin, v. 318, n. 2, p. 365-373, nov. 2004a.
- GARRIS, D. R.; GARRIS, B. L. Lipoatrophic diabetes-associated utero-ovarian dysfunction: influence of cellular lipid deposition on norepinephrine indices. *Horm Res*, Basel, v. 58, n. 3, p. 120-127, sep. 2002.
- GEWOLB, I. H. et al. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes*, New York, v. 35, n. 11, p. 1254-1261, Nov. 1986.
- GIACHINI, F. R. et al. Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. *J Anat*, [S.l.], v. 212, n. 1, p. 31-41, jan. 2008.
- GLUECK, C. J.; FALLAT, R. W.; SCHEEL, D. Effects of estrogenic compounds on triglyceride kinetics. *Metabolism*, New York, v. 24, n. 4, p. 537-545, apr. 1975.
- GRATTAN, D.R.; AVERILL, R.L. Effect of ovarian steroids on a nocturnal surge of prolactin secretion that precedes parturition in the rat. *Endocrinology*, v 126, p.1199-205, 1990.
- GROOP, L. C. et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest*, New Haven, v. 84, n. 1, p. 205-2213, jul. 1989.
- GU, D.; ARNUSH, M.; SARVETNICK, N. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin-treated Ins-IFN-gamma transgenic mice. *Pancreas*, New York, v. 15, n. 3, p. 246-250, oct. 1997.
- GUNNET, J. W.; FREEMAN, M. E. The mating-induced release of prolactin: a unique neuroendocrine response. *Endocr Rev*, Baltimore, v. 4, n. 1, p. 44-61, feb. 1983.
- HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Int J Gynaecol Obstet*, New York, v. 78, n. 1, p. 69-77, jul. 2002.
- HARTMANN, P.; CREGAN, M. Lactogenesis and the effects of insulin-dependent diabetes mellitus and prematurity. *J Nutr.*, v.131, p.3016S-20S.
- HUGO, E. R. et al. LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology*, Springfield, v. 147, n. 1, p. 306-313, jan. 2006.

HUSAIN, S. M. et al. Effect of diabetes mellitus on maternofetal flux of calcium and magnesium and calbindin9K mRNA expression in rat placenta. *Pediatr Res*, Basel, v. 35, n. 3, p. 376-381, mar. 1994.

IESSI, I. L. et al. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr*, London, v. 2, n. 1, p. 37, jun. 2010.

IKAWA, H.; IRAHARA, M.; MATSUZAKI, T.; SAITO, S.; SANO, T.; AONO, T. Impaired induction of prolactin secretion from the anterior pituitary by suckling in streptozotocin-induced diabetic rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*, v. 126, p. 167-72, 1992.

JAWERBAUM, A. et al. Eicosanoid production, metabolism and contractile activity in the isolated uterus from non-insulin-dependent diabetic rats during late pregnancy. *Prostaglandins*, New York, v. 51, n. 5, p. 307-320, may. 1996.

JAWERBAUM, A.; ROSELLÓ CATAFAU, J.; GONZALEZ, E. T.; NOVARO, V.; GOMEZ, G.; GELPI, E.; GIMENO, A. L.; GIMENO, M. A. Glucose metabolism, triglyceride and glycogen levels, as well as eicosanoid production in isolated uterine strips and in embryos in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus during pregnancy. *Prostaglandins*, v. 47, p. 81-96, 1994.

JOVANOVIC, L.; PETTITT, D. J. Gestational diabetes mellitus. *JAMA*, Chicago, v. 286, n. 20, p. 2516-2518, nov. 28 2001.

KAKKAR, R. et al. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)*, London, v. 94, n. 6, p. 623-632, jun. 1998.

KANAKA-GANTENBEIN, C.; MASTORAKOS, G.; CHROUSOS, G. P. Endocrine-related causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci*, New York, v. 997, p. 150-157, nov 2003.

KHOKHA, R.; WERB, Z. Mammary gland reprogramming: metalloproteinases couple form with function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, [S.l.], v. 3, n. 4, apr. 2011.

KIM, E. et al. Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes. *J Endocrinol*, Bristol, v. 188, n. 2, p. 263-270, feb. 2006.

KITZMILLER, J. L. et al. Diabetic pregnancy and perinatal morbidity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, St. Louis, v. 131, n. 5, p. 560-580, jul. 1978.

KNOPP, R. H.; CHILDS, M. T.; WARTH, M. R. Dietary management of the pregnant diabetic. *Curr Concepts Nutr*, New York, v. 8, p. 119-139, jan. 1979.

KRONCKE, K. D. et al. Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe Seyler*, Berlin v. 376, n. 3, p. 179-185, mar. 1995.

KUBO, Y.; KAIDZU, S.; NAKAJIMA, I.; TAKENOUCI, K.; NAKAMURA, F. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, v.36, p.38-44, 2000.

LAU, C.; SULLIVAN, M.K.; HAZELWOOD, R.L. Effects of diabetes mellitus on lactation in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v.204, p.81-9, 1993.

LAWRENCE, J. M. et al. Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. *Diabetes Care*, New York, v. 31, n. 5, p. 899-904, may. 2008.

LILLIOJA, S. et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*, Boston, v. 329, n. 27, p. 1988-1992, dec. 1993.

MAGEE, P. N.; SWANN, P. F. NITROSO COMPOUNDS. *British Medical Bulletin*, Oxford, v. 25, n. 3, p. 240-244, sep. 1969.

MALOFF, B.L.; BOYD, B.K. Physiologic and cellular insulin action in a glucose-intolerant model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes in rats. *Diabetologia.*, V.29, P.295-300, 1986.

MARTIN, B. C. et al. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*, London, v. 340, n. 8825, p. 925-929, oct. 1992.

MATSUNO, A. et al. A Case of pituitary somatotroph adenoma with concomitant secretion of growth hormone, prolactin, and adrenocorticotrophic hormone — an adenoma derived from primordial stem cell, studied by immunohistochemistry, in situ hybridization, and cell culture. *Acta Neurochirurgica*, [S.I.], v. 138, n. 8, p. 1002-1007, aug. 1996.

MATVEYENKO, A. V.; VELDHUIS, J. D.; BUTLER, P. C. Adaptations in pulsatile insulin secretion, hepatic insulin clearance, and beta-cell mass to age-related insulin resistance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Bethesda, v. 295, n. 4, p. E832-841, oct. 2008.

MEDICI, F. et al. Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. *Diabetologia*, Berlin, v. 42, n. 2, p. 146-150, FEB. 1999.

MERZOUK, H. et al. Fetal macrosomia related to maternal poorly controlled type 1 diabetes strongly impairs serum lipoprotein concentrations and composition. *J Clin Pathol*, London, v. 53, n. 12, p. 917-923, dec. 2000.

MILLER, V. T. Dyslipoproteinemia in women. Special considerations. *Endocrinol Metab Clin North Am*, Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 381-398, jun. 1990.

MOHAN, H. et al. Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. *Brain Pathol*, Zürich, v. 20, n. 5, p. 966-975, sep. 2010.

MOLLER, D. E. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, New York, v. 11, n. 6, p. 212-217, aug. 2000.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*, New York, v. 419, n. 1, p. 1-15, nov. 2003.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 1-11, 1991.

MORELI, J.B.; MORCELI, G.; DELUCA, A.K.; MAGALHÃES, C.G.; COSTA, R.A.; DAMASCENO, D.C.; RUDGE, M.V.; CALDERON, M. Influence of maternal hyperglycemia on IL-10 and TNF- $\alpha$  production: the relationship with perinatal outcomes. *J Clin Immunol*, v. 32, p. 604-10, 2012.

MORGAN, N. G. et al. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Biosci Rep*, London, v. 14, n. 5, p. 243-250, oct. 1994.

MOVASSAT, J.; SAULNIER, C.; PORTHA, B. Insulin administration enhances growth of the beta-cell mass in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetes*, v. 46, p. 1445-52, 1997.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, Oxford, v. 29, n. 5, p. 290-308, oct. 2008.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 274, n. 31, p. 21491-21494, jul. 1999.

NISHINAKA, K.; FUKUDA, Y. Changes in extracellular matrix materials in the uterine myometrium of rats during pregnancy and postparturition. *Acta Pathol Jpn*, Tokyo, v. 41, n. 2, p. 122-132, feb. 1991.

NUKATSUKA, M. et al. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn*, Tokyo, v. 13, n. 4, p. 259-262, apr. 1990.

OKAMOTO, H. et al. Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, New Haven, v. 114, n. 2, p. 214-223, jul. 2004.

PADMANABHAN, R.; AL-ZUHAIR, A. G. Ultrastructural studies on the placentae of streptozotocin induced maternal diabetes in the rat. *Z Mikrosk Anat Forsch*, Leipzig, v. 104, n. 2, p. 212-230, jan. 1990.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, London, v. 4, n. 8, p. 617-629, aug. 2004.

PERMUTT, M.A.; KAKITA, K.; MALINAS, P.; KARL, I.; BONNERWEIR, S.; WEIR, G.; GIDDI NGS, S.J.; An in vivo analysis of pancreatic protein and insulin biosynthesis in a rat model for non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*, v.73, p.1344-50, 1984.

PIPE, N. G. et al. Changes in fat, fat-free mass and body water in human normal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, London, v. 86, n. 12, p. 929-940, dec. 1979.

PIYACHATURAWAT, P. et al. Gastric mucosal lesions in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biol Int Rep*, London, v. 12, n. 1, p. 53-63, jan. 1988.

PIYACHATURAWAT, P.; POPRASIT, J.; GLINSUKON, T. Gastric mucosal secretions and lesions by different doses of streptozotocin in rats. *Toxicol Lett*, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 21-29, jan. 1991.

PORTHA, B. et al. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes*, New York, v. 23, n. 11, p. 889-895, nov. 1974.

PORTHA, B.; SERRADAS, P. Improvement in glucose-induced insulin secretion in diabetic rats after long-term gliclazide treatment: a comparative study using different models of non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin. *Am J Med*, New York, v. 90, n. 6, p. 15-21, jun. 1991.

PRIGENT-TESSIER, A. et al. Rat decidual prolactin. Identification, molecular cloning, and characterization. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 274, n. 53, p. 37982-37989, dec. 1999.

PUNITHAVATHI, V. R.; ANUTHAMA, R.; PRINCE, P. S. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats. *J Appl Toxicol*, Philadelphia, v. 28, n. 6, p. 806-813, aug. 2008.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*, Bethesda, v. 29, p. 91-98, may. 1963.

RATHMANN, W.; GIANI, G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, New York, v. 27, n. 10, p. 2568-2569, oct. 2004.

RICHARDSON, C. A. et al. IL-1 beta increases laminin B2 chain mRNA levels and activates NF-kappa B in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol*, Washington, v. 268, n. 2, p. 273-278, feb. 1995.

ROBERTSON, R. P. et al. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*, New York, v. 53 Suppl 1, p. S119-24, feb. 2004.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, New York, v. 212, n. 2, p. 167-178, apr. 2006.

RUAN, H. et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor: implications for insulin resistance. *Diabetes*, New York, v. 51, n. 11, p. 3176–3188, nov. 2002.

RUTKA, J.T.; MYATT, C.A.; GIBLIN, J.R.; DAVIS, R.L.; ROSENBLUM, M.L. Distribution of extracellular matrix proteins in primary human brain tumours: an immunohistochemical analysis. *Can J Neurol Sci*, v. 14, p. 25-30, 1987.

SACHDEVA, M. M.; STOFFERS, D. A. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol*, Baltimore, v. 23, n. 6, p. 747-758, jun. 2009.

SAITO, F. H. et al. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr*, United Kingdom, v. 2, n. 1, p. 26, apr. 2010.

SCHAEFER-GRAF, U. M. et al. Patterns of congenital anomalies and relationship to initial maternal fasting glucose levels in pregnancies complicated by type 2 and gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, St. Louis, v. 182, n. 2, p. 313-320, feb. 2000.

SCHNEIDL, W. J. et al. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, New York, v. 43, n. 11, p. 1326-1333, nov. 1994.  
SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Palo Alto, v. 47, p. 211-242, nov. 2007.

SCHWARTZ, R.; TERAMO, K. A. Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn. *Semin Perinatol*, New York, v. 24, n. 2, p. 120-135, apr. 2000.

SELMANOFF, M.; GREGERSON, K. A. Suckling decreases dopamine turnover in both medial and lateral aspects of the median eminence in the rat. *Neurosci Lett*, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 25-30, jun. 1985.

SHYNLOVA, O. et al. Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod*, New York, v. 70, n. 4, p. 986-992, apr. 2004.

SINZATO, Y.K. *Análise morfológica e imunológica de placenta de ratas com diabetes de intensidade moderada*. 2006. Tese (Doutorado em Biologia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2006.

SINZATO, Y.K.; VOLPATO, G.T.; IESSI, I.L.; BUENO, A.; CALDERON IDE, M.; RUDGE, M.V.; DAMASCENO, D.C. Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res*, 2012.

SONG, S. H. et al. Direct measurement of pulsatile insulin secretion from the portal vein in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, Springfield, v. 85, n. 12, p. 4491-9, dec. 2000.

- SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res*, Stuttgart, v. 29, n. 6, p. 301-307, jun. 1997.
- SWANSTON-FLATT, S. K. et al. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*, Berlin, v. 33, n. 8, p. 462-464, aug. 1990.
- SWISLOCKI, A.; KRAEMER, F.B. Maternal Metabolism in Diabetes Mellitus: Pathophysiology of Diabetes in Pregnancy. In: BRODY, S.A.; UELAND, K. *Endocrine Disorders in Pregnancy*. Norwalk: Apleton & Lange, 1989.
- TAKADA, J. et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism*, New York, v. 56, n. 7, p. 977-984, jul. 2007.
- THULESEN, J. et al. Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology*, Springfield, v. 138, n. 1, p. 62-68, jan. 1997.
- TRIADOU, N.; PORTHA, B.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Experimental chemical diabetes and pregnancy in the rat. Evolution of glucose tolerance and insulin response. *Diabetes*, v. 31, p. 75-9, 1982.
- TURK, J. et al. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, New York, v. 197, n. 3, p. 1458-1464, dec. 1993.
- VAN ASSCHE, F. A.; HOLEMANS, K.; AERTS, L. Fetal growth and consequences for later life. *J Perinat Med*, Berlin, v. 26, n. 5, p. 337-346, feb. 1998.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-839, may. 2003.
- VOLPATO, G.T.; DAMASCENO, D.S.; RUDGE, M.V.; PADOVANI C.R.; CALDERON, I.M. Effect of Bauhinia forficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, v. 116, p. 131-7, 2008.
- VOOGT, J. L. et al. Rat placental lactogen-I abolishes nocturnal prolactin surges in the pregnant rat. *Endocrine*, Houndsmills, v. 4, n. 3, p. 233-238, jun. 1996.
- WHITE, F. R. Streptozotocin. *Cancer Chemother Rep*, Bethesda, v. 30, p. 49-53, jul. 1963.
- ZHAO, Z.; REECE, E. A. Experimental mechanisms of diabetic embryopathy and strategies for developing therapeutic interventions. *J Soc Gynecol Investig*, New York, v. 12, n. 8, p. 549-557, dec. 2005.