

EXPOSIÇÃO AO MEIO INTRA-UTERINO HIPERGLICÊMICO COMPROMETE AS RESERVAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMÁRIAS E ACELERA O TRÂNSITO DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE RATOS ADULTOS.

Juliana Elaine Perobelli, Wilma De Grava Kempinas, Elaine Manoela Porto, Raquel Spadotto, Carla Dal Bianco Fernandez, Débora Cristina Damasceno. – Morfologia – Ciências Biológicas – Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – Campus de Botucatu.

Diabetes mellitus é uma síndrome clínica heterogênea caracterizada por alterações endócrinas e metabólicas, prejudicando a homeostasia do organismo. Em um quadro de diabetes materna, a quantidade exagerada de glicose na circulação sanguínea da mãe ocasiona efeitos deletérios na formação e no desenvolvimento da placenta, acarretando prejuízo no crescimento e oxigenação fetal (TARICCO et al., 2003). Estudos têm demonstrado que distúrbios no meio intra-uterino durante a gestação, tal como ocorre no diabetes, estão relacionados ao aparecimento de desordens metabólicas na prole durante a vida adulta, sugerindo que no desenvolvimento embrionário ocorra uma programação fetal de possíveis doenças a se desenvolver na vida adulta (ZAMBRANO et al., 2005; NATHANIELSZ; THORNBURG, 2003; BOLOKER et al., 2002; VAN ASSCHE et al., 2001). Entretanto, poucos estudos têm investigado a influência da programação fetal *in utero* sobre o desenvolvimento e função do aparelho reprodutor masculino. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos tardios sobre o sistema reprodutor masculino, em ratos nascidos de mães em que se induziu diabetes quimicamente antes do acasalamento.

Para tanto, 83 ratas Wistar (90 dias), com aproximadamente 220g, foram divididas em dois grupos experimentais. A estreptozotocina foi a droga escolhida para indução do diabetes nas ratas do grupo diabetogênico, administrada via intravenosa (i.v.), na dose única de 40 mg/kg. Foram incluídas no estudo ratas que apresentaram glicemia > 200 mg/dl (n=59), uma semana após a indução, caracterizando diabetes grave. As ratas do grupo controle (n=24) receberam solução fisiológica a 0,9% (i.v.). As fêmeas de ambos os grupos foram acomodadas na presença de ratos machos durante o período da noite (duas ratas por macho). Nas manhãs subsequentes, as ratas foram submetidas à coleta de esfregaços vaginais e a presença de cabeças de espermatozóides foi utilizada como indicativo de prenhez. Durante o período de prenhez, as fêmeas foram observadas quanto ao comportamento, ingestão hídrica e consumo de ração, além de serem monitoradas quanto à glicemia e ganho de peso. A partir do 20º dia de prenhez, as ratas foram observadas quanto ao nascimento dos filhotes. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, procurando-se sempre manter os filhotes do sexo masculino. Ninhadas com número de filhotes inferior a oito tiveram seus filhotes remanejados para outras ninhadas do mesmo grupo experimental, de tal forma que o número de filhotes amamentados por cada rata fosse de no mínimo seis e, no máximo, oito.

Quando os filhotes das ratas dos dois grupos experimentais completaram 90 dias de idade (maturidade sexual), foram submetidos à anestesia com éter etílico e mortos por decapitação, procedendo-se a coleta de sangue para posterior dosagem de testosterona plasmática. Os testículos e epidídimos direitos foram retirados e congelados a - 4°C para posterior contagem das células germinativas. Para obtenção do cálculo da produção diária de espermatozóides no testículo (PDE), a concentração de espermatozóides por testículo foi dividida por 6,1, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero. O cálculo do tempo de trânsito espermático nas regiões do epidídimo, que expressa o número de dias necessários para que os espermatozóides atravessem as porções epididimárias, foi obtido através da divisão do número de espermatozóides presentes em cada região do epidídimo pela PDE. Os testículos e epidídimos esquerdos desses mesmos animais foram removidos e submetidos a processamento de rotina para inclusão em Paraplast. Este material foi seccionado a 7µm e corado com hematoxilina e eosina, para posterior avaliação da espermatogênese. Os resultados obtidos estão expressos em média ± EPM e foram comparados estatisticamente, de forma que as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

O processo espermatogênico obedece, dentro dos túbulos seminíferos, a um rígido padrão, em que as diferentes associações celulares, que são definidas pelos estágios de desenvolvimento das

espermátides, se sucedem no tempo e no espaço. Esse ciclo do epitélio seminífero pode ser subdividido em 14 estágios, adotando como critério a observação do desenvolvimento e evolução do sistema acrossômico das espermátides. Em nosso estudo, avaliamos a proporção dos estágios da espermatogênese nos túbulos seminíferos, baseados na classificação proposta por Ferreira et al. (1967), que subdivide os 14 estágios da espermatogênese em 4 grupos: estágio I ao VI, estágios VII e VIII, estágio IX ao XIII e estágio XIV. Esta divisão é baseada no número de gerações de espermátides, presença de espermátides maduras na borda do lúmen ou presença de espermátócito secundário. A análise das proporções de cada estágio revelou que não houve diferença significativa entre grupos experimentais em relação à dinâmica do processo espermatogênico nos túbulos seminíferos (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros espermáticos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao número de espermatozóides no testículo (Figura 1) e produção diária de espermatozóides (Figura 2). Ambos os parâmetros são considerados importantes indicativos do potencial de fertilidade masculina. Quanto ao número de espermatozóides na região da cabeça-corpo do epidídimo, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 3). Entretanto, a análise do número de espermatozóides na região da cauda do epidídimo revelou um significativo prejuízo das reservas epididimárias na cauda dos ratos filhos de fêmeas diabéticas, quando comparados aos machos filhos das ratas normoglicêmicas (Figura 4). O tempo de trânsito espermático na região da cabeça-corpo do epidídimo não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 5). No entanto, na região da cauda do epidídimo, foi observada uma redução estatisticamente significativa no tempo (em dias) do trânsito espermático dos machos filhos de ratas hiperglicêmicas, quando comparados aos filhos de ratas normoglicêmicas (Figura 5). Essa aceleração do tempo de trânsito dos espermatozóides pela cauda do epidídimo pode revelar um prejuízo na maturação dos espermatozóides e na sua capacidade de fertilização. Quanto aos níveis de testosterona plasmática, as dosagens mostraram-se semelhantes entre os grupos experimentais (Figura 6).

Tabela 1. Efeito do meio intra-uterino hiperglicêmico no processo da espermatogênese de ratos adultos (90 dias de idade) estimado pela frequência relativa dos estágios I-VI, VII-VIII, IX-XIII e XIV do ciclo do epitélio seminífero. Dados expressos em média \pm EPM. Teste t de Student.

	I-VI	VII-VIII	IX-XIII	XIV
Grupo 1 (n= 4)	41,75 \pm 0,75	28,75 \pm 1,49	24,75 \pm 0,48	4,75 \pm 0,85
Grupo 2 (n=4)	39,75 \pm 1,32	31,00 \pm 1,15	24,5 \pm 1,44	4,75 \pm 0,48

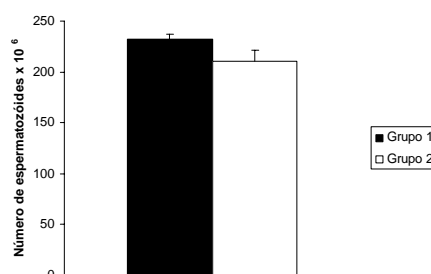


Figura 1- Número de espermátides maduras no testículo. Dados expressos em média \pm EPM. Teste t de Student. Grupo 1 (n=6): prole de ratas normoglicêmicas; Grupo 2 (n=6): prole de ratas diabéticas.

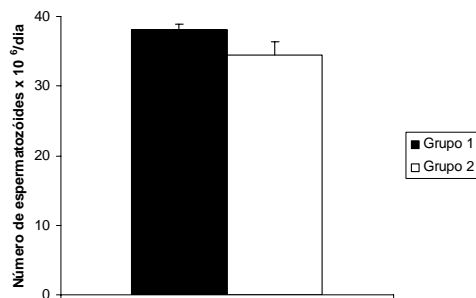


Figura 2- Produção diária de espermatozoides no testículo. Valores expressos em média \pm EPM. Teste t de Student. Grupo 1 (n=6): prole de ratas normoglicêmicas; Grupo 2 (n=6): prole de ratas diabéticas.

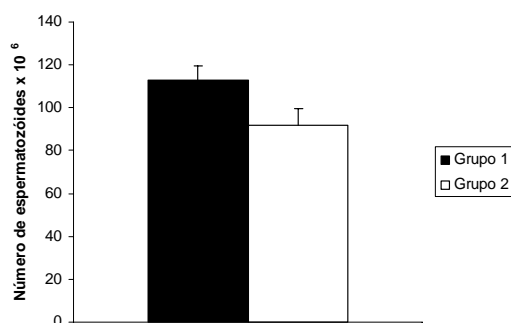


Figura 3- Número de espermatozoides na cabeça-corpo do epidídimo. Valores expressos em média \pm EPM. Teste de Mann Whitney. Grupo 1 (n=6): prole de ratas normoglicêmicas; Grupo 2 (n=6): prole de ratas diabéticas.

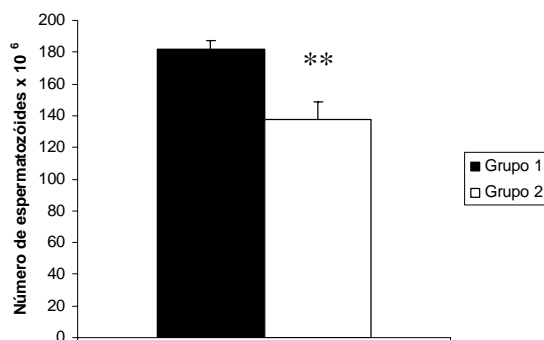


Figura 4- Número de espermatozoides na cauda do epidídimo. Valores expressos em média \pm EPM. **p<0,01. Teste de Mann Whitney. Grupo 1 (n=6): prole de ratas normoglicêmicas; Grupo 2 (n=6): prole de ratas diabéticas.

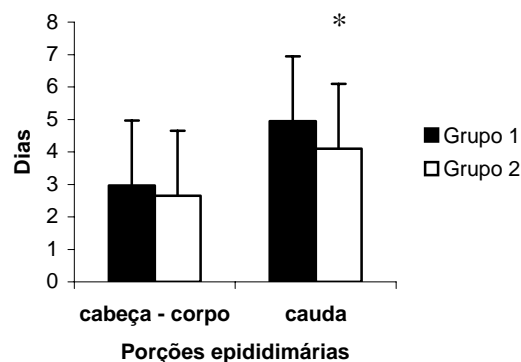


Figura 5- Tempo de trânsito espermático. Valores expressos em média \pm EPM * $p < 0,05$. Teste de Mann Whitney. Grupo 1 $n = (6)$: prole de ratas normoglicêmicas; Grupo 2 ($n = 6$): prole de ratas diabéticas.

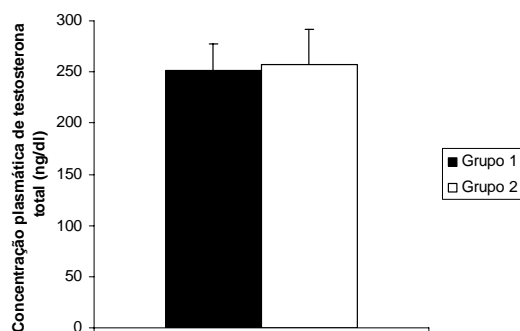


Figura 6: Concentrações plasmáticas de testosterona total aos 90 dias. Grupo 1 ($n = 11$): prole de ratas normoglicêmicas; Grupo 2 ($n = 8$): prole de ratas hiperglicêmicas.

Este estudo mostrou que a exposição de ratos a um meio intra-uterino hiperglicêmico acarreta efeitos sobre os parâmetros reprodutivos observados na prole masculina adulta, em especial sobre as reservas espermáticas epididimárias e tempo de trânsito espermático.

Referências Bibliográficas:

- BOLOKER, J.; GERTZ, S.J.; SIMMONS, A.R. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. **Diabetes**, v.51, n.5, p.1499-1506, 2002.
- FERREIRA, A.L.; LISON, L.; VALERI, V. Caryometric study of spermatogenesis in the rat. **Z Zellforsch Mikrosk Anat**, v.76, n.1, p.31-35, 1967.
- NATHANIELSZ, P.W.; THORNBURG, K.L. Fetal programming: from gene to function systems an overview. **J Physiol**, v.547, p.3-4, 2003.
- TARICCO, E; et al. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. **Placenta**, v.24, n.4, p.343-347, 2003.
- VAN ASSCHE, F.A.; HOLEMANS, K.; AERTS, L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. **Br. Med. Bull.**, v.60, p.173-182, 2001.
- ZAMBRANO, E.; et al. A maternal low protein diet durin pregnancy and lactation in the rat male reproductive development. **J. Physiol.**, v.563, p.275-284, 2005.