ANA KATHARYNE FERREIRA FAGUNDES ROSSITER

Efeito da atividade antidiabética de compostos de vanádio: avaliação histopatológica e proposta do mecanismo de ação intracelular.

Recife
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL – PPGBA

ANA KATHARYNE FERREIRA FAGUNDES ROSSITER

Efeito da atividade antidiabética de compostos de vanádio: avaliação histopatológica e proposta do mecanismo de ação intracelular.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Recife
2016

Ficha catalográfica

R835e Rossiter, Ana Katharyne Ferreira Fagundes
Efeito da atividade antidiabética de compostos de vanádio: avaliação histopatológica e proposta do mecanismo de ação intracelular / Ana Katharyne Ferreira Fagundes Rossiter. – Recife, 2016.
75 f. :il.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Júnior.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.
Referências.

1. Diabetes 2. Vanádio 3. Testículo 4. Adipócitos 5. Insulina I. Silva Júnior, Valdemiro Amaro da, orientador II. Título

CDD 636.089

Agradecimentos

Aos meus pais Socorro e Petrúcio Fagundes pelo amor incondicional. Por acreditarem em mim e por me proporcionarem uma base familiar tão sólida, com muito carinho e dedicação. Por me direcionarem pelo melhor caminho sempre.

Ao meu esposo Mauro Rossiter Júnior pelo companheirismo, pelo carinho, dedicação e amor em todas as horas. Por ter me acompanhado para um mundo tão desconhecido e por me ajudar em todas as etapas do doutorado, me ajudando nos fins de semana e feriados a cuidar dos animais.

Aos meus irmãos maravilhosos Patrícia, Chico, Carol e Jessica por serem meus melhores amigos e pela força no dia a dia.

Às minhas sobrinhas Marianna, Luiza e Alice por serem meus bebês e por me trazerem tanta alegria e sentimento materno.

A minha segunda família .Minha sogra Leny Paixão, meu sogro Mauro Rossiter, minhas cunhadas Monique, Patrícia e Karina Paixão, meus cunhados Christiano Tabosa, Decio Peixoto e Adolfo Moury e aos meus sobrinhos da família Paixão por me acompanharem em todos os meus momentos me dando força sempre em todas as minhas escolhas.

Ao professor Valdemiro Júnior, por ter acreditado em mim desde o mestrado. Por todos os conhecimentos repassados e por estar sempre presente em todos os momentos. Obrigada pela compreensão e por ser, não só um professor dedicado, mas também um amigo.

Ao professor Peter Stralfors, por me receber com tanto carinho em seu laboratório na Suécia e em sua vida. Um mundo tão novo pra mim que se tornou mais agradável por saber que ele sempre estaria lá para o que eu precisasse sempre. Tornou-se parte de nossa família desde o momento em que recebemos seu abraço no nosso primeiro encontro.

À Lidiane Macêdo pelo seu carinho e delicadeza e por ter cedido e preparado as soluções de vanádio, além de ter sido minha parceira durante a realização deste trabalho, me ajudando em várias etapas do projeto.

A Meenu Rajah, minha companheira de laboratório durante o doutorado sanduíche, que se tornou minha amiga enquanto eu estava tão longe de casa. Dando-me todo apoio que precisei tanto profissional quanto pessoal.

Ao professor Wagner da Silva e à professora Mônica Belian por terem me cedido as soluções à base de vanádio, sendo bastante solícitos quando precisei. Apoiando-me em muitos momentos.

À minha amiga Fabiana Félix por estar presente em minha vida e por me ajudar com toda paciência passando seus conhecimentos pra mim.

Aos amigos Alluanan Edelson, Jéssica Santana, Anna Kelly e Simone Macêdo por me ajudarem neste projeto me dando de presente suas amizades.

Aos meus amigos Ciel Santos, Kátia Guedes, Diel Rodrigues, Catarina Rosa e Maysa Ribeiro pela força durante minha jornada. Deram a mim carinho e amizade quando precisei durante a realização da tese.

À Ana Paula Castor que trabalhou tanto em parte deste projeto, com tanta dedicação.

Aos amigos que fiz estando tão longe de casa e que se tornaram minha família em Linköping.

À Asa Jufvas minha companheira de escritório da Universidade de Linkoping - Suécia, pelas boas conversas diárias, me fazendo sentir mais leve com o trabalho diário.

Ao professor Fred pelos bons momentos compartilhados.

Aos amigos que fiz na UFRPE que estão comigo desde minha graduação até agora.

Ao amigo Luiz André por me ajudar em tantos detalhes neste trabalho.

Ao André e à Renata do biotério do DMFA/UFRPE por cuidarem dos animais com tanta dedicação.

À Edna Cherias por sempre estar disposta a ajudar com tanta delicadeza e carinho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, minha segunda casa.

Aos animais ratos Wistar que deram sua vida e inocência a este trabalho. Que por muitas vezes são maltratados pelo desconhecimento do elo que pode existir entre a ciência e a bondade.

À Capes, pela concessão da bolsa.

RESUMO

Neste trabalho observou-se a eficiência *in vivo* do tratamento de ratos diabéticos com drogas de vanádio na diminuição de lesões no sistema reprodutor masculino. Além de uma análise *in vitro* em adipócitos humanos através da avaliação dos efeitos destes compostos sobre proteínas importantes na sinalização da insulina. Para o estudo *in vivo,* foram utilizados 25 ratos Wistar machos com 70 dias de idade que foram submetidos a diversos tratamentos: grupo G1: animais diabéticos sem tratamento com insulina (n=5); G2:animais diabéticos tratados com insulina (n=5); grupo G3: animais diabéticos tratados com sulfato de vanadila($VOSO_4$)(n=5); grupo G4: animais diabéticos tratados com novo composto de vanádio (L02)(n=5) e grupo G5 animais diabéticos tratados com novo composto de vanádio (V-BHED)(n=5). Os animais foram induzidos ao diabetes através da administração única de estreptozotocina. Após a confirmação do quadro de diabetes deu-se início aos tratamentos com duração de 60 dias. Ao final do período experimental os animais foram perfundidos para avaliação de alterações decorrentes do diabetes sobre alguns órgãos reprodutivos. Cada animal foi heparinizado e anestesiado por injeção intraperitoneal de quetamina associada à xilazina na mesma seringa. Posteriormente, foi realizada a coleta do sangue para dosagem de testosterona. Foram analisados parâmetros como: Pesos (corporal, testículos, epidídimos e vesícula seminal) e índice gonadossomático. Além disso, foi feita análise histológica do testículo com ênfase em células de Leydig e microtúbulos de células germinativas. Para o estudo *in vitro*, os adipócitos recolhidos a partir de seres humanos, com diabetes e sem diabetes, foram submetidos à avaliação de proteínas para análise de alterações na sinalização da insulina. E finalmente foram realizadas a eletroforese em gel e imunotransferência. Ambos os estudos apresentaram efeitos positivos dos compostos à base de vanádio em quase todos os parâmetros avaliados, principalmente a nova substância codificada como VBHED.

Palavras-chave: Diabetes. Vanádio. Insulina. Adipócitos. Testículos.

ABSTRACT

This study observed the *in vivo* efficacy of the treatment of diabetic rats with vanadium drugs in decrease in the number of lesions in the male reproductive system, as well as an *in vitro* analysis in human adipocytes by evaluating the effects of these compounds on proteins which are important in insulin signaling. For the *in vivo* study, 25 Wistar rats (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) 70-day-old were used and underwent various treatments: G1: diabetic animals without insulin treatment (n = 5); G2: diabetic rats treated with insulin (n = 5) ; G3: diabetic animals treated with vanadyl sulfate ($VOSO_4$) (n = 5); Group G4: diabetic animals treated with new vanadium compound (L02) (n = 5) and group G5: diabetic animals treated with a new vanadium compound of vanadium (V-BHED). The animals were induced to experimental diabetes by single administration of streptozotocin, after the confirmation of diabetes the treatments started, lasting 60 days. At the end of the experimental period, the animals were perfused to evaluate changes resulting from diabetes on some reproductive organs. Each animal was heparinized and anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine associated with xylazine in the same syringe. Subsequently, a blood sample was collected for dosage of testosterone. Parameters were analyzed such as: body weight, weight of testis, epididymis, seminal vesicle, gonadosomatic index. Moreover, a histological analysis of testis with emphasis on Leydig cells and germ cell microtubules was made. For the *in vitro* study, human adipocytes were used. The adipocytes collected from humans with diabetes (TD2) and without diabetes were subjected to a protein evaluation for the analysis of changes in the activation and/or expression of signaling that may mediate the beneficial effects. Finally, the SDS-PAGE and immunoblotting were performed. Both studies showed the positive effects of vanadium-based compounds in almost all parameters, especially the VBHED compounds.

Keywords: Diabetes. Vanadium. Insulin. Adipocytes. Testis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 REVISÃO DE LITERATURA 13
2.1 DIABETES MELLITUS 13
2.1.1 Classificação etiológica 13
2.1.1.1 *Diabetes Mellitus tipo 1* 14
2.1.1.2 *Diabetes Mellitus tipo 2* 15
2.1.1.3 Outros tipos específicos de diabetes mellitus 16
2.1.1.4 Diabetes gestacional 16
2.1.2 Diabetes na reprodução do macho 16
2.2 TERAPIAS 18
2.2.1 Insulina 18
2.2.1.1 Ação e sinalização da insulina e proteínas intracelulares 19
2.2.1.2 Resistência à insulina 21
2.2.2 Vanádio 21
2.2.2.1 Compostos de vanádio em experimentação in vitro 23
2.2.2.2 Mecanismo de ação semelhante à insulina do vanádio 24
3 OBJETIVOS 26
3.1 OBJETIVO GERAL 26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26
CAPÍTULO1 .....
1 INTRODUÇÃO 37
2 MATERIAL E MÉTODOS 38
2.1 ISOLAMENTO E INCUBAÇÃO DE ADIPÓCITOS 38
2.2 ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE) E IMUNOTRANSFERASE. 39
COMPOSTOS DE VANÁDIO 39
3 ESTATÍSTICA 40
4 RESULTADOS 40
5 DISCUSSÃO 43
6 CONCLUSÕES .....
REFERÊNCIAS 47

CAPÍTULO 2.........47
1 INTRODUÇÃO 53
2 MATERIAL E MÉTODOS..... 54
2.1 INDUÇÃO AO DIABETES 54
2.2 ADMINISTRAÇÃO DOS COMPOSTOS À BASE DE VANÁDIO..... 55
2.3 TRATAMENTO DO DIABETES..... 55
2.4 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL..... 55
2.5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TESTICULARES E DE ÓRGÃOS REPRODUTORES 56
2.6 DIÂMETRO NUCLEAR DAS CÉLULAS DE LEYDIG..... 56
2.7 DOSAGEM DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA..... 56
2.8 PROCESSAMENTO DOS TESTÍCULOS PARA HISTOPATOLOGIA 57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
3.1 ANÁLISE DO ÍNDICE GLICÊMICO..... 60
3.2 DIÂMETRO DO NÚCLEO DAS CÉLULAS DE LEYDIG E AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA..... 61
3.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA 63
4 CONCLUSÕES 69
REFERÊNCIAS..... 70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....75

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 Receptor de insulina. Local de ligação da insulina ao seu receptor na subunidade α que resulta em autofosforilação da subunidade β.(Freeman, 2012).

Figura 2 Mecanismos de sinalização da insulina para o transporte de glicose e síntese de proteínas.

Capítulo 1

Figura 1 Ação dos compostos a base de vanádio no caminho de sinaliação da insulina.

Figura 2 Fosforilação da ERK 1/2 em adipócitos humanos. Adipócitos humanos submetidos a tratamento com água e tampão (controle), insulina, sulfato de vanadila ($VOSO_4$) e novo composto à base de vanádio (VBHED), durante 30 minutos. Pacientes não diabéticos e pacientes diabéticos (diabetes tipo 2).

Figura 3 Fosforilação da PKB em adipócitos humanos. Adipócitos humanos submetidos a tratamento com água e tampão (CONTROLE), INSULINA, Sulfato de vanadila ($VOSO_4$) e novo composto à base de vanádio (VBHED), durante 30 minutos. Pacientes não diabéticos e pacientes diabéticos (diabetes tipo 2).

Figura 4 Fosforilação da S6 em adipócitos humanos. Adipócitos humanos submetidos a tratamento com água e tampão (CONTROLE), INSULINA, Sulfato de vanadila ($VOSO_4$) e novo composto à base de vanádio (VBHED), durante 30 minutos. Pacientes não diabéticos e pacientes diabéticos (diabetes tipo2).

Capítulo 2

Figura 1 Diâmetros dos núcleos das células de Leydig de animais diabéticos sem tratamento, tratados com insulina, L02, $VOSO_4$ e VBHED.(µm).

Figura 2 Níveis séricos de testosterona de animais diabéticos sem tratamento, tratados com insulina, L02, $VOSO_4$ e VBHED.

Figura 3. Testículos de ratos adultos diabéticos. Compartimento tubulares em animais diabéticos tratados com insulina (A e B) e sem tratamento(C,D,E e F) durante 60 dias.1(A) Túbulos seminíferos em secção transversal em diversos estágios do epitélio seminífero preservados em animais diabéticos tratados com insulina, aumento de 100x(seta).1(B)Três diferentes estágios da espermatogênese(IV,V e VII)em ratos do grupo tratado com insulina, vaso sanguíneo (seta).1(C).Túbulos seminíferos de animais diabéticos sem tratamento com presença de vacúolos (Seta preta) , afrouxamento do epitélio(seta branca) e células descamadas(estrela) em aumento de 100x. Animais diabéticos sem tratamento 1(D,E e F). Observar a em detalhe a existência de vacuolização da célula de Sértoli (D)(seta preta) e morte de células do epitélio germinativo (seta branca).(E) Afrouxamento do epitélio com descamação celular(estrela),morte de células germinativas(seta). (F)

Figura 4. Túbulos seminíferos de animais tratados com 3 substâncias à base de vanádio. (A) Túbulos seminíferos bem preservados (Seta) dos animais tratados com $VOSO_4$ em aumento de 100x.(B)Em detalhe no aumento de 400x ,túbulos seminíferos bem preservados apresentando 3 diferentes estágios da espermatogênese (IV,V,VII). (C) Animais tratados com L02 apresentando túbulos seminíferos bem preservados(seta preta) porém também se observa processos degenerativos marcados com a redução da altura dos epitélio germinativo (seta branca).(D)Em maior aumento 400x, diminuição da altura do epitélio(seta), túbulos em processos degenerativos com ausência de células germinativas compartimento adluminal (estrela).(E) Túbulos seminíferos bem preservados(Seta) dos animais tratados com VBHED em aumento de 100x.(F) Em detalhe no aumento de 400x ,túbulos seminíferos bem preservados apresentando diferentes estágios da espermatogênese(IV,V,VI) de animais tratados com VBHED.

1 **INTRODUÇÃO**

Uma epidemia de Diabetes *mellitus* (DM) está em curso. Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes é da ordem de 382 milhões de pessoas e que deverá atingir 471 milhões em 2035. Cerca de 80% desses indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens, coexistindo com o problema que as doenças infecciosas ainda representam (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da mesma de exercer adequadamente seus efeitos, resultando em resistência insulínica. Dessa forma, a enfermidade caracteriza-se pela presença de hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003). A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida.

Embora alguns fármacos, com potencial antidiabético, estejam sendo extensamente utilizados, existem algumas limitações encontradas nas terapias atuais, como: (1) muitos pacientes diabéticos tipo II não apresentam controle da glicemia com o uso de alguns fármacos; (2) os agentes não reestabelecem o estado normal da sensibilidade à insulina ou o funcionamento das células beta; (3) o uso intenso da insulina pode aumentar a adiposidade e agravar a resistência à insulina (BAILE, 2000).

A quantidade de defeitos na via de sinalização da insulina tem sido relatada em pacientes diabéticos do tipo II (BEESON, 2003). Terapias antidiabéticas atuais são geralmente seguras e eficazes, mas sofrem certas limitações. A insulina, por exemplo, requer a ação funcional do seu receptor, e terapias antidiabéticas orais não insulínicas adicionalmente exigem níveis mínimos endógenos de insulina. Como resultado dessas limitações, os pacientes com grave resistência à insulina, que inclui pacientes diabéticos, gravemente avançados, atualmente carecem de tratamento efetivo. Esta é uma

preocupação crescente, porque o número de pacientes com resistência à insulina grave está aumentando em relação direta com a atual epidemia global de diabetes (CASTRO, et al. 2014; VESTERGAARD, 2001).

Novas abordagens terapêuticas são necessárias para tratar o diabetes de forma mais eficiente; dessa forma, estudos realizados nas últimas décadas foram revistos em detalhe, demonstrando que compostos à base de vanádio exercem vários efeitos insulino- miméticos e antidiabéticos, *in vitro* e *in vivo* (SRIVASTAVA, 2000; MEHDI, 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes é uma doença complexa e multifatorial, considerada um dos mais importantes problemas de saúde mundial e está associada com significativa mortalidade, morbidade e perda da qualidade de vida. É caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, causados por absoluta ou relativa deficiência da secreção e/ou ação da insulina e que tem como aspecto fundamental a hiperglicemia (ISLAS-ANDRADE, 2000; CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES 2002; RAO, 2003).

2.1.1 Classificação etiológica

A classificação atual do DM baseia-se na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto, os termos "DM insulinodependente" e "DM insulinoindependente" devem ser eliminados dessa categoria classificatória. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (ALBERTI, 1999; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013;SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES,2015).

Diabetes *mellitus* (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a

hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. As duas formas mais comuns de diabetes são diabetes Tipo 1 (produção diminuída de insulina) e diabetes do tipo 2 (resposta diminuída à insulina e disfunção de células β). Ambos levam à hiperglicemia, produção excessiva de urina, sede compensatória, o aumento da ingestão de líquidos, visão turva, perda de peso inexplicada, letargia e alterações no metabolismo energético e complicações agudas, que podem levar a risco de vida; a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica. A hiperglicemia crônica está associada a danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (LIN Y. , 2010).

2.1.1.1 *Diabetes Mellitus tipo 1*

O DM1, forma presente em 5% a 10% dos casos, é o resultado da destruição de células betapancreáticas, com consequente deficiência de insulina (American diabetes association, 2013), por um processo auto- imune (tipo A) ou por causa desconhecida (forma idiopática ou tipo B). Na forma autoimune que é a mais comum, ocorre um processo de insulite e a presença de autoanticorpos (antidescarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina) (GROSS et al., 2002).

O DM1 idiopático corresponde à minoria dos casos e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta. Os indivíduos com essa forma de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015). O fato de haver ausência absoluta de insulina na diabetes tipo1 ocorre manifestações clínicas evidentes, possibilitando rápido diagnóstico quando comparada com a diabetes tipo II (GROSS et al., 2002).

A evolução da doença não é aguda e sim um processo de autoagressão de evolução lenta que provavelmente se desenvolve durante anos numa fase pré-clinica. No período de manifestação da doença, com a presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número muito diminuído ou praticamente ausente. A presença de infiltrado inflamatório

do tipo linfomononuclear e a ausência de células secretoras de insulina, as células beta, caracteriza o quatro histológico do diabetes tipo 1. O processo de insulite ocorre pela agressão imunológica mediada por células linfocitárias, macrófagos e células (NK) Natural Killer, sendo, portanto um processo dependente da imunidade celular (BALDA, C. A., 1999).

2.1.1.2 *Diabetes Mellitus tipo 2*

O DM2 é a forma presente em 90% a 95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina. Em geral, ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e cetoacidose raramente se desenvolve de modo espontâneo, ocorrendo apenas quando se associa a outras condições como infecções. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas geralmente é diagnosticado após os 40 anos. Os pacientes não dependem de insulina exógena para sobreviver, porém podem necessitar de tratamento com insulina para obter controle metabólico adequado. Diferentemente do DM1 autoimune, não há indicadores específicos para o DM2. Há, provavelmente, diferentes mecanismos que resultam nessa forma de DM, e com a identificação futura de processos patogênicos específicos ou defeitos genéticos, o numero de pessoas com essa forma de DM irá diminuir a custa de mudanças para uma classificação mais definitiva em outros tipos específicos de DM. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

O diabetes está associado ao aumento da mortalidade e ao alto risco de desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares, como também de neuropatias, cegueira, insuficiência renal e amputações de membros (GUYTON, 2002).

No diabetes tipo 2 há uma redução da sensibilidade dos tecidos-alvos ao efeito da insulina. Essa sensibilidade diminuída à insulina é frequentemente descrita como resistência à insulina. Para superar a resistência à insulina e evitar o acúmulo de glicose no sangue, deve haver um aumento na quantidade de insulina secretada. Embora não se saiba o que causa o diabetes tipo 2, sabe-se que neste caso o fator hereditário tem uma importância bem maior do

que no diabetes tipo 1. Também existe uma conexão entre a obesidade e o diabetes tipo 2, embora a obesidade não leve necessariamente ao diabetes (COTRAN, 2000).

2.1.1.3 Outros tipos específicos de diabetes mellitus

Pertencem a essa classificação formas menos comuns de DM cujos defeitos ou processos causadores possam também ser identificados. A apresentação clínica desse grupo é bastante variada. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina e doenças do pâncreas exócrino (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

2.1.1.4. Diabetes gestacional

O diabetes gestacional é definido como a tolerância diminuída aos carboidratos, de graus variados de intensidade, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS ,1997; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes aos descritos para o diabetes tipo 2, incluindo, ainda, idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez atual, deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal(CAMPOS, 2002).

2.1.2 Diabetes na reprodução do macho

O diabetes pode interferir na reprodução do macho promovendo alterações vasculares e na espermatogênese.

O processo espermatogênico quando segue um curso normal é regulado através de uma rede de interação endócrina, parácrina e autócrina que ocorre entre os diversos tipos celulares existentes. A espermatogênese é um processo

sincronizado que envolve mecanismos que compreendem o código genético das células germinativas e a sua comunicação com células somáticas presentes no testículo. No decorrer da espermatogênese, as células germinativas se movem da periferia para o lúmen do túbulo seminífero. Um corte transversal do túbulo seminífero mostra as espermatogônias localizadas na base do túbulo, espermatócitos no meio, e espermátides no ápice do epitélio, demonstrando a progressão do desenvolvimento de células imaturas às células germinativas maduras à medida que elas se movem em direção ao lúmen, onde as espermátides são liberadas, ou espermiadas como espermatozóides (HESS, 2008; RATO, 2012).

O Diabetes tem sido associado com disfunção reprodutiva em homens e mulheres. Embora a fisiopatologia de distúrbios reprodutivos em mulheres diabéticas venha sendo amplamente investigada (GONÇALVES et al., 2015), poucos estudos foram realizados em homens(BACCETTI et al., 2002). O diabetes geralmente resulta em disfunção endoteliais e da vascularização (BROWNLEE, 2005), potencialmente afetando, direta ou indiretamente, várias funções do sistema (GAZZARUSO, 2008 ; JACKSON, 2004). Cerca de 90% dos pacientes diabéticos, do sexo masculino, têm distúrbios na função sexual, incluindo uma diminuição da libido, impotência e infertilidade (MA, 2008; FAIRBURN, 1990). Saad et al.(2009), associaram a infertilidade masculina à síntese inadequada de testosterona, causada por mudanças moleculares nas células de Leydig, decorrentes do diabetes.

Segundo, Miralles-Garcia et al.(2004), há indícios de que o diabetes insulino-dependente está associado à diminuição do sêmen ejaculado, redução da vitalidade e motilidade dos espermatozóides, sem alteração da viscosidade do esperma. Análises do sêmen revelaram alguma diminuição da motilidade espermática e densidade, morfologia anormal e aumento de anormalidades do plasma seminal de homens diabéticos. Agbaje et al.(2007) mostraram que, mesmo quando os homens diabéticos apresentam parâmetros seminais normais, há um maior nível de danos no núcleo e também no DNA mitocondrial (mtDNA) de espermatozóides, quando comparado ao que foi encontrado em controles saudáveis.

2.2. TERAPIAS

Quando um adequado controle glicêmico não é obtido através da dieta e exercícios, os pacientes fazem uso dos agentes hipoglicemiantes orais para o controle da glicemia. (GILMAN et al., 1991; PILLAI; PANCHAGNULA, 2001). Esses medicamentos são divididos em grupos que estimulam a secreção da insulina como, por exemplo, os mais usados: as sulfonilúrias e as metiglinidas e, os que aumentam a sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina como as biguanidas e as tiazolidinodionas. E ainda, os hipoglicemiantes que atuam inibindo a absorção de carboidratos no intestino (OIKININE; MOORADIAN, 2003).

2.2.1 Insulina

Descoberta em 1921, a insulina é utilizada na terapia de casos como diabetes, câncer, queimaduras e injúrias severas (MARTINEZ, 2003). A síntese ocorre a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-nsulina no retículo endoplasmático, onde é clivada a pró-insulina e no complexo de Golgi, ocorre conversão em insulina que é armazenada em vesículas (GILMAN et al., 1991; NORMAN, 1997). A insulina é composta por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias, A e B, unidas entre si por duas ligações dissulfeto (BANTING, et al., 1992; LE et al., 2002). É o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica. (CARVALHEIRA, 2002)

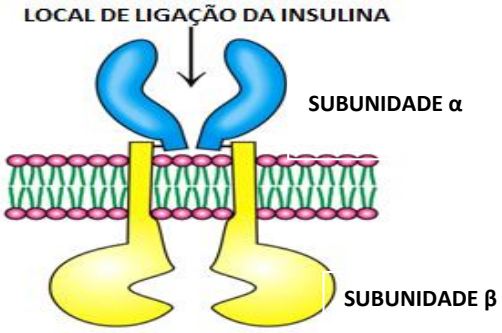
A administração injetável de insulina tem, todavia, efeitos que são normalmente consequência de um mau controle da terapêutica, como por

exemplo, hipoglicemia (a mais perigosa), reações alérgicas no local de injeção, hipopotassemia (diminuição do nível do íon K^+) e desenvolvimento de resistência ao medicamento (GARRETT, 1987; SOARES, 1992; GUILLAUSSEAU, 1992).

2.2.1.1 Ação e sinalização da insulina e proteínas intracelulares

A insulina induz os efeitos biológicos pela interação com um receptor específico de membrana. Este receptor é uma glicoproteína heterotetramérica sendo, duas unidades extracelulares que contêm o sítio de ligação para insulina, unidas por pontes dissulfeto e duas unidades intracelulares que possuem os domínios de tirosina quinases (NORMAN; LITWACK, 1997; NYSTROM; QUON, 1999; LE FLEM et al., 2002; PERTSEVA et al., 2003). Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas (KAHN, 1985). O receptor é composto por duas subunidades α localizadas extracelularmente, e duas subunidades ß que passam através da membrana celular (MYERS, 2002). (Figura1).

Figura 1 Receptor de insulina. Local de ligação da insulina ao seu receptor na subunidade α que resulta em autofosforilação da subunidade β.



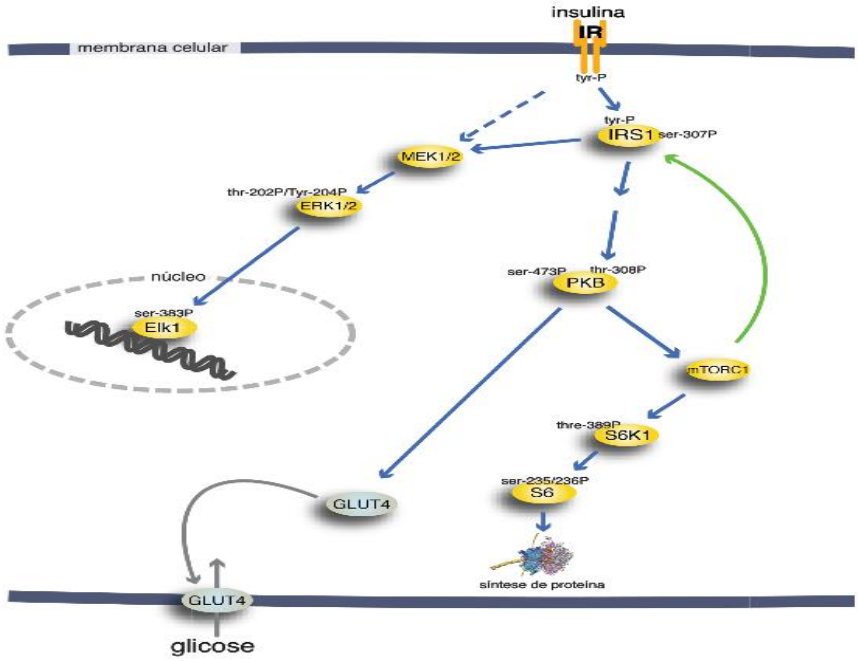
Fonte: Freeman (2012).

A insulina induz a autofosforilação do receptor, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos proteicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos dá início a uma série de eventos incluindo a

cascata de reações de fosforilação e defosforilação que regula os seus efeitos metabólicos e de crescimento (NORMAN, 1997 e HEI, 1998). Ocorre então o início das cascatas de fosforilação de várias outras proteínas e enzimas intracelulares, como a família de substratos para receptor de insulina (IRS- 1 e 2) que servem como âncoras para outras proteínas efetoras, através da transdução de sinal (WATSON, 2001, PERTSEVA, 2003, KLOVER, 2004, LAPENNA, 2002, CARVALHEIRA, 2002). Estas outras moléculas de sinalização que contém domínios SH2, levam assim à ativação de duas vias de sinalização intracelular como a via da PI3-quinase (fosfatidilinositol 3-quinase), e a ativação da via da cascata MAPK com subsequente ativação de Raf, MEK e 2 MAPKs; p44mapk e p42mapk (ERK1 e ERK2, respectivamente). Estas vias, por sua vez, regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídios e proteínas (VOET, 2004; YA, 2009). A PI3-quinase é um dímero composto por uma subunidade catalítica e uma subunidade regulatória, importante para a translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana e consequente captação de glicose.

A cascata da PI3-quinase participa também no controle do tráfego de vesículas levando à translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a superfície da célula, resultando assim num aumento de captação de glicose (VOET, 2004). A PI3-K fosforila o fosfatidilinositol (PI) na posição 3 do anel inositol e gera formas de PI 3-fosforiladas, como fosfatidilinositol 3,4,5 (PIP3), que estão implicadas na ativação da quinase dependente de fosfolípidos (PDK) e proteínas quinases serina/treonina relacionadas, responsáveis por a fosforilação e estimulação de várias proteínas quinases na cascata da sinalização, como a proteína quinase B (PKB/Akt), p70S6K e PKC (YA, 2009). A cascata da MAPK regula a expressão de genes envolvidos no crescimento e diferenciação celular (VOET, 2004). (Figura 2).

Figura 2: Mecanismos de sinalização da insulina para o transporte de glicose e síntese de proteínas.



Fonte: Stralfors (2016).

2.2.1.2 Resistência à insulina

O conceito de sensibilidade à insulina foi introduzido por Sir Harold Himsworth, em 1939, ao estudar a resposta de pacientes diabéticos ao estímulo glicêmico e à insulina (DEFRONZO, 2009). Pode-se definir resistência à insulina (RI) como uma perturbação das vias de sinalização, mediadas pela insulina, em que as concentrações normais do hormônio produzem uma resposta biológica subnormal. Um aumento da função β-celular pode compensar a RI, resultando em tolerância normal à glicose (NGT). Todavia, quando a RI excede a capacidade funcional e adaptativa das células β, instaura-se a deterioração da tolerância à glicose, que pode culminar com o diabetes *mellitus* de tipo 2 (DM2)(BAILEY, 2000 e BEESON , 2003).

2.2.2 Vanádio

O vanádio, elemento que possui número atômico 23 e peso atômico 50,9415, é encontrado em baixas concentrações na crosta terrestre, sendo obtido comercialmente como produto através dos processos de mineração de

outros metais. O nome “vanadium” foi uma homenagem à deusa Vanadis, devido às várias cores formadas pelo íon em soluções (MORINVILLE, 1998). Foi descoberto em 1830 pelo químico sueco *Nils Sefstrom* que inicialmente o nomeou de Vanadis, a deusa nórdica da beleza e da juventude. A crosta terrestre contém aproximadamente 0,02% desse elemento, sendo o mesmo obtido como um subproduto do processamento de minérios de outros metais. O vanádio também é encontrado nas células sanguíneas especializadas de ascídias numa concentração elevada, cerca de 0,15 mol L^{-1}, sob a forma de *tunichromes*(pigmentos), que parece ter um papel importante no metabolismo das células. A química de vanádio é extremamente complexa devido aos seus vários estados de oxidação (BACCETTI, 2002, SMITH ,1991; TOLMAN,1979) a hidrólise e polimerização. Assim, o vanádio apresenta um sistema muito lábil que pode interagir com ligantes potenciais, tais como bases nitrogenadas e grupos-OH, obtendo-se assim misturas que são lábeis e difíceis de isolar (HEYLIGER, 1985).

O vanádio tem sido reconhecido como um requisito nutricional essencial em animais superiores, parecendo ser um oligoelemento necessário para o crescimento e desenvolvimento normais das células dos mamíferos, para as quais a concentração intracelular pode variar entre 0,02 e 1 μmol L^{-1}. Em 1979, foi demonstrado que os compostos de vanádio aumentavam o transporte e a oxidação de glicose, bem como estimulavam a síntese de glicogênio no fígado e diafragma (TOLMAN, 1979). Em 1985, Heyliger et al., verificaram redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com vanádio. Em tecido adiposo, foi encontrado que o vanádio ativa lipogênese, inibe a lipólise e aumenta a liberação da lipoproteína lipase (UEKI, 1989). CAM e colaboradores (2000) resumem vários estudos sobre o efeito do vanádio em modelos de animais com diabetes tipo I e II, demonstrando aumento do transporte de glicose e síntese de glicogênio em músculo e redução da lipólise e aumento da lipogênese em tecido adiposo (KADOTA et al., 1987; TSIANI, 1997;FOOT et al., 1992). Clark et al.(1985) demonstraram que o vanádio altera o metabolismo de glicose de modo semelhante ao da insulina nos músculos. O vanádio aumenta a entrada de glicose, síntese de glicogênio e glicólise em amplitude menor que à da insulina, mas sua ação é maior ao produzir lactato e oxidar glicose. Ao contrário da insulina, não houve modificação na síntese ou degradação

proteica pelo composto de vanádio. Sakurai et al. (2002) verificaram, *in vitro*, atividade do íon vanadila em aumentar a captação de glicose e suprimir a liberação de ácidos graxos livres em adipócitos. O estudo *in vivo* foi realizado com administração oral de complexos de vanádio e a observância do retorno da glicemia aos níveis normais em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2.2.2.1 Compostos de vanádio em experimentação in vitro

Existem efeitos do Vanádio no metabolismo de carboidratos e lipídeos. O efeito da diminuição da concentração sanguínea da glicose tem sido atribuído principalmente a um aumento de sua absorção pelas células, uma vez que o vanádio ativa diretamente o transporte de glicose *in vitro* em vários tipos de células, entre as quais podemos citar: adipócitos isolados de rato (DUBYAK,1980 e GREEN, 1986), hepatócitos cultivados (GÓMEZ, 1988), miócitos cardíacos de ratos e humanos (CLAUSEN,1981), tiras de músculo esquelético de ratos (CAREY, 1995), bem como no músculo esquelético humano e sistemas celulares com resistência à insulina (CLARK, 1985).

O vanádio também influencia etapas intracelulares no metabolismo da glicose, aumentando a glicólise e oxidação da glicose em adipócitos isolados de ratos (GREEN, 1986). O efeito máximo do vanádio foi à oxidação da glicose que excedeu a da insulina, e foi atribuído a uma estimulação seletiva da derivação das pentoses fosfato, enquanto o seu efeito máximo sobre a glicólise foi igualado ao da insulina (SHISHEVA, A.;SHECGTER, Y.,1992). O vanádio também estimulou a glicólise em hepatócitos isolados de ratos diabéticos (CLAUSEN T.et al. ,1981).

Vários alvos enzimáticos específicos podem explicar os efeitos do vanádio na glicólise. Compostos de vanádio em tecido adiposo de ratos pode ativar lipogênese (CASTRO et al, 1984), inibir a lipólise(DEGANI et al, 1981) e também aumentar a atividade da lipoproteína lipase (UEKI et al 1989).

2.2.2.2 Mecanismo de ação semelhante à insulina do vanádio

O mecanismo de ação dos compostos de vanádio ainda não foi totalmente esclarecido. Embora alguns estudos tenham demonstrado ação dos sais de vanádio via ativação do receptor tirosina quinase, vários estudos sugerem que a ação do vanádio não está envolvida com o receptor da insulina (SHISHEVA; SHECHTER, 1992; D'ONOFRIO et al., 1993; D'ONOFRIO et al., 1994). A maioria dos estudos aponta, como mecanismo de ação, a inibição de proteínas tirosina fosfatases (PTPs), resultando em estimulação indireta da fosforilação da tirosina (TSIANI; FANTUS, 1998; BEVAN et al.,1995; MCNEILL et al.,1995; POSNER et al., 1994.). Dados resultantes de estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o vanádio não afeta apenas um, mas sim vários aspectos na via de sinalização da insulina (GOC, 2006). A hipótese de inibidor de PTP é explicada pelo fato do vanádio atuar como competidor do grupo fosfato impedindo assim, a reação enzimática. Interessantemente, a formação de 15 compostos de vanádio peroxidados demonstrou ser 100 – 1000 vezes mais potente em oxidar o domínio essencial da cisteína, que é aminoácido comum a todas PTPs (BHATTACHARYYA, 2001). Em estudos feitos anteriormente, compostos de vanádio demonstraram estimular a fosforilação das tirosinas da subunidade β, em adipócitos de rato (SHECHTER, 1980; GOLDFINE et al 2000). Contudo, em outras experiências, em adipócitos, e em células sobre-expressando IR, não foi detectada nenhuma alteração na subunidade β, em resposta ao tratamento com diferentes compostos de vanádio (SRIVASTAVA, 2005; DOMINGO et al, 1995, SHECHTER, 1980; GOLDFINE, et al 2000).

Um composto a base de vanádio demonstrou ser capaz de reduzir a hiperglicemia e os níveis de insulina em ratos obesos, além de reduzir a alta atividade de PTPases encontrada no fígado dos mesmos(PUGAZHENTHI et al, 1995). Como um dos efeitos de maior importância dos sais de vanádio, verificou-se a indução do transportador GLUT 4, do seu compartimento intracelular para a superfície da célula, aumentando a captação de glicose (PÂQUET et al,1992).

Tratamentos com Sulfato de vanadila em pacientes com diabetes tipo 2 modificaram vários componentes envolvidos na sinalização de insulina, os quais incluíram melhoras no IR basal, na fosforilação IRS-1 e na ativação PI3-K

em homogenados de músculo humano (GOC, 2006). Contudo, em contraste com estes estudos clínicos, outros tratamentos com compostos de vanádio em ratos não produziram qualquer alteração no estado de ativação da PI3-K ou PKB (SRIVASTAVA, 2005; DJORDJEVIC, 1995; MCNEILL, 1992). Esta discrepância entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* do vanádio, nas vias de sinalização da insulina e no papel de vários componentes deste sistema de sinalização, continua por clarificar. Ou seja, o mecanismo preciso, pelo qual o vanádio estimula a fosforilação da tirosina do IRS-1, que leva à ativação do sistema PI3-K/PKB, ainda não está claro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antidiabética de novos composto à base de vanádio *in vivo* (ratos Wistar machos adultos) e *in vitro* (adipócitos humanos isolados).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar peso corporal, de testículos, epidídimos e vesícula seminal;
2. Avaliar os níveis de glicose e níveis plasmáticos de testosterona;
3. Verificar morfologia das células da linhagem espermatogênica e dos núcleos células de Leydig através de microscopia óptica;
4. Avaliação histopatológica dos testículos;
5. Comparar os efeitos sobre as vias sinalizadoras de insulina, entre a insulina, o sulfato de vanadila e novo composto à base de vanádio;
6. Avaliar e comparar as ações do novo composto de vanádio, sulfato de vanadila e insulina sobre a proteína S6 que participa na via de sinalização da insulina;
7. Avaliar e comparar as ações do novo composto de vanádio, sulfato de vanadila e insulina sobre a proteína Erk1/2 que participa na via de sinalização da insulina;
8. Avaliar e comparar as ações do novo composto de vanádio, sulfato de vanadila e insulina sobre a proteína S6KIP que participa na via de sinalização da insulina;
9. Avaliar e comparar as ações do novo composto de vanádio, sulfato de vanadila e insulina sobre a proteína PKB que participa na via de sinalização da insulina;
10. Avaliar e comparar as ações do novo composto de vanádio, sulfato de vanadila e insulina sobre a proteína IRS1 que participa na via de sinalização da insulina.

REFERÊNCIAS

AGBAJE IM et al. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. **Human Reproduction**.UK, v.22, n.7, Oxford University, p.1871-7, 2007.

ALBERTI GEORGE, ZIMMET PAUL, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. **For the World Health Organization Consultation.** Geneva, WHO, 15, 07, Jul, 1999.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus.Diabetes **Care**, v.38,n. 1, jan, 2015.

BACCETTI Bacio et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reproduction**, v.17, n.10, 2002.

BAILEY Clifford. Potential new treatments for type 2 diabetes. **Trends in Pharmacological Sciences,** v. 21, p. 259 – 265, 2000.

BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Associação médica brasileira**, v. 45 n. 2, São Paulo, abr./jun. 1999.

BANTING, F.G., et al.1922 em: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

BEESON M, et al,Activationof protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3, 4, 5-(PO4)3is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance:amelioration by rosiglitazone and exercise. **Diabetes**, v.52, n.8, p.1926 –1934, 2003.

BEVAN, A. P, et al.Peroxovanadium compounds: Biological actions and mechanism of insulin-mimesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 49 – 58, 1995.

BHATTACHARYYA, S.; TRACEY, A.S. Vanadium (V) complexes in enzyme systems: aqueus chemistry, inhibition and molecular modeling in inhibitor design. **Journal of Inorganic Biochemistry,** v. 85, p. 9 – 13, 2001.

BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature,** New York, v.13, n.414, p.813-820, 2001.

BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, **Diabetes**,n. 54,v.6, p.1615-25. 2005.

CAM M. C.; BROWNSEY, R. W.; McNEILL, J. H. Mechanisms of vanadium action: insulin-mimetic or insulin-enhancing agent? Canadian **Journal of Physiology and Pharmacology,** v.78, n.10, p. 829 – 847,out, 2000.

CAMPOS, M.A.; FAGUNDES, A.; SELIGMAN, L.C. Manejo e diagnóstico do diabetes *mellitus* gestacional. **Mom. & Perspec. Saúde**, Porto Alegre, v.15, n.2, p.34-39, jul/dez. 2002.

CAREY JO, ET AL .Okadaic acid, vanadate, and phenylarsine oxide stimulate 2-deoxyglucose transport in insulin-resistant human skeletal muscle.**Diabetes**,Greenville,v.44.n.6,p.682-688,Jun,1995.

CARVALHEIRA JBC, ZECCHIN HG, SAAD. MJA*.* Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos brasileiros de endocrinologia *e* metabolismo***,* *v.*46,n.4,p. 419-425,ago*,*2002*.*

CASTRO, A. V. B. et al. Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association. **Arquivo brasoleiro de endocrinologia e metababolismo,** v. 58, n. 6, p. 600-609, 2014.

CASTRO J, MAQUEDANO A, OLIVE M. Lipid synthesis in isolated rat hepatocytes: activation by insulin and vanadate and inhibition by ouabain.**Biochemistry International**.v.9,n.4,p.413–420, Out, 1984.

CLARCK, A. S.; FAGAN, J. M.;MITCH, W. E. Selectivity of the insulin-like actions of vanadate on glucose and protein metabolism in skeletal muscle. **The Biochemical Journal**, v.232, n.1, p. 273 – 276, 1985.

CLAUSEN, T., et al.the relationship between the transport of glucose and cations acroos cell membrans in isolatades tissues. **Biochimica. Biophysica acta,** v.646,n.2. p.261-267,1981.

CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. – Rio de Janeiro: **Diagraphic,** p .72,2003..

COTRAN, R. S. ; CRAWFORD, J. M. Pâncreas. In: COTRAN, R. S. ; KUMAR, V. ; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. Cap. 20.2000.

D'ONOFRIO, F., et al. Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 340, p. 269 – 275,1994.

D'ONOFRIO, F., et al.Vanadate dependent activation of mitogen activated protein (MAP)kinase in Chinese hamster ovary cells overexpressing a wild type human insulin receptor (CHO-HIRc). **The Farmacologist,** v. 35, p. 109, 1993.

DEFRONZO, R.A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**. v.58,p.773-95, 2009.

DEGANI, H. et al. Electron paramagnetic resonance studies and insulin-like effects of vanadium in rat adipocytes.**Biochemistry**.v.20, n.20, p.5795-99,1981.

DJORDJEVIC, C. Antitumor activity of vanadium compounds.**Metal ions in biological systems**, Virginia, v. 31, p. 595-616, mar. 1995.

DOMINGO JL, et al.Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelatingagents on vanadium accumulation. **Molecular and cellular Biochemistry**, v.153,n.1,p.233–240, dez.1995.

DUBYAK, G. R., KLEINZELLER, A. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. Dissociation from effects of vanadate as a (Na+-K+)ATPase inhibitor. **The journal of biological chemistry.** V.255,n.11, p.5306-5312,jun.1980.

DUCKWORTH WC ,et al. Insulin-Like Effects of Vanadate in Isolated Rat. Adipocytes,**Endocrinology**,v.122,n.5,p.2285-2289,mai.1988.

FAIRBURN CG, MCCULLOCH DK, WU FC. The effects of diabetes on male sexualfunction. **Clinics in Endocrinology and Metabolism,** v.11,n.3,p.881-9,nov.1982.

FOOT, E., et al. The effects of orthovanadate, vanadyl and peroxides of vanadate on glucose metabolism in skeletal muscle preparations in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 109, n.2,p. 157-162, 1992.

FREEMAN W.H., **Company book companion site for biochemistry**, 7ed,14.2012.

GARRETT, J. W. OSSWALD, Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas- **Manual da farmacologia e Terapêutica**, 24edição, Porto Editora, Porto, 1987.

GAZZARUSO C., et al. Erectile dysfunction as a predictor of cardiovascular events and death in diabetic patients with angiographically proven asymptomatic coronary artery disease: a potential protective role for statins and 5-phosphodiesterase inhibitors. **Journal of the american College of Cardiology**,Itália,v. 51,n.21,p. 2040-4.mai. 2008.

GILMAN, A.G, et al. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 8 a edição. Rio de Janeiro : **Guanabara Koogan**, 1991.

GOC, A. Biological activity of vanadium compounds Central European **Jounal of biology** , Polônia, V.1,n.3, p. 314-332.abr,2006.

GOLDFINE AB et al. Metabolic effects of vanadyl sulfate in humans with noninsulin-dependent diabetes mellitus: in vivo and in vitro studies. **Metabolism,** Boston**,** v.49, n.3, p.400–410.mar. 2000;

GÓMEZ-FOIX, A. M.,et al. Vanadate raises fructose 2,6-bisphosphate concentrations and activates glycolysis in rat hepatocytes.**Biochemical Journal**.v.255,n.2,p.507-12.out. 1988.

GONCALVES, A. T. P. et al. Oophorectomy and the risk of diabetes. **Reproduction and menopause**, v. 30, n. 3, p. 140-147, 2015.

GREEN, A. The insulin-like effect of sodium vanadate on adipocyte glucose transport is mediated at a post-insulin-receptor level.**Biochemical Journal**,v.238,n.3,set.1986.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification and Glucose Control Evaluation. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GUILLAUSSEAU P. J.,t traitements medicamenteux de la retinopathie diabetique un debut d'espoir**. La Revue du Practicien** XLII.n.9, p.1069-124.1992.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Insulina, glucagon e diabetes mellitus. In. Tratado de fisiologia médica. 10. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.** 2002. p. 827-840.

HEI, Y.J. Recent progress in insulin signal transduction.**Journal of Pharmacological and Toxicological Methods,** v. 40, p. 123-135, 1998.

HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. **Advances in experimental medicine and biology**,p. 1-15, 2008.

HEYLIGER CE, TAHILIANI AG, MCNEILL JH: Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabeticrats. **Science**, v.227,p.1474–1477, 1985.

ISLAS-ANDRADE, S., et al.Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. **Acta Histochemistry Citochemistry**, v. 33, n.3, p. 201-208, 2000.

JACKSON G. Sexual dysfunction and diabetes. **International Journal of Clinical Practice** .v.58,n.4.p. 358-362. 2004.

KADOTA, S, et al. Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase**. Biochemical and biophysical research communications,** v. 147, p.259 – 266, 1987.

KAHN CR. The molecular mechanism of insulin action. **Annual Review of Medicin**.v.36p.429-51.1985.

KLOVER, P.J.; MOONEY, R.A. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. **The International. Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, p. 753-758, 2004.

LAPENNA, D, et al., Vanadyl as a catalyst of human lipoprotein oxidation. **Biochem Pharmacol,** v.63,n.3, p. 375-80, 2002.

LE FLEM, G., et al,Synthesis, and functional properties of a modified human insulin A-chain: implication in a ìmini-insulinî structure determination. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v. 10, p. 2111-2117, 2002.

LIN Y AND Z. SUN, Current views on type 2 diabetes, **Journal of Endocrinology,** vol. 204, n. 1, p. 1–11, 2010.

MA RC, et al. Erectile dysfunction predicts coronary heart disease in Type 2 diabetes**. Journal of the american College Cardiology;** v.5, n.21. p.2045-50.mai.2008.

MALLIDIS C, et al. The influence of diabetes mellitus on male reproductive function : A poorly investigated aspect of male infertility. **Urologe**,v.50,n.1,p.33-37.jan.2011.

MARTINEZ-RIQUELME, A. E.; ALLISON, S. P. Insulin revisited. **Clinical Nutrition**, v. 22,n.1, p. 7 -15,fev. 2003.

MCNEILL JH, YUEN VG, HOVEYDA HR, Orvig C. Bis (maltolato) oxovanadium (IV) is a potent insulin mimic. **Journal medicinal Chemistry**; v3.n.8, p.1489–1491,abr.1992.

MCNEILL, J. H., et al.Increased potency of vanadium using organic ligands. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 153, p. 175 – 180, 1995.

METZLER, David. Biochemistry: **The Chemical Reactions of Living Cells**. 2 ed: Academic Press,1973, p2003.

MIRALLES JM, GARCIA LC. Specific aspects of erectile dysfunction in endocrinology. **International Journal of Impotence Reserch**,v.16,p.10-2. 2004.

MORINVILLE, A.; MAYSINGER, D.; SHAVER, A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. **Trends in Pharmacology Science**, v. 19, p. 452 – 460, 1998

MYERS MG, WHITE MF. The Molecular Basis of Insulin Action.**Drug news and perspect**,v.20,n.8, New York, p. 55-87. 2002.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2 ed. Academic Press, p. 224, 1997.

NYSTROM, F.H.; QUON, M.J. Insulin signallig: metabolic pathways and mechanisms for specificity. **Cellular Signalling**, v. 11, p. 563-574, 1999.

OIKININE, R.; MOORADIAN, A.D. Drug therapy of diabetes in the elderly. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, p. 231-239, 2003.

OLEFSKY JM, CIARALDI TP, KOLTERMAN OG: Mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent (type II) diabetes. **The American Journal of Medicine** .v.79, pag.12–22, 1985.

PÂQUET, M. R.; ROMANEK, R. J.; SARGEANT, R. J. Vanadate induces the recruitment of glut - 4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry,** v. 109, p. 149 - 155, 1992.

PERTSEVA, M.N., et al. A novel view on the mechanisms of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenyli cyclase signaling system. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134,Part B, p. 11-36, 2003.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Insulin therapies past, present and future. **Drug Discovery Today**, v. 6, n .20, p.1056-1060, 2001.

POSNER, B. I, et al. Peroxovanadium compounds: a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitor wich are insulin mimetics. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 4596 – 4604, 1994.

PUGAZHENTHI, S., et al,Decrease in protein tyrosine phosphatase activities in vanadate-treated obese Zucker (fa/fa) rat liver**. Molecular and Celular Biochemistry**, v. 153, p. 125-129, 1995.

RAO, B. K., et al. Antidiabetic activity of Terminalia pallida fruit in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 169-172, 2003.

RATO, L., et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, p. 330-338, 2012.

SAAD F., The role of testosterone in type 2 diabetes and metabolic syndrome in men. **Arquivo brasileiro de endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 8, p. 901-907, 2009.

SAKURAI, H., et al, Antidiabetic vanadium (IV) and zinc (II) complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, V. 226, p .187 – 198, 2002.

SEALE, A. P.**,** et al. Vanadium and insulin increase adiponectin production in 3T3-L1 adipocytes. **Pharmacol ogical research,** V.**54**,n.1p. 30-8. Jul.2006.

JOSHI SR, PARIK H Rakesh M,DAS, A. K. Insulin History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. **Supplement of japi**,v. 55,p.19-25. july.2013

SHECHTER Y, KARLISH SJ. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. **Nature**.v.10,n. 284,p. 556–558. Jan.1980.

SHECHTER Y. Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. **Diabetes**; v.39,n.1,p. 1–5.1990.

SHISHEVA, A; SHECHTER, Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor fuction in vitro and the bioresponse of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. **Biochemistry**, v. 31, p. 8059 – 8063, 1992.

SMITH, M. J., et al. Unraveling the chemistry of tunichrome. **Accounts of chemical research***.* v.24, n.4,p. 117-124. 1991.

SOARES M. A., Diabetes Mellitus, 2 ed, **Associação Nacional das Farmácias**, CEDIME, 1992.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES .Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes. São Paulo: **AC Farmacêutica.**Gen.2014/. 382.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002**. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2. São Paulo; 2003.

SRIVASTAVA A. K., MEHDI M. Z. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. **Diabetic medicin,** v. 22, n. 1, p. 2-13, 2004.

SRIVASTAVA AK. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. **Mol Cell Biochem;**v. 206,n.1-6, p.177–182. 2000.

SRIVASTAVA, AK; MEHDI, MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. **Diabetic Medicine** v.22,n.1, 2-13 .2005.

SUN XJ, et al. Structure of the insulin receptor substrate irs-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**,v.4,p.352:73-7. 1999.

TAYLOR SI, ACCILI D, IMAI Y. Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? **Diabetes**,v. 43.n.6,p.735-40. 1994.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the

diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**,v. 20,p.1183-97, 1997.

TOLMAN EL, et al. Effects ofvanadium on glucose metabolism *in vitro*. **Life Sciences,**v.25,p. 1159–1164,1979.

TRITOS N A, MANTZOROS CS, Clinical review 97: syndromes of severe insulin resistance**. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**n. 83,p.3025–3030, 1998.

TSIANI, E.; FANTUS, I. G. Vanadium compounds: Biological actions and potential as pharmacological agents. **Trends in Endocrinology Metabolism,** v. 8, p. 51 - 58, 1997.

UEKI, H.; SERA, M.; TANAKA, K. Stimulatory release of lipoprotein lipase activity from rat fat pads by vanadate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 272, p.18 – 24, 1989.

VESTERGAARD H, LUND S, PEDERSEN O: Rosiglitazone treatment of patients with extreme insulin resistance and diabetes mellitus due to insulin receptor mutations has no effects on glucose and lipid metabolism. **Journal of internal medicine** 250:406–414, 2001

VOET, Donald; Pratt., Charlotte. **Principios de bioquímica**. 4ª ed. Willey, 2012. 1208 p.

WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. Subcellular compartmentalization and traffickind of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. **Experimental Cell Research**, v. 271, p. 75-83, 2001.

WERDEN K.et al., Stimulatory (insulin-mimetic) and inhibitory (ouabain-like) action of vanadate on potassium uptake and cellular sodium and potassium in heart cells in culture. **Biochimica et biophysica Acta**. v.23, p.79-93, abr.1982.

WHITE MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. **Diabetologia**.v.40, n.S2-S1,jul. 1997

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, **World Health Organization**, 59p.1999.

YW CHEN, et al, Heavy metals, islet function and diabetes development**. Islets**, v.1, n.3, p.17-169, dez .2009.

ZARZYCKI W, ZIENIEWICZ M. Reproductive disturbances in type 1 diabetic women. **Neuro Endocrinology Letters**.; Polônia, v. 26, n. 6, p. 8-733, jan. 2015.

CAPÍTULO 1

Avaliação da eficiência de novo composto de vanádio : Estudo in vitro (adpócitos humanos isolados) e do seu mecanismo insulino mimético através da ativação de vias sinalizadoras intracelulares.

Ana Katharyne Ferreira Fagundes Rossiter; Meenu Rohini Rajan; Lidiane Macedo Alves de Lima;Valdemiro Amaro da Silva Júnior;Wagner Eduardo da Silva; Monica Freire Belian; Peter Strålfors

RESUMO

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica caracterizada pela deficiência na secreção e/ou na ação da insulina que é um hormônio que apresenta ação anabólica em diferentes tipos celulares. A procura por novas drogas que minimizem os efeitos ocasionados pela diabetes vem aumentando a cada dia. Este trabalho investigou a ação de dois compostos de vanádio (sulfato de vanadila e VBHED) sobre a cascata de sinalização da insulina em adipócitos humanos de pacientes diabéticos (n=5) e não diabéticos (n=5). Teve como objetivo identificar alterações na ativação e / ou expressão de sinalização de vias metabólicas importantes que pudessem gerar efeitos positivos através da utilização dos métodos de SDS-PAGE e Imunotransferência utilizando anticorpos. De acordo com o grupo experimental foram utilizados a insulina, o sulfato de vanadila ou a nova substância à base de vanádio VBHED durante 30 minutos em adipócitos humanos. Para a expressão das proteínas S6kip, S6, PKB, IRS1, não houve diferença significativa entre os grupos. A expressão da proteína ERK-12 apresentou grau de fosforilação maior tanto em adipócitos dos pacientes diabéticos como nos adipócitos dos pacientes não diabéticos tratados com sulfato de vanadila e VBHED, sem diferença significativa para os tratados com insulina. Nossos dados sugerem que o novo composto a base de vanádio promove efeito semelhante ou melhor do que o sulfato de vanadila, porém como há uma grande variedade entre os pacientes se faz necessário novos estudos em um número maior de indivíduos para que se possam tirar melhores conclusões.

Palavras-chave: Vanádio. Diabetes. Adipócitos. Antidiabético. Sinalização.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* is a metabolic disorder characterized by a deficiency in the secretion and/or action of the insulin, which is a hormone that has anabolic effects on different cell types. The search for new drugs to minimize the effects caused by diabetes is increasing every day. This study investigated the effect of two compounds of Vanadium (vanadyl sulfate and VBHED) on the insulin signaling cascade in human adipocytes in diabetic patients (n = 5) and non-diabetic (n = 5). It aimed to identify changes in the activation and/or signaling expression of important metabolic pathways that could generate positive effects by using SDS-PAGE and immunoblotting methods through antibodies. According to the experimental group, insulin, vanadyl sulfate or the new vanadium-based substance VBHED were used for 30 min in human adipocytes.

For the expression of proteins S6kip, S6, Akt, IRS1, there was no significant difference between groups. The expression of ERK-12 protein showed a greater degree of phosphorylation in adipocytes of both diabetic patients and nondiabetic patients treated with vanadyl sulfate and VBHED, without significant difference to those treated with insulin. Our data suggest that the new vanadium-based compound promotes an effect similar to or better than vanadyl sulfate. However, as there is a wide variety among patients, it is needed to conduct studies in a large number of individuals so that better conclusions can be drawn.

Key words: Vanadium. Diabetes.Adipocytes. Antidiabetic. Signaling

1 **INTRODUÇÃO**

Diabetes *mellitus* (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas (1).Esta doença se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida. A hiperglicemia crônica está associada a dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (2).

Terapias Antidiabéticas atuais são geralmente seguras e eficazes, mas sofrem de certas limitações. A insulina, por exemplo, requer a ação do receptor funcional de insulina, e terapias antidiabéticas orais não insulínicas adicionalmente exigem níveis mínimos endógenos de insulina. Como resultado dessas limitações, os pacientes com grave resistência à insulina, que inclui pacientes diabéticos, gravemente avançados, atualmente carecem de tratamento efetivo. Esta é uma preocupação crescente, porque o número de pacientes com resistência à insulina grave está aumentando em relação direta com a atual epidemia global de diabetes (3,4). A quantidade de defeitos na via de sinalização da insulina tem sido relatada em pacientes diabéticos tipo 2 (3,5).

Há anos vem-se aumentando a procura por novos agentes terapêuticos que sejam mais eficientes no tratamento do diabetes; Nos últimos anos estudos foram realizados demonstrando que compostos à base de vanádio exercem

vários efeitos insulino-miméticos e antidiabéticos tanto *in vitro* como *in vivo* (6, 7,8,9,10).

Este trabalho visou avaliar a eficiência de novo composta à base de vanádio in vitro (adipócitos humanos isolados) através do mecanismo de ação intracelular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um consentimento informal foi obtido de todos os pacientes. Os procedimentos foram aprovados pelo conselho de ética (00-398) da Universidade de Linköping, Suécia, e foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque. A gordura subcutânea foi obtida de cirurgias abdominais eletivas durante a anestesia geral. Uma fatia de tecido subcutâneo da pele da fáscia e muscular foi excisado. Os sujeitos foram recrutados consecutivamente de cirurgia eletiva no Hospital Universitário de Linköping-Norrköping. Dez pacientes do sexo feminino foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (n=5),pacientes diagnosticadas com diabetes tipo 2 e com Índice de massa corpórea (IMC) ≥28 e Grupo 2(n=5), pacientes que não possuíam diagnóstico para diabetes tipo 2 e que apresentavam IMC ≤ 28.

Anticorpos policlonais de coelho anti-fosfo-p70S6K-thr389 (#9205), anti-fosfo-S6-ser235/236 (#2211),anti-fosfo-ERK1/2-thr202/tyr204 (#9101) e anti-fosfo-IRS1-Ser302 (murine sequence,#2384) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anticorpo Monoclonal de camundongo anti-β-tubulina da Sigma-Aldrich (T5201, St. Louis, MO, USA). Coelho anti-pan-AKT (phospho T308) (ab38449) e camundongo anti-fosfotirosina anticorpo PY20 (ab10321) foram adquiridos da abcam.

2.1 ISOLAMENTO E INCUBAÇÃO DE ADIPÓCITOS

Os adipócitos foram isolados a partir de tecido adiposo subcutâneo, sofreram processo de digestão por colagenase (tipo 1, Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, EUA), tal como descrito (11). As células foram tratadas e incubadas em solução de Krebs-Ringer (0.12 mol $^{L-1}$ NaCl, 4.7 mmol^{L-1} KCl, 2.5 mmol^{L-1} $CaCl_2$, 1.2 mmol^{L-1} $MgSO_4$, e 1.2 mmol^{L-1} KH_2PO

contendo 20 $mmol^{L-1}$ de HEPES, pH 7.40, 1% (w/v) albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA, 100 nm^{L-1} Isopropil Fenil Adenosina e 0.5 units/ml adenosina deaminase com 2 mm^{L-1} glucose, a 37 °C em a agitado em banho maria (12). Depois da incubação overnight as células foram lavadas e encubadas de acordo com o tratamento: água, insulina,sulfato de vanadila($VOSO_4$) ou novo composto (VBHED).

2.2 ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE) E IMUNOTRANSFERASE

Após a incubação, as células foram separadas do meio usando centrifugação. Para minimizar a sinalização da pós-incubação e modificações de proteínas, que podem ocorrer durante a imunoprecipitação, as células foram imediatamente dissolvidas em SDS e β-mercaptoetanol com inibidores de protease e fosfatase de proteína, congeladas num período de 10s e descongeladas em água fervente para posterior processamento (12) para SDS page e imunotransferência (13).

Com a utilização da eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, as proteínas foram separadas, transferidas para uma membrana de PVDF e identificadas utilizando anticorpos específicos. A imunotransferência é uma técnica semi-quantitativa que pode proporcionar dados de fosforilação específicos do local. Igual quantidade de proteínas de cada amostra foram carregadas em cada caminho do gel.

COMPOSTOS DE VANÁDIO

Os compostos à base de vanádio codificados como $VOSO_4$ e VBHED foram cedidos pela aluna do programa de pós-graduação em química (Lidiane Macedo Alves de Lima) e foram caracterizados através das técnicas espectroscópicas de infravermelho (FTIR), Absorção eletrônica na região do UV-visível, bem como, RMN ^{1}H, RMN ^{13}C e análise térmica.

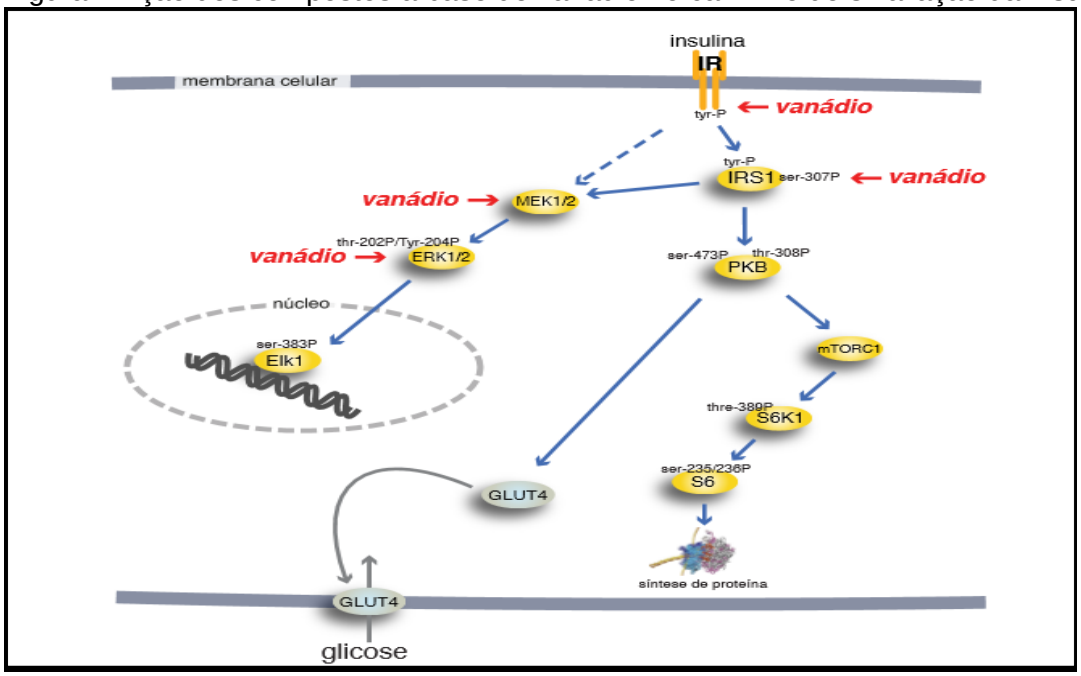
3 ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *GRAPHPAD PRISMA 5*. Foi realizado o teste t de student e os valores de $p<0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

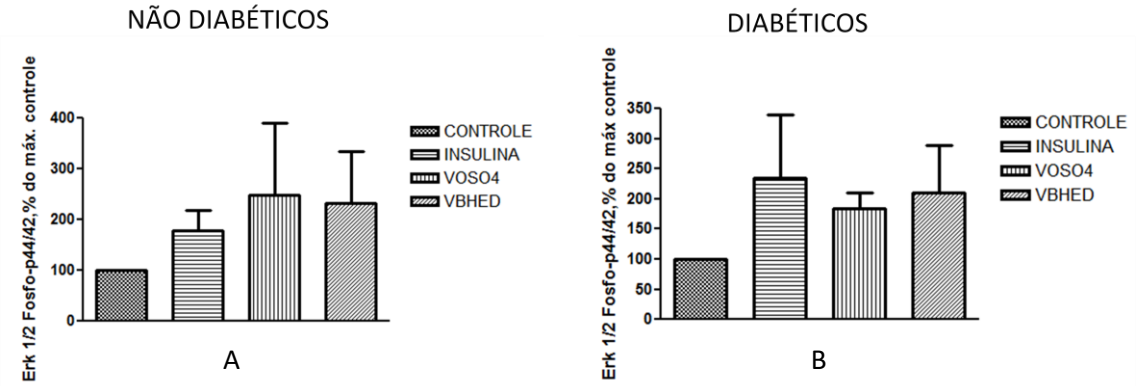
Os compostos de vanádio, tais como o sulfato de vanadila, interferem com a transdução do sinal através da fosforilação em resíduos de tirosina em proteínas, especialmente através da inibição das proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) específicas ou por ativação de proteínas tirosina quinases - específica (14,15).(Goc e crans) Por isso nós investigamos os efeitos dos dois compostos de vanádio $VOSO_4$ e V-BHED na transdução de sinal em resposta à insulina nos adipócitos humanos primários, com foco em proteínas-alvo dos diferentes ramos na cascata de sinalização da fosforilação da tirosina (Figura 1). Foram avaliados adipócitos de indivíduos humanos como controle não diabéticos e de pacientes obesos com diagnóstico de diabetes.

Figura 1 Ação dos compostos a base de vanádio no caminho de sinaliação da insulina.



Fonte: Stralfors (2016).

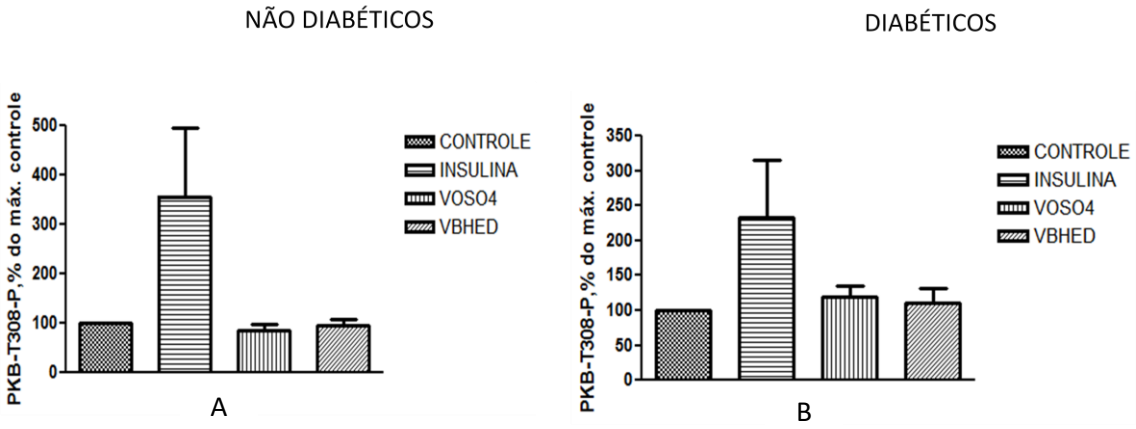
Figura 2 Fosforilação da ERK 1/2 em adipócitos humanos. Adipócitos humanos submetidos a tratamento com água e tampão (controle), insulina, sulfato de vanadila ($VOSO_4$) e novo composto à base de vanádio (VBHED), durante 30 minutos. Pacientes não diabéticos e pacientes diabéticos (diabetes tipo 2).



Fonte: O autor (2016).

Inicialmente comparamos os efeitos da insulina e os compostos de vanádio sobre a via de cascata MAPKs da rede de sinalização, através da análise da fosforilação da proteína quinase ERK1/2. Não houve efeitos estatisticamente significativos, mas os dados sugerem um efeito semelhante ao da insulina de ambos os compostos à base de vanádio $VOSO_4$ e V-BHED com magnitude comparável ao efeito da insulina (Figura 2). Não houve diferença entre os dois compostos de vanádio. Também não houve diferença nos efeitos nas células de indivíduos controles não diabéticos (2A) e de pacientes com diabetes tipo 2 (2B).

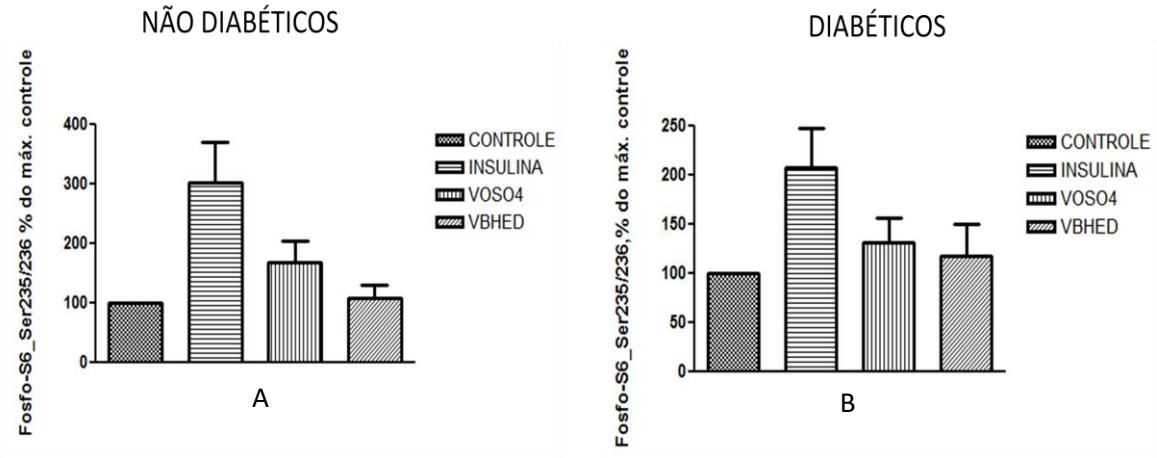
Figura 3 Fosforilação da PKB em adipócitos humanos. Adipócitos humanos submetidos a tratamento com água e tampão (CONTROLE), INSULINA, Sulfato de vanadila ($VOSO_4$) e novo composto à base de vanádio (VBHED), durante 30 minutos. Pacientes não diabéticos e pacientes diabéticos (diabetes tipo 2).



Fonte: O autor (2016).

Em seguida, analisamos os efeitos da insulina e dos compostos de vanádio sobre a fosforilação da proteína quinase PKB na treonina-308, a qual é da cascata de RI e IRS1, e que seguem no controle da absorção de glicose e o controle da síntese de proteínas através fosforilação da proteína ribossomal S6. Considerando que não houve efeitos estatisticamente significativos, a insulina induziu um aumento de 2-3 vezes na fosforilação da PKB em ambas as células de indivíduos do grupo controle não diabéticos e em pacientes com diabetes tipo 2 (Figura 3). Em contraste, nenhum dos compostos de vanádio exibiu qualquer efeito sobre a fosforilação da PKB.

Figura 4 Fosforilação da S6 em adipócitos humanos. Adipócitos humanos submetidos a tratamento com água e tampão (CONTROLE), INSULINA, Sulfato de vanadila ($VOSO_4$) e novo composto à base de vanádio (VBHED), durante 30 minutos. Pacientes não diabéticos e pacientes diabéticos (diabetes tipo2).



Fonte: O autor (2016).

A fim de examinar também a cascata de fosforilação da PKB para controle do crescimento e da síntese de proteínas na cascata da proteína quinase da mTOR no complexo com Raptor (mTORC1), também foram avaliados os efeitos dos dois compostos de vanádio na fosforilação do S6 proteína ribossômica. A insulina novamente produziu um aumento de 2-3 vezes na fosforilação de S6 (embora não estatisticamente significativa), mas ambos os compostos de vanádio não conseguiu desencadear uma resposta, quer nas células do grupo controle ou nas células do grupo diabético (Figura 4).

Também foi examinado a fosforilação de IRS1 em resíduos de tirosina usando o anticorpo PY20, mas o lote disponível comercialmente do anticorpo não permitiu detectar qualquer efeito da insulina sobre IRS1 (não mostrado em figura).

5 DISCUSSÃO

O vanádio está normalmente presente em concentrações muito baixas em todas as células de animais e plantas, apresentando propriedades benéficas a baixas concentrações e sendo por isso considerado um elemento traço para o Homem. No entanto, uma vez que o seu metabolismo ainda não está suficientemente elucidado, tem vindo cada vez mais a despertar atenção como potencial agente terapêutico. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm vindo a

clarificar algumas hipóteses sobre o seu mecanismo de ação (16,17). Os estudos *in vitro* permitiram a avaliação dos diversos efeitos dos sais de vanádio sobre o metabolismo de diferentes tipos celulares e tecidos (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25), porém os estudos *in vitro*, em células humanas, ainda é muito reduzido. Seus efeitos e mecanismos de ação têm sido estudados em vários tipos de células e espécies, incluindo os estudos *in vivo* de seres humanos. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em adipócitos isolados primários humanos utilizando o vanádio, obtidos a partir de indivíduos não diabéticos bem como em pacientes com diabetes do tipo 2. Isto é de importância para a investigação translacional destinada a estabelecer compostos de vanádio como drogas. É, contudo, também importante porque a doença começa na expansão do tecido adiposo da obesidade, que responde tornando-se resistentes à insulina. O armazenamento comprometido de gordura nos adipócitos faz com que ocorra armazenamento de gordura ectópica em outros tipos de células no corpo, em particular de células de músculo e fígado, que futuramente, também se tornam resistentes à insulina. Qualquer tratamento eficaz da doença deve ter como objetivo melhorar o metabolismo dos adipócitos.

Os resultados obtidos sugerem que tanto a VS e V-BHED induzem efeito mimético à insulina sobre a via da MAP-kinase em adipócitos humanos primários. Além disso, este efeito foi o mesmo em células de indivíduos do grupo controle não diabéticos e dos pacientes com diabetes tipo 2, isto pode ser explicado por causa do efeito bastante limitado de resistência à insulina e diabetes na sinalização da insulina através da via MAPK(26). As ERKs fazem parte da família das MAPKs, proteínas envolvidas com mitogênese, diferenciação celular, regulação metabólica, crescimento celular, organização do citoesqueleto, transporte vesicular, apoptose, resposta a estresse (27). Na última década, vários estudos, *in vitro*, em diferentes linhagens celulares reportaram ação dos sais de vanádio e compostos de vanádio peroxidados na ativação de MAPKs (28,29,30,31,32). Foi relatado ativação diferenciada de ERK 1 e ERK 2 (33).

Tem sido reportado que compostos à base de vanádio efetuam fosforilação de tirosina em diferentes tipos de células (34). Em adipócitos humanos os compostos de vanádio, curiosamente, não tiveram efeito sobre a

fosforilação das proteínas PKB ou S6, embora ambos sejam da cascata da fosforilação de tirosina de ambos IR e do IRS 1 na via de sinalização de insulina. A fosforilação de IR e IRS1 aparentemente não é afetada pelos dois compostos de vanádio. Ambos MEK1 / 2 e seu substrato ERK1/2 são controlados através da fosforilação de um resíduo de treonina e de tirosina na respectiva proteína, o que pode explicar os efeitos insulino-miméticos dos dois compostos de vanádio sobre a fosforilação de ERK1 / 2, que foi analisado com anticorpos específicos para a fosforilação, tanto a treonina-202 e da tirosina-204. Os dados, no entanto, não nos permitem distinguir qualquer efeito sobre MEK1 / 2 e / ou ERK1 / 2.

6 CONCLUSÕES

Os mecanismos intracelulares exatos que estão envolvidos nas ações do vanádio ainda não estão totalmente elucidados, porém os estudos vêm aumentando a cada dia, sendo já conhecidos alguns mecanismos de ação. Apesar disso tem sido bastante difícil concluir precisamente sobre os efeitos dos compostos de vanádio como potenciais fármacos antidiabéticos. Resultados experimentais são notoriamente variáveis, especialmente em estudos *in vivo* de seres humanos (34).

No presente estudo foram examinados os efeitos sobre adipócitos isolados dos compostos de vanádio *in vitro.* Seria interessante novas pesquisas para avaliar os efeitos da adição destes compostos juntamente com a insulina. É possível que existam efeitos aditivos, sinérgicos ou até mesmo que possam produzir efeitos sobre a cascata de sinalização da PKB. Uma outra limitação do estudo é que apenas 30 minutos de incubação com os compostos de vanádio foi analisada. Sabe-se que os efeitos antidiabéticos de alguns compostos de vanádio em ratos diabético ob/ob (mutante em leptina) ou db/db(mutantes de receptor de leptina) requerem até três semanas de tratamento(35). Portanto, pode ser interessante examinar também longos períodos de tempo (horas ou alguns dias) de incubação dos adipócitos com os compostos de vanádio antes da análise dos efeitos sobre as células.

O fato dos dois compostos de vanádio examinados serem indistinguíveis em relação aos efeitos e ausência de efeito

sobre os adipócitos humanos, indica que o composto V-BHED é comparável ao tradicional $VOSO_4$ composto. No que diz respeito ao V-BHED constitui a base de um novo grupo de derivados de vanádio que pode ser examinado e pode revelar-se útil como candidatos a fármacos.

REFERÊNCIAS

[1] SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes**. v. 1, ed. 2014-2015, São Paulo. Editora GEN, 2014. p.382.

[2] UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (ukpds 33). Ed.352, **Lancet**, v. 12,. p. 837-853. 1998

[3] OLEFSKY, J. M.; CIARALDI, T. P.; KOLTERMAN, O. G. Mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent (type ii) diabetes. **The american Journal of medicine**, v.70, n.1,p.12–22, 1985.

[4] TRITOS, N. A.; MANTZOROS, C. S. Clinical review 97: syndromes of severe insulinresistance. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**,v.83, n.9, p.3025–3030, 1998.

[5] BAILEY, C. J. Potential new treatments for type 2 diabetes. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21,n.7, p. 259 – 265, 2000.

[6] SHECHTER, Y. Insulin-mimetic effects of vanadate: possible implications for future treatment of diabetes. **Diabetes**.; v.39,n.1,p. 1–5. 1990.

[7] SRIVASTAVA, A. K. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. **Molecular and cellular Biochemistry**, v.206.p. 177–182. 2000.

[8] VESTERGAARD, H.; LUND, S.; PEDERSEN, O. Rosiglitazone treatment of patients with extreme insulin resistance and diabetes mellitus due to insulin receptor mutations has no effects on glucose and lipid metabolism. **Journal of internal medicine.** v.250,n.5,p.406–414, 2001.

[9] EL KARIB, A. O.. et al.,Insulin and vanadium protect against osteoarthritis development secondary to Diabetes mellitus in rats. **Archives of physiology Biochemistry.,**v.122,n.3**,**p.1-27 ,2016.

[10] PIRMORADI, L., et al. Quantitative assessment of proliferative effects of oral vanadium on pancreatic islet volumes and beta cell numbers of diabetic rats. **Iranian Biomedical Journal** v.20, n. 1, p. 18-25,2016.

[11] STRÅLFORS, P.; HONNOR, R. C. Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase: correlation with lipolysis and camp-dependent protein kinase activity. **European Jounal Biochemistry**. v.182,n.11,p.379–385 ,1989.

[12] DANIELSSON, A., et al., Insulin resistance in human adipocytes down stream of irs1 after surgical cell isolation, but at the level of phosphorylation of irs1 in type 2 diabetes. **The FEBS Journal.** v.272,n.1,p.141–151 ,2005.

[14] GOC, A. Biological activity of vanadium compounds. **Central European Journal of Biology,**v.1,n.3, p. 314-332. 2006.

[15] CRANS, D. C., et al. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. **Chemical Reviews,** v.104, n.2. p. 849-902. 2004

[16] BARCELOUX, D. G. Vanadium. **Journal of toxicology**,v.37,n.2, p. 265-78. 1999.

[17] ORVIG, C., et al., Vanadium compounds as insulin mimics. **Metal ions of Biological Systems**, v.31p.575-94,1995.

[18] DUBYAK, G. R.; KLEINZELLER, A. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 11, p. 5306 – 5312, 1980.

[19] CLARCK, A. S.; FAGAN, J. M.; MITCH, W. E. Selectivity of the insulin-like actions of vanadate on glucose and protein metabolism in skeletal muscle. **The Biochemical Journal,** v.232, i.1, p. 273 – 276, 1985.

[20] CAREY, J. O.; AZEVEDO, J. l.; MORRIS, P. G.; PORIES, W. J.; DOHM, G. l. Okadaic acid, vanadate, and phenylarsine oxide stimulate 2-deoxyglucose transport in insulinresistant human skeletal muscle. **Diabetes,** v. 44, p. 682 – 688, 1995.

[21] DHECHTER, Y.; KARLISH, S. J. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (iv) ions**. Nature,** 284: 556 – 558, 1980.

[22] DUCKWORTH, W. C.; SOLOMON, S. S.; LIEPNIEKS, J.; HAMEL, F. G.; HAND, S.; PEAVY, D. E. Insulin-like effects of vanadate in isolated rat adipocytes. **Endocrinology**, 122: 2285 – 2289, 1988.

[23] JACKSON, T. K.; SALHANICK, A. I.; SPARKS, J. D.; SPARKS, C. E.; BOLOGNINO, M.; AMATRUDA, J. M. Insulin-mimetic effects of vanadate in primary cultures of rat hepatocytes. **Diabetes**, v. 37, p. 1234 – 1240, 1988.

[24] BEGANI, I.; GOCHIN, M.; KARLISH, S. J. D.; SHECHTER, Y. Electron paramagnetic resonance studies and insulin-like effects of vanadium in rat adipocytes. **Biochemistry**, 1981, 20: 5795, 1981.

[25] BOSCH, F., et al., Vanadate inhibits expression of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (gtp) in rat hepatoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 13677 -13682, 1990.

[26] NYMAN, E., et al. A single mechanism can explain network-wide insulin resistance in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.289.n.48,p. 33215-30, 2014.

[27] DENHARDT, D. T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by ras/rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. **Journal of Biochemistry**, v. 318, p. 729 – 747, 1996.

[28] THÉBERGE, J., et al., Prolongation of insulin-induced activation of mitogen-activated protein kinases erk 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase by vanadyl sulfate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 420, p. 9 – 17, 2003.

[29] CEROVAC, Z., et al., Activation of mapk by potassium bisperoxo (1, 10-phenanthroline) oxovanadate (v). **Neurochemistry International**, v. 34, p. 337 – 344, 1999.

[30] KRADY, M., et al, Pervanadate elicits proliferation and mediates activation of mitogen-activated protein (map) kinase in the nucleus. **FEBS (Federation of European Biochemical Societies)** , v. 412, p. 420 – 424, 1997.

[31] HEI, Y.J.,Skeletal muscle mitogen-activated protein kinases and ribosomal s6 kinases. **Diabetes**, v. 44, p. 1147 – 1155, 1995.

[32] PANDEY, S. K.; CHIASSON, J.; SRIVASTAVA, A. K. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (map) kinases and ribosomal s6 kinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 69 – 78, 1995.

[33] SARBASSOV, D. D.; JONES, I. G.; PETERSON, C. A. Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 respond differently to mitogenic and differentiative signaling pathways in myoblasts. **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 2038 – 2047, 1997.

[34] GOLDFINE, A. B., et al., Metabolic effects of vanadyl sulfate in humans with non-insulin-dependent diabetes mellitus: in vivo and in vitro studies. **Metabolism,** v.49,n.3, p.400-410. 2000

[35] Meyerovitch J, et al., Vanadate normalizes hyperglycemia in two mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v.87,n.4,p.1286–1294,1991.

CAPÍTULO 2

EFEITO DE NOVOS COMPOSTOS À BASE DE VANÁDIO SOBRE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS TESTICULARES E NíVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA EM RATOS WISTAR DIABÉTICOS.

Ana Katharyne Ferreira Fagundes Rossiter; Lidiane Macedo Alves de Lima;Wagner Eduardo da Silva; Mônica Freire Belian; Alluanan Adelson do Nascimento Silva; Fabiana Félix de Oliveira;Jéssica Santana de Oliveira;Valdemiro Amaro da Silva Júnior

RESUMO

A Diabetes mellitus é uma doença que acomete milhões de pessoas no mundo, surge por problema na ação da insulina ou pela deficiência da sua secreção. A insulina é um hormônio que apresenta ação anabólica e regula vários processos fisiológicos em diferentes tipos celulares. Quando este hormônio não age adequadamente e o organismo apresenta deficiência em seu metabolismo, faz- se necessário a busca por novas drogas que atuam na melhoria dos efeitos causados pelo diabetes. O objetivo deste trabalho foi observar se os tratamentos com compostos à base de vanádio foram capazes de diminuir ou amenizar as lesões em testículo e outros órgãos reprodutores de ratos Wistar diabéticos induzidos por streptozotocina.Para o experimento foram utilizados 25 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus).* Os ratos com 70 dias de idade foram escolhidos por amostragem não probabilística de conveniência e submetidos aos diversos tratamentos, de acordo com o grupo experimental: grupo G1: animais diabéticos (n=5); G2:animais diabéticos tratados com insulina (n=5); grupo G3: animais diabéticos tratados com composto, à base de vanádio(Sulfato de vanadila ($VOSO_4$)) (n=5); grupo G4: animais diabéticos tratados com novo composto à base de vanádio codificado como L02 (n=5); grupo G5: animais diabéticos tratados com novo composto à base de vanádio codificado como VBHED (n=5); Ao final do período experimental os animais foram perfundidos para avaliar as alterações decorrentes do DM sobre órgãos reprodutivos(testículos, epidídimos, próstata, glândula seminal), além de peso corporal, glicemia, testosterona,avaliação do volume do núcleo da célula de leydig e histopatologia dos testículos. Para todas as substâncias à base de vanádio a que promoveram efeitos semelhantes aos da insulina, foi a nova substância à base de vanádio VBHED que foi utilizada pela primeira vez neste trabalho.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disease that affects millions of people worldwide. It arises due to a problem in the action of insulin or by a deficiency in its secretion. Insulin is an anabolic hormone that regulates multiple physiological processes in different cell types. When this hormone does not act properly and the body presents deficiency in its metabolism, it becomes necessary to search for new drugs that act to reduce the effects caused by diabetes in the body. The aim of this study was to observe whether treatment with vanadium-based compounds was able to reduce or mitigate injuries in testis and other reproductive organs in diabetic Wistar rats induced with streptozotocina. Twenty-five Wistar rats (Rattus norvegicus var . Albinus) were used for the experiment. Rats with 70 days of age were selected by non-random sample of convenience. They were subjected to various treatments, according to the experimental group: G1: diabetic animals (n = 5); G2: insulin-treated diabetic animals (n = 5); G3: diabetic animals treated with the vanadium-based compound, vanadyl sulfate (VOSO4) (n = 5); G4: diabetic animals treated with vanadium-based compound coded as L02 (n = 5); G5: diabetic animals treated with vanadium-based compound coded as VBHED (n = 5). At the end of the experimental period, the animals were perfused to evaluate changes resulting from DM on reproductive organs (testes, epididymis, prostate, seminal gland), as well as body weight, blood glucose, testosterone, core volume evaluation of Leydig cell and testes histopathology. For all vanadium-based substances, the one that came closest to insulin by the alleviation of deleterious effects was the new vanadium-based substance, which was used for the first time in this study.

INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio polipepitídico que possui uma estrutura covalente e é responsável, juntamente com o glucagon, pela regulação dos níveis sanguíneos de glicose (AHMED, et al, 2007). Deficiência absoluta ou relativa na secreção de insulina e/ou resistência dos tecidos alvos à ação da insulina, podem resultar na doença diabetes mellitus, que leva a um estado metabólico anormal, caracterizado por hiperglicemia crônica e desenvolvimento de patologia microvascular específica na retina, glomérulo renal e nervos periféricos (BEL GI, POLONSKY KS, 2001; BRICHARD SM, HENQUIN JC , 1995; BROWNLEE M, 2001). A disponibilidade de substitutos para insulina tais como os fármacos sulfonilúreas, tiazolidinedionas, metformina, inibidores de b-glicosidase e sais de vanádio podem ser de extrema importância no tratamento da diabetes mellitus. Vários compostos de vanádio têm sido indicados como agentes que possuem grande potencial para o tratamento, por melhorarem a hiperglicemia e a homeostasia anormal da glicose em modelos animais de diabetes tipo I e II (MOUSER J., 2004). A comprovação documentada mais antiga dos efeitos insulinomiméticos compostos à base de vanádio foi publicada em 1899, vinte e dois anos antes da descoberta da insulina. Mas só em 1979, com o grupo Tolman et al (MARX J., 2002), se despertou o interesse nos sais de vanádio; ao demonstrar os efeitos insulinomiméticos dos mesmos. Foi demonstrado em ratos, que vários compostos de vanádio, de uma forma semelhante à insulina, estimulavam o transporte de glicose e a oxidação em adipócitos, aumentavam a síntese de glicogênio no diafrágma e em hepatócitos e inibiam a gliconeogênese em células do fígado. Desde aí, vários estudos revelaram outros efeitos insulinomiméticos dos compostos de vanádio *in vitro* e *in vivo*, incluindo a lipogênese, a sua inibição da lipólise e gliconeogênese (THOMPSON K, ORVIG C., 2000, POUCHERET, P. et al,1998, LAPENNA, D., et al.,2002). Neste trabalho foram avaliados os efeitos insulinomiméticos de substâncias à base de vanádio sobre o efeitos deletérios promovidos pelo diabetes mellitus.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 25 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), machos pertencentes ao biotério da Área de Fisiologia do DMFA/UFRPE e do departamento de Anatomia da UFPE, os quais foram mantidos na temperatura $23 \pm 1^{o}C$, em ciclo claro-escuro de 12 horas.Os animais foram alimentados com ração industrial peletizada,com níveis nutricionais adequados. Água e comida foram oferecidas *ad libitum* até o final do experimento. Os ratos com 70 dias de idade foram escolhidos por amostragem não probabilística de conveniência e submetidos aos diversos tratamentos, de acordo com o grupo experimental: grupo G1: animais diabéticos (n=5); G2: animais diabéticos tratados com insulina (n=5); grupo G3: animais diabéticos tratados com composto à base de vanádio, Sulfato de vanadila ($VOSO_4$) (n=5); grupo G4: animais diabéticos tratados com composto à base de vanádio codificado como L02 (n=5); grupo G5: animais diabéticos tratados com composto à base de vanádio codificado como VBHED (n=5);

Esse estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco com processo n° 23082.015149/2014.

INDUÇÃO AO DIABETES

Os ratos foram induzidos ao diabetes experimental através da administração única de estreptozotocina (STZ – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluída em tampão citrato de sódio (0,1 mol L^{-1}; pH 4,5), por via intraperitoneal, na dose de 60 mg/kg após um jejum de 12 horas. O grupo controle recebeu apenas a solução tampão citrato de sódio também por via intraperitoneal a fim de igualar os níveis de estresse entre os grupos. Após serem induzidos ao diabetes, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas sendo registrados o peso corporal em gramas e colhido o sangue respectivamente, para as dosagens da glicemia (mg/dL). A verificação da glicose sanguínea foi feita em jejum de 12 horas, 7 dias após a indução, sendo

incluídos no experimento apenas aqueles animais que possuíam glicemia acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ). Posteriormente, foram verificados semanalmente a glicose sanguínea (tiras reagentes Accu-Chek Activ),através da coleta de gotas de sangue da ponta da cauda e o peso corporal de todos os animais.

ADMINISTRAÇÃO DOS COMPOSTOS À BASE DE VANÁDIO

Todos os compostos à base de vanádio foram preparados na dose de 100mg/kg e foram administrados através da gavagem, diariamente, durante 60 dias. As soluções à base de vanádio foram trocadas periodicamente e mantidas refrigeradas em garrafas âmbar para evitar degradação pela luz.

TRATAMENTO DO DIABETES

O tratamento teve início após a confirmação do estado diabético por meio da dosagem glicêmica e se estendeu por um período de 60 dias. Para os animais do grupo tratado com insulina, foi utilizada como dosagem padrão a metodologia empregada por Pinheiro et al. (2011), onde foram realizadas duas injeções subcutâneas diárias de insulina humana NPH (Neutral Protamine Harguerdon), duas vezes ao dia, com a administração de 4 unidades/ ml e 1 unidades/ ml. Para os animais tratados com sais de vanádio foi administrada diariamente uma dosagem de 100mg/kg de cada composto através do método de gavagem.

EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL

Ao final do período experimental os animais foram perfundidos para avaliar as alterações decorrentes do diabetes mellitus sobre os animais. Para tal, cada animal foi heparinizado (125UI/100g de peso corporal) e anestesiado por injeção intraperitoneal de quetamina (25mg/kg) associada à xilazina (10mg/kg) na mesma seringa (FANTONI; CORTOPASSI, 1994). Posteriormente foi realizada coleta de sangue total por punção no seio venoso (confluência das veias cavas), centrifugação e acondicionamento de duas alíquotas de 1 ml de plasma sanguíneo em ependorffs à -20°C, para posterior dosagem de testosterona. Após coleta de sangue foi realizada perfusão

intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica e nitroprussiato de sódio (100mg/L; SIGMA), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído (VETEC, Brasil) a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01mol L^{-1}, durante 40 minutos. Após a perfusão com solução fixadora foram removidos e pesados: testículos, epidídimos, próstata, glândula seminal, rim, fígado e pulmão.

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS TESTICULARES E DE ÓRGÃOS REPRODUTORES

DIÂMETRO NUCLEAR DAS CÉLULAS DE LEYDIG

O diâmetro nuclear das células de Leydig foi obtido através da média de duas retas diametralmente opostas em aumento de 1000x. Foram mensurados 30 núcleos por animal e foi aplicada a fórmula do volume da esfera (4/3πR3) para a obtenção do volume individual da célula. (MORAIS et al., 2014).

DOSAGEM DE TESTOSTERONA PLASMÁTICA

De cada animal foram obtidas amostras sanguíneas, por meio de punção cardíaca. O sangue obtido foi envasado em tubos de ensaio contendo anticoagulante e posteriormente foi levado a centrifuga por cinco minutos a 3000rpm. Após a precipitação das células sanguíneas, o soro sobrenadante foi colhido por micropipetas, armazenado em ependoff e guardado em freezer até a realização das dosagens de testosterona. A dosagem foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), com leitura de absorbância em 405 nm(15), conforme descrito por BROWN et al. (2004).

PROCESSAMENTO DOS TESTÍCULOS PARA HISTOPATOLOGIA

Os testículos foram seccionados em fragmentos de até dois mm de espessura, e submetidos à pós-fixação na mesma solução de perfusão. Os fragmentos foram processados para inclusão em resina plástica à base de glicol metacrilato (LEICA), permanecendo imersos em tampão fosfato por 24 horas, sendo posteriormente desidratados em série crescente de alcoóis e incluídos na resina plástica. Cortes histológicos de 4µm de espessura foram corados em hematoxilina eosina, montados e analisados morfologicamente e morfometricamente. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico. Todo processamento para microscopia óptica foi realizado na Área de Patologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Peso corporal e de órgãos reprodutores masculinos(g) e índice gonadossomático - IGS (%) de ratos Wistar adultos diabéticos sem tratamento e diabéticos tratados com insulina, $VOSO_4$,L02 e VBHED.

	Grupos Experimentais				
	Diabéticos	Insulina	L02	$VOSO_4$	VBHED
Peso corporal (g)	224,2 ± 22,91^{ab}	302,0 ± 64,11^{a}	183,0 ± 42,44^{b}	183,2 ± 33,21^{b}	317,0 ± 62,86^{c}
Peso testículo (g)	1,241 ± 0,408^{a}	1,584 ± 0,23^{a}	1,059 ± 0,316^{a}	1,036 ± 0,483^{a}	1,404 ± 0,28^{a}
Epidídimo (g)	0,386 ± 0,148^{a}	0,748 ± 0,06^{b}	0,324 ± 0,082^{a}	0,358 ± 0,183^{a}	0,519 ± 0,17^{b}
Próstata (g)	0,173 ± 0,072^{a}	0,464 ± 0,08^{b}	0,151 ± 0,042^{a}	0,156 ± 0,041^{a}	0,347 ± 0,15^{c}
Glândula Seminal (g)	0,279 ± 0,229^{a}	1,618 ± 0,43^{b}	0,160 ± 0,034^{b}	0,279 ± 0,229^{b}	0,523 ± 0,34^{b}
IGS (%)	0,011 ± 0,004^{a}	0,010 ± 0,003^{a}	0,012 ± 0,005^{a}	0,011 ± 0,005^{a}	0,009 ± 0,002^{a}

Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística p<0,05.

Níveis reduzidos de insulina promovem a ativação de lipases, estimulando a mobilização de gorduras, promovendo a quebra de triglicerídeos com liberação de ácidos graxos livres (FURLAN, 2001; CHIASSON et al., 2003). A queda no peso corporal de indivíduos diabéticos é bastante comum na

maioria dos trabalhos (BALLESTER et al., 2004; BALLESTER et al., 2005; NAVARRO-CASADO et al., 2010). No presente estudo, foram observadas diferenças no peso corporal entre os grupos experimentais. Essa redução pode ser relacionada com a excessiva perda de água e eletrólitos pela urina, que é característica da condição diabética (CHIASSON et al., 2003). O efeito colateral mais óbvio do tratamento com vanádio é a redução no ganho de peso (BRICHARD; HENQUIN, 1995). Os animais tratados com L02 e com $VOSO_4$ apresentaram uma perda de peso em relação aos animais tratados com insulina e com VBHED.

Além da redução do peso corporal, diversos estudos relatam a redução no peso testicular de ratos induzidos ao diabetes experimental (BALLESTER et al., 2004; KHAKI et al., 2010; KIANIFARD et al., 2012). O peso testicular é um parâmetro inicial que tem relação direta com comprimento de túbulos seminíferos, população de células de Sertoli e produção espermática (FRANÇA et al., 2005). Apesar de não ter havido diferença significativa, os animais tratados com o composto à base de vanádio VBHED e com insulina conseguiram manter o peso testicular dos animais se comparadoscom os animais dos grupos diabéticos, L02 e $VOSO_4$.

De acordo com Creasy, (2003) a redução do peso epididimário é indicativa de diminuição da espermatogênese no testículo e redução do conteúdo no epidídimo. Conforme mostrado na tabela 1, houve uma diminuição significativa nos pesos dos epidídimos dos animais diabéticos e dos animais tratados com a droga L02 e $VOSO_4$ em relação aos animais tratados com insulina($p<0,01$). Não houve perda de peso epidídimário nos animais tratados com a droga VBHED porém não houve diferença estatísticas com os demais grupos.($p>0,05$).

A próstata, igualmente ao epidídimo, depende da testosterona para o seu crescimento, diferenciação e manutenção estrutural. É na próstata que ocorre a conversão da testosterona ao seu metabólito mais ativo, 5α-diidrotestosterona (LEE, JANULIS, 1998). Estudos recentes mostram que o diabetes promove redução no peso da próstata ventral e atrofia no epitélio secretor em camundongos indicando que a ausência de insulina, a

hiperglicemia e a queda androgênica decorrentes do diabetes afetam o funcionamento da glândula (CAGNON et al., 2000, RIBEIRO et al., 2006). Os pesos das próstatas dos animais apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais. Os animais tratados com insulina ($p<0,001$) e droga VBHED ($p<0,05$) apresentaram pesos prostáticos maiores do que os animais diabéticos. Para os animais tratados com $VOSO_4$ ($p<0,001$) e $L0_2$ ($p<0,001$) houve uma perda de peso prostático significativo em relação aos pesos das próstatas dos animais do grupo tratado com insulina. A substância VBHED influenciou positivamente na manutenção do peso prostático tanto em relação aos animais tratados com $VOSO_4$ como para os tratados com L02 (ambos com $p<0,05$). Para os demais grupos não houve diferença significativa entre os pesos das próstatas dos animais tratados com o peso prostático dos animais diabéticos, $VOSO_4$ e L02 ($p>0.005$), sugerindo que estas duas substâncias não foram capazes de manter o peso prostático nestes animais.

Houve diminuição do peso da glândula seminal dos animais diabéticos e dos tratados com substâncias de vanádio,L02, $VOSO_4$ e VBHED, em relação aos pesos das glândulas seminais dos animais tratados com insulina ($p<0,001$). Em estudo ultrassonográfico realizado por La Vignera et al. (2010), a presença de atonia funcional da vesícula seminal em homens diabéticos inférteis é verificada. Além da diminuição do peso de órgão reprodutores(KHAKI et al., 2010; KIANIFARD et al., 2012)

O índice gonadossomático (IGS) é uma relação que indica a porcentagem de peso corporal alocada nos testículos (CALDEIRA et al., 2010). Segundo Gomendio et al. (2006), o IGS está ligado diretamente à produção relativa de espermatozóides em espécies de roedores. Neste experimento, não houve diferença significativa entre os grupos.

ANÁLISE DO ÍNDICE GLICÊMICO

Tabela 2. Avaliação de glicose (mg/dl) durante 1ª, 3ª,5ª e 7ª semana. Animais diabéticos adultos submetidos a 60 dias de tratamento. Animais diabéticos sem tratamento e animais diabéticos tratados com insulina,$VOSO_4$, L02 e VBHED.Os valores representam média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística p<0,05.

	Grupos Experimentais				
Semana	Diabéticos	Insulina	$VOSO_4$	L02	VBHED
1ª	427,8 ± 59,44^{a}	99,2 ± 24,55^{b}	218 ± 92,31^{b}	350,2 ± 159,8^{a}	317,2 ± 128,5^{a}
3ª	447,4 ± 75,78^{a}	117,6 ± 43,12^{b}	142,8 ± 113,6^{b}	301,4 ± 139,4^{ab}	325,4 ± 98,26^{a}
5ª	425,0 ± 15,00^{ac}	104,8 ± 24,08^{b}	196,4 ± 120,2^{bc}	249,0 ± 102,5^{bc}	342,6 ± 86,24^{c}
7ª	426,8 ± 29,54^{a}	150,6 ± 66,76^{b}	296,6 ± 161,4^{ab}	338,2 ±176,6^{ab}	178,0 ± 66,17^{b}

A tabela 2 representa os níveis glicêmicos de animais diabéticos durante quatro semanas alternadas. Na primeira semana houve diferença significativa entre alguns grupos em relação à glicose. O grupo tratado com insulina apresentou redução da glicemia significativa em relação ao grupo dos animais diabéticos (p<0,001), ao grupo L02(p<0,01) e VBHED (p<0,05). Na terceira semana houve redução significativa do índice glicêmico da insulina em relação aos diabéticos (p<0,001) e VBHED (p>0,05), já os grupos L02 e $VOSO_4$, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo tratado com insulina. Também houve diminuição significativa da glicemia dos animais tratados com a droga VOSO4 em relação aos animais diabéticos (p<0,001). Na 5ª semana de tratamento, os animais tratados com insulina apresentaram diminuição significativa dos índices glicêmicos em relação ao grupo de diabéticos (p<0,001) e ao grupo VBHED (p<0,01). As substâncias VOSO4 e L02 promoveram redução do índice glicêmico se comparados com os níveis glicêmicos dos animais diabéticos (p<0,01) e (p<0,05) respectivamente. Já na 7ª semana de tratamento só houve diferença estatística apenas nos animais dos grupos tratados com insulina (p<0,01) e dos grupos tratados com VBHED (p<0,05) em relação ao grupo dos animais diabéticos.

Os animais tratados com insulina permaneceram com níveis glicêmicos mais baixos em relação aos outros animais em todas as semanas. Por outro lado, os grupos tratados com compostos à base de vanádio tiveram grande

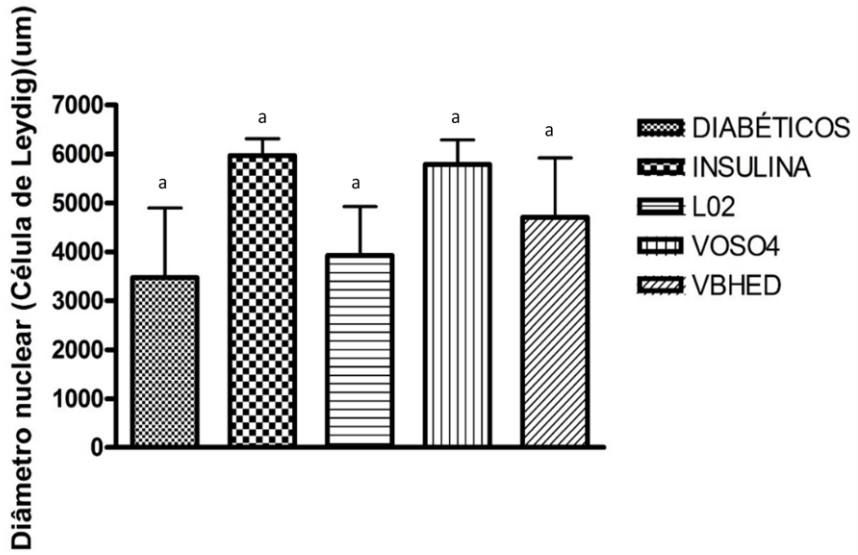
variação dos níveis glicêmicos. Yuen e colaboradores (1997) demonstraram que os complexos de vanádio (IV) VO(ma)2, e VO(ka)2 (0,55 mmol/kg) quando administrados por via oral durante tratamento agudo (0 a 25 horas) em ratos diabéticos, apresentaram efeito hipoglicemiante marcante até 12 horas após o tratamento, porém após 12 horas este efeito se reduz. Isto pode justificar a variação e o aumento de glicose, pois em nosso estudo, os animais receberam uma única dose destes compostos, à base de vanádio, diariamente e os níveis de glicose eram medidos cerca de 24 horas depois da administração por gavagem.

Diâmetro do núcleo das células de Leydig e avaliação dos níveis séricos de testosterona

Na análise do diâmetro do núcleo da célula de Leydig não houve diferença estatística entre os grupos, porém observou-se diminuição do diâmetro do núcleo das células de Leydig dos grupos dos animais diabéticos e do grupo tratado com o composto L02 em relação aos outros grupos tratados com $VOSO_4$, VBHED e com insulina (Figura 1). É provável que os efeitos causados pelo diabetes sobre o diâmetro dos núcleos das células de Leydig tenham sido minimizados por estes compostos que tiveram papel na manutenção do diâmetro nuclear, que está diretamente relacionado com o núcleo da célula de Leydig (quanto maior o volume nuclear maior o volume da célula). Animais com diabetes tem uma tendência à redução do volume da célula de Leydig (KIANIFARD D.,2012) porém a droga $VOSO_4$ e VBHED preveniram os efeitos causados pela diabetes assim como a insulina. Estudos demonstraram lesões testiculares, relacionadas ao nível da glicemia e tempo de exposição, à condição hiperglicêmica, e constataram principalmente a redução do epitélio germinativo e das células de Leydig, e de alterações no processo da espermatogênese em ratos induzidos pela streptozotocina (OKSANEN A, 1973, BRUNING, Rossi GL, 1982). Apesar de alguns estudos demonstrarem redução no número de células de Leydig em animais diabéticos (BRUNING, J.C, 2000), outros não encontraram mudanças estruturais no número ou função dessas células CAMERON, D.F,1985. Alguns trabalhos

mencionaram que esta variação entre os estudos pode ser relacionada com vários fatores como: protocolo de indução, duração do experimento e diferença entre as espécies EL-ROUBY, 2013).

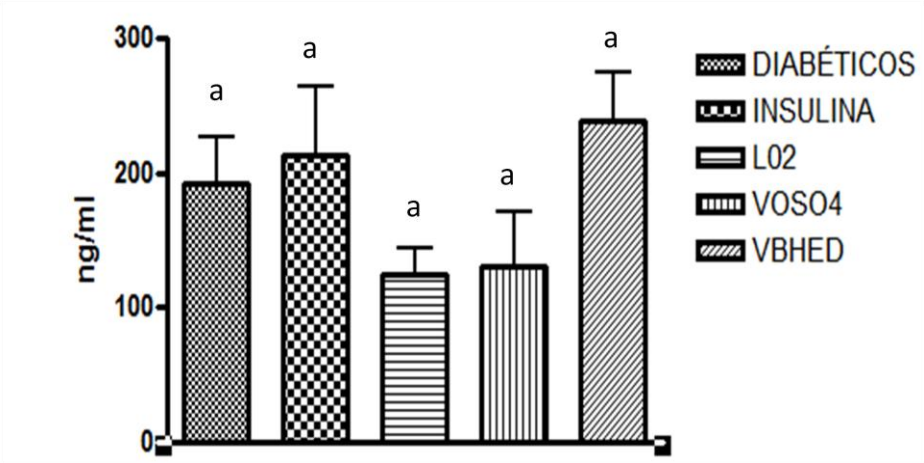
Figura 1 Diâmetros dos núcleos das células de Leydig de animais diabéticos sem tratamento, tratados com insulina, L02,$VOSO_4$ e VBHED.(µm).



Na figura 2, os animais tratados com insulina e a droga VBHED apresentaram uma tendência de melhora e de manutenção dos níveis séricos de testosterona. Já a drogas L02 e $VOSO_4$ não foram eficientes para a manutenção dos níveis de testosterona. Ratos diabéticos três semanas após indução com streptozotocina apresentaram diminuição da testosterona (SCARANO WR, 2006). O diabetes age principalmente causando alterações nos níveis de hormônios importantes para o processo espermatogênico como FSH, LH e testosterona (BALLESTER, J.,2004, AGBAJE, I.M. et al, 2007). Em estudo realizado por BRUNING, J.C. e colaboradores(2000) foi observado a redução do conteúdo de LH em animais que possuíam mutação em receptores de insulina cerebrais. A redução nos níveis de LH age diretamente na funcionalidade das células de Leydig, reduzindo a produção de testosterona (SCHOELLER, E.L. et al, 2012). Esta redução nos níveis de testosterona é um achado comum em animais diabéticos. Neste experimento, apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos, os níveis de testosterona

plasmática tiveram uma tendência de aumento nos grupos tratados com insulina e com VBHED em relação aos animais diabéticos sem tratamento, tratados com L02 e tratados $VOSO_4$.

Figura 2 Níveis séricos de testosterona de animais diabéticos sem tratamento, tratados com insulina, L02, $VOSO_4$ e VBHED.



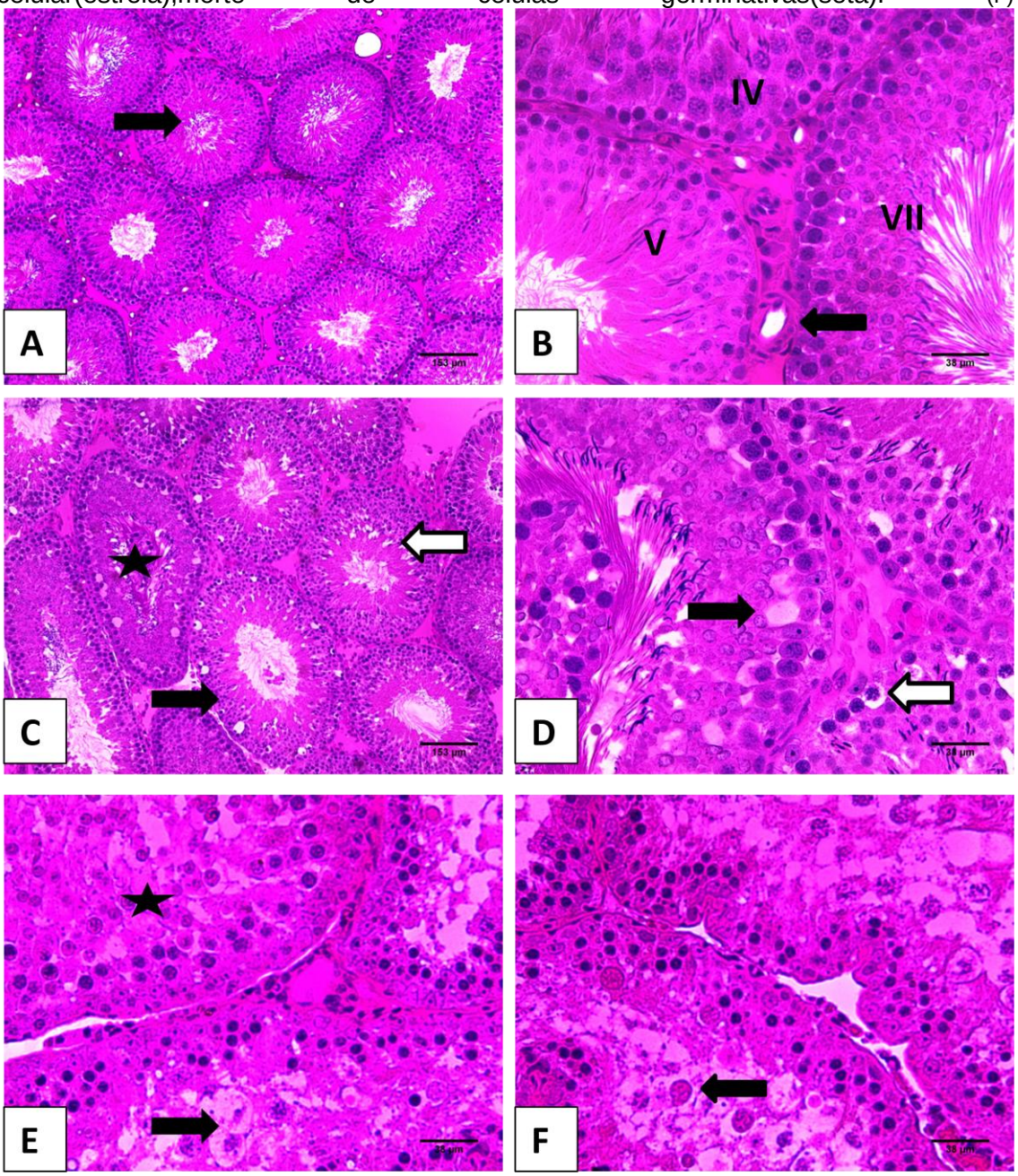
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Na figura 3A e 3B observam-se túbulos seminíferos de animais diabéticos tratados com insulina. Notou-se que não houveram alterações associadas a processo degenerativo, além de túbulos seminíferos em diferentes estágios (IV, V e VII) que confirmam a ausência de lesões no ciclo do epitélio seminíferos neste grupo. Em estudo com ratos diabéticos , todos os tipos de células testículares foram restauradas mediante tratamento com insulina. Além disso, os machos tratados com insulina foram capazes de procriar com sucesso ninhadas de tamanhos normais. (SCHOELLER, E.L , 2012). Neste estudo, a presença deste hormônio foi importante na manutenção da estrutura do parênquima testicular dos animais tratados. A insuficiência de insulina e o comprometimento da ação reguladora em células de Leydig e de Sertoli tem um papel importante em alterações testiculares de pacientes diabéticos (BALLESTER, ET AL, 2004) o que corrobora com nossos achados nos animais diabéticos não tratados onde foram encontradas diversas lesões nos túbulos seminíferos (Figuras 3C, 3D,3E e 3F): Na figura 3C, observa-se a

existência de diversas vacuolizações na porção basal do epitélio seminífero, o que corresponde a processo degenerativo de células espermatogênicas, que podem ocorrer em espermermatócitos I, pré-leptóteno, leptóteno e espermatogônias, assim como em células pós-meióticas do compartimento adluminal. SPALIVIERO J.A., et al., 2004, sugere que os baixos níveis de insulina no plasma podem diminuir significativamente a produção de testosterona, relacionada diretamente com a manutenção da espermatogênese. Além de vacuolizações, pode ser observado células descamadas, afrouxamento do epitélio e morte de células germinativas (Figura 3D). Animais diabéticos induzidos pela streptozotocina apresentaram lesões testiculares relacionadas ao nível da glicemia e tempo de exposição à condição hiperglicêmica, e constaram principalmente a redução do epitélio germinativo e de alterações no processo da espermatogênese (NAVARRO-CASADO,et al., 2010; KIANIFARD, D. et al., 2011).

Nas figuras 3E e 3F, podemos observar afrouxamento do epitélio com descamação e morte celular. Estes achados estão relacionados a redução da altura do epitélio germinativo em função dos processos de degeneração celular ligados à hiperglicemia. Estes dados estão de acordo com a maioria das publicações anteriores (TRINDADE,et al., 2013;RICCI, et al. 2009).

Figura 3. Testículos de ratos adultos diabéticos. Compartimento tubulares em animais diabéticos tratados com insulina(A e B) e sem tratamento(C,D,E e F) durante 60 dias.1(A) Túbulos seminíferos em secção transversal em diversos estágios do epitélio seminífero preservados em animais diabéticos tratados com insulina, aumento de 100x(seta).1(B)Três diferentes estágios da espermatogênese(IV,V e VII)em ratos do grupo tratado com insulina, vaso sanguíneo (seta).1(C).Túbulos seminíferos de animais diabéticos sem tratamento com presença de vacúolos (Seta preta) , afrouxamento do epitélio(seta branca) e células descamadas(estrela) em aumento de 100x. Animais diabéticos sem tratamento 1(D,E e F). Observar a em detalhe a existência de vacuolização da célula de Sértoli (D)(seta preta) e morte de células do epitélio germinativo (seta branca).(E) Afrouxamento do epitélio com descamação celular(estrela),morte de células germinativas(seta). (F)



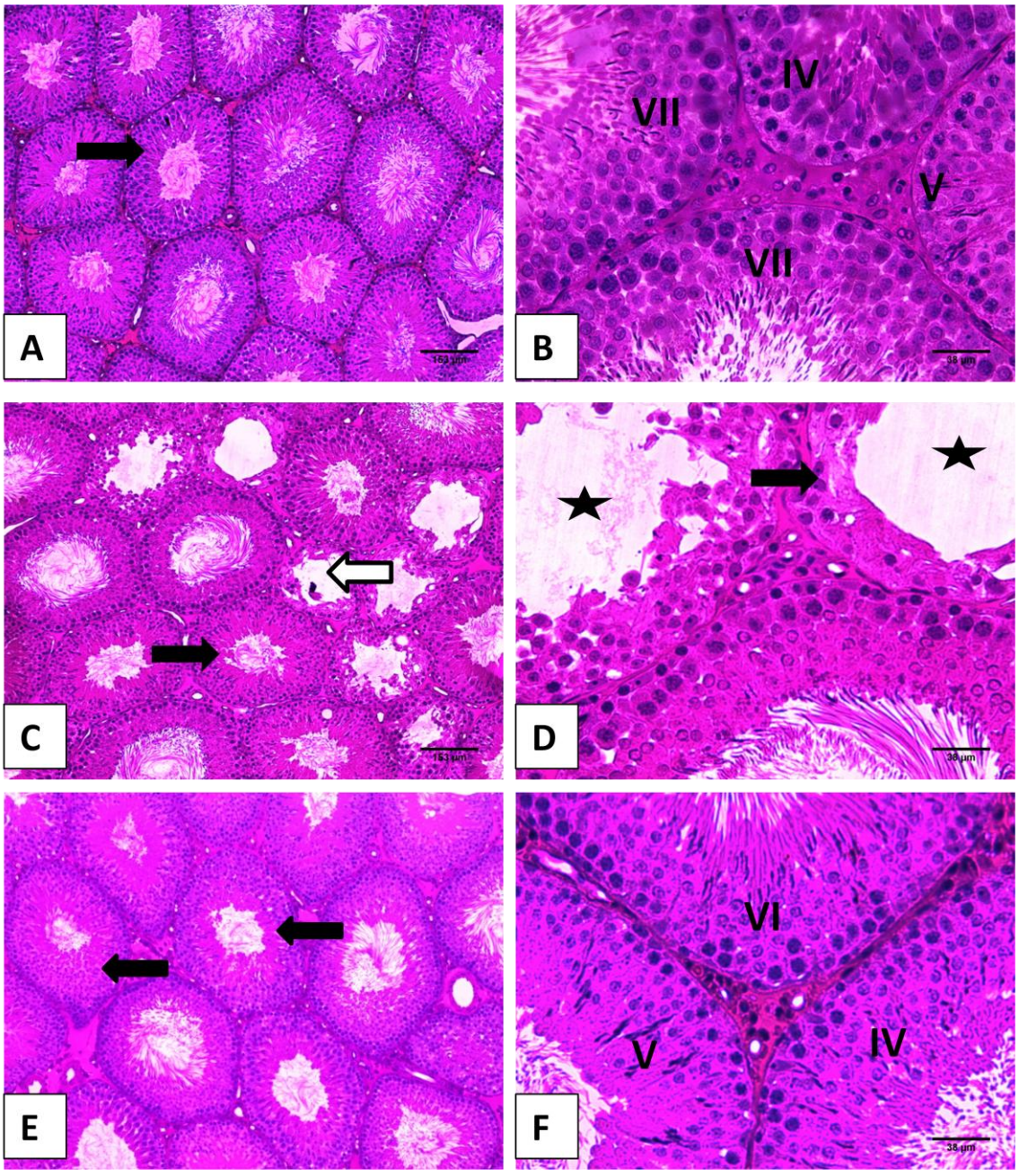
Morte celular e redução da altura do epitélio germinativo. Aumento 400x.

Os efeitos do vanádio foram estudados em diversas espécies sendo sua principal característica, a ação insulinomimética. O vanádio demonstrou estimular oxidação e captação de glicose, assim como a síntese de glicogênio em adipócitos e em células musculares (NRIAGU J., 1998). Dados resultantes de estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o vanádio não afeta apenas um, mas vários aspectos na via de sinalização da insulina (GOC, A., 2006, SRIVASTAVA, A.K., 2005, DOMINGO J.L., 2002). Como demonstrado no nosso trabalho (Figura 4A, 4B,4E e 4F), os animais que foram tratados com $VOSO_4$ e VBHED, não apresentaram lesões compatíveis com degeneração testicular. Os níveis de glicose nestes animais não foram suficientemente altos para promover alterações da estrutura testicular, posto que não se constatou atrofia tubular, descamação celular, vacúolos de célula de Sertoli que justificassem o efeito deletério da hiperglicemia. O $VOSO_4$ e o VBHED apresentaram capacidade de prevenir os efeitos degenerativos testiculares decorrentes da hiperglicemia, assim como a insulina.

De acordo com GOC A., 2006, um dos efeitos de maior importância dos sais de vanádio é a transferência do transportador de glicose GLUT-4 do compartimento intracelular para a superfície do adipócito, promovendo assim o aumento da captação de glicose. A ausência de lesões nos testículos dos animais tratados com estes compostos à base de vanádio, mostra que sua ação mimetiza os efeitos da insulina. A insulina é conhecida por influenciar o eixo hipotalâmico-pituitário (BUCHOLTZ D.C. , 2000), que podem alterar os níveis de hormônio importantes na espermatogênese (BRÜNING JC, 2000).O LH interage com as células de Leydig no interstício dos testículos para promover a produção de testosterona (PAKARAINEN T,et al,2005). É provável que os compostos à base de vanádio neste experimento ($VOSO_4$ e VBHED), tenham normalizado os níveis de LH, nos animais diabéticos do tipo I, reduzindo ou evitando danos produzidos pela hiperglicemia sobre o parênquima testicular nestes animais. Nos animais tratados com L02, (Figuras 4C e 4D) observou-se preservação parcial da espermatogênese uma vez que, se constatou túbulos seminíferos intactos ao lado de túbulos seminíferos com processos degenerativos marcados pela redução da altura dos epitélio

germinativo, descamação total de células germinativas e degeneração testicular. Mostrando que este composto a base de vanádio, L02, não foi tão eficiente em evitar os danos promovido pelo diabetes, mostrando danos causados pela hiperglicemia assim como os relatados por outros autores(ALVES, M.G. et al, 2013, CAI, L. et al,2000 e DIAS, A.S, 2005).

Figura 4. Túbulos seminíferos de animais tratados com 3 substâncias à base de vanádio. (A)Túbulos seminíferos bem preservados(Seta) dos animais tratados com $VOSO_4$ em aumento de 100x.(B)Em detalhe no aumento de 400x ,túbulos seminíferos bem preservados apresentando 3 diferentes estágios da espermatogênese (IV,V,VII). (C) Animais tratados com L02 apresentando túbulos seminíferos bem preservados(seta preta) porém também se observa processos degenerativos marcados com a redução da altura dos epitélio germinativo (seta branca).(D)Em maior aumento 400x, diminuição da altura do epitélio(seta), túbulos em processos degenerativos com ausência de células germinativas compartimento adluminal (estrela).(E) Túbulos seminíferos bem preservados(Seta) dos animais tratados com VBHED em aumento de 100x.(F) Em detalhe no aumento de 400x ,túbulos seminíferos bem preservados apresentando diferentes estágios da espermatogênese(IV,V,VI) de animais tratados com VBHED.



CONCLUSÕES

Em conclusão, as substâncias à base de vanádio L02, $VOSO_4$ e VBHED conseguiram evitar alguns efeitos negativos causados pelo diabetes como: diminuição do peso corporal e dos órgãos reprodutores, diminuição dos níveis séricos de testosterona e aumento dos níveis séricos de glicose. De um modo geral, a substância VBHED foi a que apresentou os melhores resultados na maioria dos parâmetros avaliados. Na avaliação da glicose sérica houve disparidade em relação aos diferentes compostos à base de vanádio em diferentes semanas de tratamento, onde só a insulina conseguiu manter a glicose em níveis mais baixos. Na avaliação histopatológica, a insulina, o $VOSO_4$ e o VBHED apresentaram um padrão semelhante em relação a manutenção dos parâmetros testiculares, conseguindo evitar os efeitos deletérios causados pelo diabetes. Apesar da substâcia L02 possuir alguns efeitos protetores em relação ao diabetes, a substância não foi tão eficiente quanto os outros compostos à base de vanádio ($VOSO_4$ e VBHED) e da insulina.

REFERÊNCIAS

.

AGBAJE, I.M. et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. **Human Reproduction**, v. 22, n. 7, p. 1871-7, 2007.

AHMED, n., et al. **Biology of disease**. 1 ed. taylor & francis. 2007,p 609.

ALVES, M.G. et al. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 2, 2013.

ANDERSON JE, THLIVERIS JA. Testicular histology in streptozotocin – Induced Diabetes. Anat Rec. 1986; 214:378-82

BALLESTER, J. et al. insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH and LH linked mechanisms. **Journal of andrology,** v. 25, n.5, p. 706-19, 2004.

BALLESTER, J. et al. tungstate treatment improves leydig cell function in streptozotocindiabetic rats. **Journal of andrology,** v. 26, n. 6, p. 706-715, 2005.

BELL GI, POLONSKY KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in betacell function, **Nature,** v.13,n.414p.788-791, 2001.

BRICHARD SM, HENQUIN JC. the role of vanadium in the management of diabetes. **Trends in pharmacological sciences**, V.16,n.8,:p.265-270,1995.

BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K.; Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. **Conservation and Research Center,**Smithsonian´s National Zoological Park, Front Royal, Virginia – EUA. 2004.

BROWNLEE M. biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**,v.13,n. 414:813-820, 2001.

BRÜNING JC, et al.,Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science**,**289,p**:2122–2125 ,2000.

BUCHOLTZ DC , et al.,Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. **Biology Reproduction**.;62:1248–1255. 2000

CAGNON VHA,et al.Ultraestructure study of the ventral lobe of the prostate of mice with streptozotocin induced diabetes. **Tissue and Cell**, v.32,p. 275-283,2000.

CAI, L. et al. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. **Urology Research,** v. 28, p. 342– 347, 2000.

CALDEIRA, B.C. et al. morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox .**Revista ceres**, v. 57, n.5, p. 569-575, 2010.

CAMERON, D.F.; MURRAY, F.T.; DRYLIE D.D. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. **The Anatomical Record,** v. 213, n. 1, p. 53-62, 1985.

CHIASSON, J.L. et al. Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. **Canadian Medical Association Journal**, v.168, n. 7, p. 859-66, 2003.

CREASY, D. M. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendations proposed by the society. **Develpmental and reproductive Toxicology.v.**68,n.5, p.408-15. 2003.

DIAS, A.S. O antioxidante quercetina diminui o estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos.**Tese (Doutorado em Fisiologia)** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

DJORDJEVIC C. Antitumor activity of vanadium compounds,**Metal Ions in Biological Systems**,v.31, p.595–616,1995.

DOMINGO JL, et al., Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelatingagents on vanadium accumulation. **Molecular and Cellilar Biochemistry**. 1995; 153: 233–240.37.

DOMINGO JL. Vanadium and tungsten derivatives as anti-diabetic agents: a review of their toxic effects. **Biological trace element Research**,v. 88,p. 97–112. 38. 2002.

EL-ROUBY, et al. Early administration of insulin glargine improved expression of endothelial nitric oxide synthase in the testes of diabetic rats. **Acta Biologica Malaysiana**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2013.

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: Luca, R.R. **Manual para técnicos de biotério, COBEA**: Brasil. p. 160, 1994.

FANTUS, I. G, et al., Modulation of insulin action by vanadate: evidence of a role for phosphotyrosine phosphatase activity to alter cellular signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 153, p. 103-112, 1995.

FOGLIA VG, et al., Sexual disturbances in the male diabetic rat. **Hormone and metabolic research**, v.1,p.72-7. 1969

FRANÇA, L. R.; CHIARINI-GARCIA, H. célula de sertoli. in: Carvalho, h. f.; ollares-buzato, c. b. (ed.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: manole, p. 302-323, 2005.

FURLAN, M.M.D.P. A estreptozotocina como agente diabetogênico. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 5, n. 2, p. 197-201, 2001.
GOC, A., Biological activity of vanadium compounds Cent Eur J Biol, 2006. 1(3): p. 314-332.

GOMENDIO, M. et al. sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, v. 103, n.41, p. 15113–15117, 2006.

HUNT EL, BAILEY DW. The effects of alloxan diabetes on the reproductive system of young male rats. Acta endocr. 1961; 38:432-40.
IAPENNA, D., et al., vanadyl as a catalyst of human lipoprotein oxidation. **Biochem pharmacol**,n.63,v.3, p. 375-80. 2002.

KHAKI, A. et al. beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocininduced diabetic male rats. **Phytotherapy research**, v.24, n. 9, p. 1285-1291, 2010.

KIANIFARD, D.; SADRKHANLOU, R.A.; HASANZADEH, S. the histological, histomorphometrical and histochemical changes of testicular tissue in the metmorfin treated and untreated streptozotocin-induced adult diabetic rats. **Veterinary research forum**, v. 2, n. 1, p. 13-24, 2011.

LA VIGNERA S.,et al.Ultrasound characterization of the seminal vesicles in infertile patients with type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Radiology**. n.80, v.2,p.64-7,2011.

MARX J. Unraveling the causes of diabetes. **Science**, n.26, v.296,p:686-9, 2002.

MORAIS, D.B. et al. Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in tests of the bat Sturnira lilium. **Animal reproduction science,** n147,v.3-4,p.180-6,2014.

MOUSER J. new drugs for management of diabetes: insulin analogues, inhaled insulin, pramlintide, and novel peptides. **Nutritional in clinical practice.** n19,v.2,p.172-180. 2004.

NAVARRO-CASADO L. et al. effect of experimental diabetes and stz on male fertility capacity: study in rats. **Journal of andrology**, v. 31, n. 6, p. 584-592, 2010.

O. NRIAGU JEROME Health Effects, Part 2, Vanadium in the Environment. First Edition, New York: **Wiley**. 1998.

OKSANEN A. Testicular lesions of streptozotocin diabetic rats. **Hormone Research**. n.6.v.3.p.138-44,1975.

PAKARAINEN T,ET AL.,Testosterone replacement therapy induces spermatogenesis and partially restores fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice. **Endocrinology,** v.146,p.596–606, 2005.

PINHEIRO, L.S. et al. protocol of insulin therapy for streptozotocin-diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation**. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science .v**. 38, n. 2, 2011.

POUCHERET, P. et al.; vanadium and diabetes; **Mollecular cellular biochemistry** , p.188:7380, 1998.

RIBEIRO DL, et al.,Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes**. European Journal of Histochemistry**,v. 50, p.51-60,2006.

RICCI, G. et al. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. **Andrologia**, v.41, n. 6, p. 361-368, 2009.

ROSSI GL, Aeschlimann M. Morphometric studies of pituitary glands and testes in rats with streptozotocin – induced diabetes. **Andrologia**. v.14p.535-42, 1982.

SCARANO WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin – induced hyperglycemia in rats. **Journal of Andrology**, v.29,p.4828,2006.

SCHOELLER, E.L. et al. Insulin Rescues Impaired Spermatogenesis via the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Akita Diabetic Mice and Restores Male Fertility. **Diabetes**, v.6, 2012.

SCHÖFFLING K, et al. Histometric investigations on the testicular tissue of rats with alloxan diabetes and chinese hamsters with spontaneous diabetes. **Acta Endocrinology**, v.54:p.335-46. 1967.

SPALIVIERO JA , et al., Luteinizing hormone receptor-mediated effects on initiation of spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice are replicated by testosterone. **Biology Reproduction** .v.70.p.32–38,2004.

SRIVASTAVA, AK; MEHDI, MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. **Diabetic Medicine** , v.22,n.1,p. 2-13, 2005.

THOMPSON H.K., vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future, **Journal of Inorgorganic Biochemistry**.v.103, p.554-558, 2008.

THOMPSON K, orvig c. vanadium in diabetes: 100 years from phase 0 to phase i. **Journal of Inorgorganic Biochemistry**.2000 100: 1925-1935.
TOLMAN EL, et al effects of vanadium on glucose metabolism in vitro. **Life Scince** ,v.25: p.1159– 1164,1975.

TRINDADE A.A., et al,Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats,**Acta cirúrgica brasileira,**n.28, n.4,abr,2013.

YUEN, V., et al, Glucose-lowering properties of vanadium compounds: comparison of coordination complexes with maltol or kjic acid as ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, p. 110-116, 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há décadas, desde os primeiros estudos que envolveram o vanádio e suas propriedades insulino- miméticas, muitas pesquisas e avanços vêm sendo feitos para se compreender as propriedades e os mecanismos de ação deste elemento como antidiabético. Os mecanismos intracelulares exatos e os mediadores envolvidos nas ações dos compostos de vanádio ainda não estão totalmente esclarecidos, porém seus efeitos como terapia para o diabetes já são conhecidos. A propriedade do vanádio como antidiabético é devida a sua ação bastante semelhante à da insulina no organismo. O vanádio pode agir em diversos pontos da via de sinalização celular da insulina tendo como principais vias as PI3K/PKB. O vanádio exerce muitos efeitos insulinomiméticos tanto nos sistemas *in vivo* como *in vitro*. Ele pode agir na captação de glicose e na diminuição da resistência à insulina agindo como facilitador nas ações promovidas pela insulina ou agindo sozinho na ausência da mesma, mostrando que pode ser utilizado tanto em diabetes do tipo 1 como na tipo 2 em animais.Além disso, este elemento já vem sendo utilizado em alguns ensaios clínicos em humanos diabéticos, porém o número destes estudos é bastante reduzido em relação aos estudo com animais pois utilizam-se de populações muito pequenas e com curta duração. Espera-se que novos estudos sejam feitos com um maior número de pessoas. A utilização dos compostos de vanádio é bastante importante em casos de compostos que age independentes de insulina. O vanádio pode agir sozinho percorrendo diversas etapas que são feitas pela insulina. Por fim, uma vez que estas ações benéficas dos compostos de vanádio estejam sendo descobertas cada vez mais, atualmente muitos estudos e pesquisas estão crescendo a cada dia para a criação e desenvolvimento de novos compostos, com maior potência, menor toxicidade e com ações mais específicas e que atuem também de modo diferente da insulina.