

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

**ANÁLISE DOS EFEITOS RENAIIS EM LONGO PRAZO DO DIABETES INDUZIDO
DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS WISTAR NO PERÍODO PÓS-PARTO**

NATHANE FRANÇA SILVA

UBERLÂNDIA

2015

NATHANE FRANÇA SILVA

**ANÁLISE DOS EFEITOS RENAIIS EM LONGO PRAZO DO DIABETES INDUZIDO
DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS WISTAR NO PERÍODO PÓS-PARTO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Coelho Balbi

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586a
2015 Silva, Nathane França, 1990-
 Análise dos efeitos renais em longo prazo do diabetes induzido
 durante a gestação em ratas wistar no período pós-parto / Nathane França
 Silva. - 2015.
 79 f. : il.

 Orientador: Ana Paula Coelho Balbi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
 Inclui bibliografia.

 1. Citologia - Teses. 2. Diabetes na gravidez - Teses. 3. Sistema
 renina-angiotensina - Teses. 4. Rins - Teses. I. Balbi, Ana Paula Coelho.
 II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em
 Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 581

NATHANE FRANÇA SILVA

**ANÁLISE DOS EFEITOS RENAIIS EM LONGO PRAZO DO DIABETES INDUZIDO
DURANTE A GESTAÇÃO EM RATAS WISTAR NO PERÍODO PÓS-PARTO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Coelho Balbi

Banca avaliadora:

Prof^a Dr^a Ana Paula Coelho Balbi
UFU – ICBIM

Prof^a Dr^a Terezila Machado Coimbra
USP – FMRP

Prof^a Daniele Ribeiro Lisboa
UFU – ICBIM

UBERLÂNDIA

2015

*Ao meu marido, aos meus pais, ao meu irmão e à minha avó Luzia que estará
sempre em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela sabedoria e pela força que me deu ao longo desta caminhada. A toda minha família e amigos pelo apoio e incentivo durante a construção de mais este degrau.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos nestes dois anos.

À Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS), em especial à Simone Deconte, Débora Nunes e Sebastião Paulino da Silva por auxiliarem no trato dos animais e nas técnicas laboratoriais.

À Área de Morfologia (ARMOR) pela disponibilidade de ensino e execução das técnicas histológicas.

Agradecimento especial à Prof^a Dr^a Ana Paula Coelho Balbi pela orientação e supervisão deste trabalho, pela amizade e confiança geradas durante todos estes quatro anos. Obrigada pela disposição em ensinar e aconselhar, por me mostrar que fazer ciência no Brasil não é fácil, mas que sempre vale a pena e, finalmente, por ter sido mais que uma orientadora e sim uma “mãe” pra mim aqui na UFU. Muito obrigada!

Às Prof^a Dr^a Terezila Machado Coimbra e Daniele Lisboa Ribeiro por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Às Prof^a Dr^a Heloísa Della Colleta Francescato e Karen Renata Nakamura Hiraki por aceitarem participar como suplentes da avaliação desta dissertação.

Aos Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva e Dra. Daniele Lisboa Ribeiro por participarem da minha banca de qualificação. Muito obrigada por todas as dicas!

À Prof^a Dr^a Karen Renata Nakamura Hiraki pela oportunidade de estágio docência, por todo conhecimento transmitido durante este tempo e pela ajuda com as técnicas de histologia.

Ao Prof. Dr. Adriano Mota Loyola pela disponibilidade no uso do sistema de captura de imagens.

À Natácia Dreyce Gonçalves de Oliveira, Natany Garcia dos Reis, Pâmella Francis dos Santos, Gabriela Silva Borges e Mariana Vieira e Silva pelo companheirismo na execução dos protocolos experimentais, pela ajuda sem a qual nada disso seria possível e pelas risadas nos momentos mais difíceis.

À querida e eterna Terceira Turma de Biomedicina por compartilhar os conhecimentos e ter permitido que tantas amizades pudessem ter sido feitas.

À Flávia Sayuri Matsuo pela amizade durante todos estes anos, por estar sempre presente, mesmo não nos vendo com tanta frequência, e por mais uma vez salvar as imagens do meu trabalho.

À Grasielle Lopes de Oliveira Silva pela amizade, por compartilhar das alegrias e dos sofrimentos da vida no bloco 2A e por me ajudar sempre que precisei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A todos os amigos/colegas de classe e aos professores do curso que foram tão importantes na minha formação profissional.

Finalmente, agradeço a cada animal que foi necessário para o desenvolvimento deste trabalho, por cederem a vida em prol do desenvolvimento científico.

“Aquele que quer aprender gosta que lhe digam quando está errado; só o tolo não gosta de ser corrigido”.

Provérbios 12:1

RESUMO

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é de suma importância durante a gestação, atuando principalmente através da angiotensina II (Ang II) que pode interferir na ativação da cascata de *Mitogenic-Activated Protein Kinases* (MAPK). Além disso, a gravidez está associada a aumentos marcantes na hemodinâmica renal, que também pode ser afetada pelo diabetes mellitus (DM). Os objetivos do trabalho foram avaliar os efeitos do DM induzido em ratas Wistar durante a gestação e mantido no período pós-parto na expressão renal de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), α -SMA (*Smooth Muscle Actin*) e das MAPKs p-p38 e p-JNK, bem como nos estudos de função renal e pressão arterial sistólica (PAS) de ratas Wistar. Para isso, foram realizados dois grupos (G): não-gravídico e gravídico. No primeiro G, as ratas foram divididas em: G1 (controles sem gravidez), fêmeas que receberam injeção intraperitoneal (iip) de solução salina 0,9% e G2 (diabéticas sem gravidez), fêmeas que receberam iip de aloxana (100mg/kg) diluída em solução salina 0,9%. No segundo G, as ratas grávidas foram divididas em: G3 (mães controles), mães que receberam iip de solução salina 0,9% e G4 (mães diabéticas), mães que receberam iip de aloxana (100mg/kg) diluída em solução salina 0,9%. A glicemia foi verificada 2 dias após a indução e os animais foram considerados diabéticos se apresentassem glicemia maior ou igual a 150mg/dL. Cerca de 50 dias após o parto para G3 e G4 e em tempo correspondente para G1 e G2, as ratas foram submetidas à aferição indireta de PAS por pletismografia, bem como à determinação da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) pelo clearance de creatinina. Em seguida, os animais foram anestesiados e tiveram seus rins retirados para as análises histológica, morfométrica e imunohistoquímica. Os resultados mostraram que os animais de G2 e G4 apresentaram glicemia (mg/dL) e volume urinário (mL) maiores que os animais de G1 e G2 vários dias pós-indução do DM do tipo 1. Os valores de PAS (mmHg) não foram diferentes entre os grupos analisados, mas constatou-se uma tendência à redução da TFG (mL/min) de G4 quando comparado aos demais G. Observou-se também um aumento significativo da relação peso rim/peso do corpo (direito e esquerdo) dos animais de G4 em relação aos demais G. As análises morfométricas evidenciaram redução da área de secção renal total de G4 e aumento em G3. A área glomerular e o espaço capsular não diferiram entre os G estudados, mas houve aumento da área de tufo glomerular em G3 e G4. A quantificação da porcentagem de colágeno cortical mostrou que G2 e G4 tiveram maior expressão, ao passo que a identificação e contagem de mastócitos não diferiram entre os G. Quanto à imunorreação para PCNA, o G3 apresentou aumento de células PCNA⁺ glomerulares, ao passo que em G4 diminuiu. Por outro lado, no compartimento tubulointersticial (TBI) a proliferação celular foi maior em G4. Já a expressão de α -SMA glomerular e TBI foram aumentadas em G4 em comparação aos demais G. A marcação para p-p38 glomerular apresentou um padrão de expressão semelhante ao PCNA, com redução de células p-p38⁺ em G4 em relação aos outros G. A imunorreação para p-JNK mostrou-se elevada tanto nos glomérulos quanto no compartimento TBI de G4 em relação a G1, G2 e G3. Conclui-se que o DM induzido durante a gestação e mantido no período pós-parto em ratas Wistar resultou em alterações estruturais significativas e funcionais renais moderadas, evidenciando que a gravidez possui um efeito intensificador dos danos renais induzidos pelo diabetes e que estas alterações podem estar relacionadas com as mudanças na expressão das MAPK p-p38 e p-JNK.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 1. Gestação. Período pós-parto. MAPK. Função renal.

ABSTRACT

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is very important during pregnancy, working mainly through the angiotensin II (Ang II) that can interfere with the activation of Mitogenic-Activated Protein Kinases (MAPK) cascade. In addition, pregnancy is associated with marked increase in renal hemodynamics that may also be affected by diabetes mellitus (DM). The objectives were to evaluate the effects of DM induced in Wistar rats during pregnancy and maintained in the postpartum period on the renal expression of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), α -SMA (Smooth Muscle Actin) and p-p38 and p-JNK MAPK as well as in studies of renal function and systolic blood pressure (SBP) in Wistar rats. For this, there were two groups (G): non-pregnant and pregnant. In the first G, the rats were divided into: G1 (non-pregnant controls rats), females that received intraperitoneal injection (ipi) of 0.9% saline solution and G2 (non-pregnant diabetic rats), females that received ipi of alloxan (100 mg/kg) diluted in 0.9% saline solution. In the second G, pregnant rats were divided into: G3 (control mothers), mothers that received ipi of 0.9% saline solution and G4 (diabetic mothers), mothers that received ipi of alloxan (100 mg/kg) diluted in 0.9% saline solution. Blood glucose was observed 2 days after induction and the animals were considered diabetic if they had blood glucose higher than or equal to 150 mg/dL. About 50 days after delivery for G3 and G4 and corresponding time for G1 and G2, the rats were subjected to indirect measurement of SBP by plethysmography and the determination of glomerular filtration rate (GFR) by creatinine clearance. Then, the animals were anesthetized and their kidneys were removed for histological, immunohistochemical and morphometric studies. The results showed that G2 and G4 animals had blood glucose levels (mg/dL) and urinary volume (mL) higher than animals from G1 and G2, even several days after DM induction. The SBP (mmHg) were not different among the groups, but there was a tendency for reduction in GFR (mL/min) from G4 when compared to the other G. There was also a significant increase in kidney weight (right and left)/body weight ratio of G4 in relation to other G. Morphometric analysis showed a reduction of total renal sectional area from G4 and an increase in G3. The glomerular area and the capsular space did not differ between G studied, but there was an augment in glomerular tuft area in G3 and G4. Quantification of the percentage of cortical collagen showed that G2 and G4 presented higher distribution, while the identification and count of mast cells did not differ between G. Regarding PCNA immunoreactivity, G3 showed increased glomerular proliferating cells, while in G4 it was decreased. On the other hand, in the tubulointerstitial (TBI) compartment cell proliferation was higher in G4. Glomerular expression of α -SMA and TBI were increased in G4 compared to other G. Immunoreaction for glomerular p-p38 expression showed a pattern similar to PCNA, with a reduction of p-p38 in G4 relative to other G. The immunoreactivity of p-JNK was higher in both the glomeruli and TBI compartment in G4 compared to G1, G2 and G3. It is concluded that the DM induced during pregnancy and maintained in the postpartum period in Wistar rats resulted in significant structural changes and moderate functional impairment in kidney, showing that pregnancy has an enhancing effect of renal damage induced by diabetes and these alterations may be related to changes in the expression of p-p38 and p-JNK MAPK.

Keywords: type 1 Diabetes mellitus. Pregnancy. Postpartum period. MAPK. Renal function.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da ativação de MAPK por Ang II.....	19
Figura 2 – Valores glicêmicos apresentados pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	34
Figura 3 – Volume urinário apresentado pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	35
Figura 4 – Taxa de Filtração Glomerular (TFG) apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	36
Figura 5 – Pressão arterial sistólica (PAS) apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	36
Figura 6 – Relação peso renal total/peso corpo apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	38
Figura 7 – Relação peso do rim direito/peso do corpo apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	38
Figura 8 – Relação peso do rim esquerdo/peso do corpo apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	39
Figura 9 – Área de secção renal total apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	40
Figura 10 – Área glomerular apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	41
Figura 11 – Área de espaço capsular apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	41
Figura 12 – Área do tufo glomerular apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	42
Figura 13 – Determinação do número de glomérulos/área de secção renal no córtex de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	43

Figura 14 – Coloração de Picrosirius Red do córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	44
Figura 15 – Quantificação da porcentagem de colágeno cortical das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	45
Figura 16 – Contagem do número de mastócitos/área do córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	46
Figura 17 – Imunorreação para células em proliferação (PCNA ⁺) no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	47
Figura 18 – Quantificação do número de células PCNA ⁺ por glomérulo no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	48
Figura 19 – Quantificação do número de células PCNA ⁺ TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	49
Figura 20 – Imunorreação para α -SMA no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	50
Figura 21 – Quantificação da expressão de α -SMA glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	51
Figura 22 – Quantificação da expressão de α -SMA TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	51
Figura 23 – Imunorreação para p-p38 no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	53
Figura 24 – Quantificação da expressão de p-p38 glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	54
Figura 25 – Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	55

Figura 26 – Quantificação da expressão de p-JNK glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....**56**

Figura 27 – Quantificação da expressão de p-JNK TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....**57**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de glicemia e volume urinário das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	35
Tabela 2 – Dados de TFG e PAS das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	37
Tabela 3 – Dados da relação peso rim total/peso do corpo (PR/PC), peso rim direito/peso do corpo (PRd/PC) e peso rim esquerdo/peso do corpo (PRe/PC) das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	39
Tabela 4 – Dados de área de secção renal total, de área glomerular, de tufo glomerular e de espaço capsular das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	42
Tabela 5 – Dados de número de glomérulos, porcentagem de colágeno cortical e número de mastócitos/área do córtex renal das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	46
Tabela 6 – Número médio de células PCNA ⁺ e escore médio para α -SMA glomerular e TBI nos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	52
Tabela 7 – Número de células p-p38 ⁺ glomerulares e escore médio para p-JNK glomerular e TBI nos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

MAPK – *Mitogenic-Activated Protein Kinases*

Ang I – angiotensina I

ECA – enzima conversora de angiotensina

Ang II – angiotensina II

AT1R – receptor do tipo 1 de angiotensina II

AT2R – receptor do tipo 2 de angiotensina II

TFG – taxa de filtração glomerular

MEC – matriz extracelular

Ang (1-7) – angiotensina 1-7

ERK – *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

JNK – *Jun N-terminal Kinase*

GTPase – guanosina trifosfatase

MAPKKK – MAPKK quinase;

MAPKK – MAPK quinase

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor α* (fator de necrose tumoral α)

FPR – fluxo plasmático renal

PAS – pressão arterial sistólica

PGE2 – prostaglandina E2

NO – óxido nítrico

cGMP – 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina

L-NAME – *Nw-nitro-L-arginine methyl ester*

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

DM – diabetes mellitus

DM 1 – diabetes mellitus do tipo 1

β -pancreática – beta pancreática

DM 2 – diabetes mellitus do tipo 2

DG – diabetes gestacional

ND – nefropatia diabética

AVE – acidente vascular encefálico

STZ – estreptozotocina

ROS – espécies reativas de oxigênio

PDGF – *Platelet-derived Growth Factor* (fator de crescimento derivado de plaquetas)

TGF- β – *Transforming growth factor β* (fator de transformação do crescimento β)

PCNA – *Proliferation Cell Nuclear Antigen*

PCNA⁺ – células PCNA positivas

α -SMA – *α -Smooth Muscle Actin*

PE – pré-eclâmpsia

DRC – doença renal crônica

CEUA/UFU – Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia

DAB – 3,3 diaminobenzidina

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato salino)

BSA – *Bovine Serum Albumin*

TBI – compartimento tubulointersticial

p-p38⁺ – células p-p38 positivas

Ig – imunoglobulinas

SHR – *Spontaneously Hypertensive Rat*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) e <i>Mitogenic-Activated Protein Kinases</i> (MAPK)	17
1.2 SRAA, gravidez e adaptações fisiológicas	20
1.3 Diabetes mellitus (DM).....	21
1.4 Efeitos do DM	22
1.5 SRAA, gravidez e DM	24
1.5 Justificativa	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Animais.....	28
3.1.1 Grupo não-gravídico	28
3.1.1 Grupo gravídico.....	28
3.2 Determinação da PAS	29
3.3 Estudos de função renal	29
3.4 Retirada dos rins.....	30
3.5 Análises histológica e morfométrica	30
3.6 Análise imunohistoquímica.....	31
3.7 Avaliação dos resultados de imunohistoquímica	31
3.8 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Animais e indução de diabetes.....	33
4.1.1 Grupo não-gravídico	33

4.1.2 Grupo gravídico	33
4.2 Quadro de diabetes e estudos funcionais	34
4.3 Análise dos pesos corporal e renal	37
4.4 Análises histológica, morfométrica e imunohistoquímica.....	40
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) e *Mitogenic-Activated Protein Kinases* (MAPK)

Normalmente, o SRAA relaciona-se com a necessidade do organismo de manter a estabilidade hemodinâmica e evitar uma hipoperfusão tecidual (ATLAS, 2007; RIELLA, 2010; ZATZ, 2000). Este sistema é regulado pela renina, produzida e armazenada no aparelho justaglomerular. Ao ser liberada por estímulos hemodinâmicos, quebra o angiotensinogênio existente no plasma, em angiotensina I (Ang I). Esta é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) no metabólito (hormônio) ativo – angiotensina II (Ang II). A Ang II é o principal fator de crescimento do SRAA, tendo produção sistêmica e tecidual e atuando principalmente através de dois receptores acoplados à proteína G: receptor AT1 (AT1R) e receptor AT2 (AT2R) (YOSYPIV, 2009). A ativação de AT1R resulta em mitogênese das células renais vascular, mesangial e tubular (WOLF et al., 1992). Em contraste, AT2R inibe o crescimento e proliferação de células mesangiais (GOTO et al., 1997).

A Ang II, principalmente através de AT1R, estimula o sistema nervoso simpático, a excreção de potássio, reabsorção de sódio e água pelos túbulos renais (intensificado pelo aumento da produção de aldosterona pelas glândulas suprarrenais e do hormônio antidiurético pela neurohipófise, respectivamente), promove vasoconstrição arteriolar e aumenta a taxa de filtração glomerular (TFG) (como resultado da vasoconstrição da arteríola eferente) (ATLAS, 2007; RIELLA, 2010; ZATZ, 2000). Assim, ela promove um aumento da volemia e compensação pressórica. Além deste efeito hemodinâmico, há uma atuação da Ang II sobre a proliferação celular, reparo celular e expansão da matriz extracelular (MEC) (gerando hipertrofia e/ou hiperplasia renal/cardíaca, inflamação e fibrose tecidual) e liberação de outras substâncias vasoativas (prostaglandinas e óxido nítrico) (ATLAS, 2007; CROWLEY; COFFMAN, 2012; KAGAMI, 2012; ZATZ, 2000).

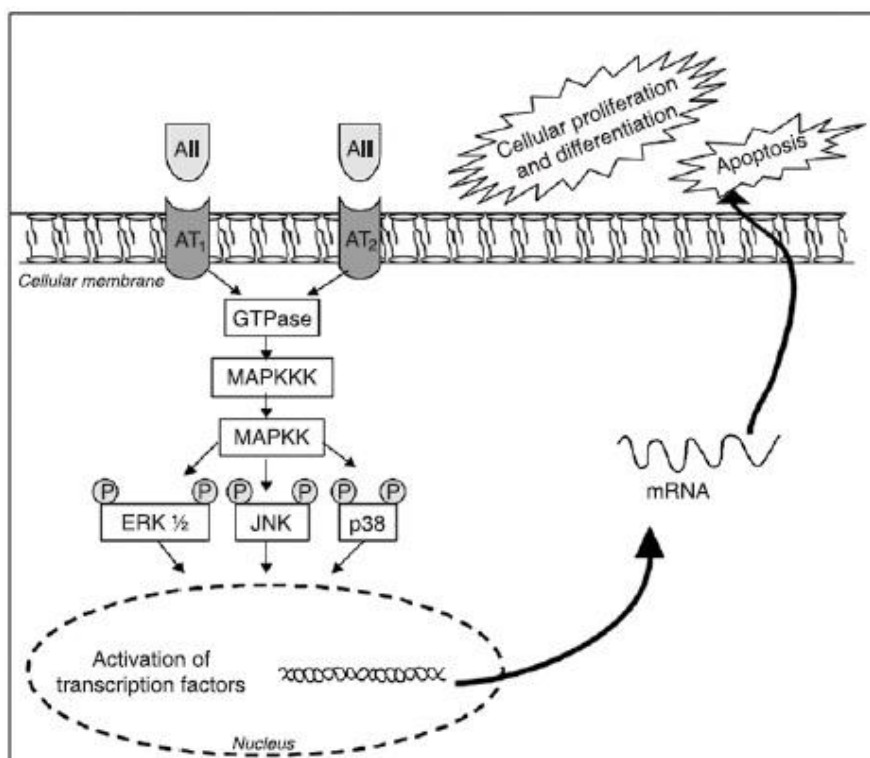
Paralelamente ao chamado esquema clássico, ocorre uma ativação de outros metabólitos derivados da Ang II, através da ação enzimática da ECA2 (enzima homóloga da ECA), produzindo angiotensina 1-7 [Ang(1-7)], que tem um efeito contrário da via clássica, promovendo vasodilatação, natriurese e efeitos anti-proliferativos. Por outro lado, há também a presença de receptores teciduais específicos para renina e pró-renina (renal e vascular),

sinalizando a ativação tecidual de toda uma cascata de efeitos pró-fibróticos (ATLAS, 2007; CROWLEY, 2012; GRACIANO; NORONHA, 2010; KAGAMI, 2012).

Após a Ang II se ligar aos seus receptores AT1R e/ou AT2R, os efeitos são mediados pela cascata de MAPK, como já foi constatado em vários modelos experimentais (BALBI et al., 2008; KIM et al., 1998; KUBO et al., 2001) (**Figura 1**). As MAPKs compreendem um grande grupo de proteínas serina/treonina quinases que estão conservadas nos mais diversos organismos (JOHNSON; LAPADAT, 2002; WIDMANN et al., 1999) e podem ser ativadas por numerosos estímulos extracelulares, transduzindo-os para o meio intracelular através de uma cascata de sinalização (BOKEMEYER; SOROKIN; DUNN, 1996; KUBO, 2001; ROUX; BLENIS, 2004; SACKS, 2006). Sabe-se que a desregulação da sinalização normal das MAPKs está relacionada com doença renal tanto aguda quanto crônica (CASSIDY et al., 2012).

Pode-se citar três subgrupos principais de MAPKs, a ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), a JNK (*Jun N-terminal Kinase*) e as quinases da família p38 (SHAEFFER; WEBER, 1999) (**Figura 1**). Um estudo demonstrou que a ERK é ativada por fatores de crescimento que promoverão diferenciação e proliferação celulares, já a JNK e p-p38 são ativadas por citocinas e estresses celulares e serão responsáveis por inibição do crescimento celular e indução de apoptose (XIA et al., 1995).

Figura 1 – Representação esquemática da ativação de MAPK por Ang II.



Fonte: BALBI et al. (2008).

Ang II (AII) atua através dos AT₁R e AT₂R e inicia a sinalização intracelular, com fosforilação das MAPK e ativação de fatores de transcrição no núcleo, resultando na produção de mRNA para mediadores de apoptose, diferenciação e proliferação celular. GTPase = guanosina trifosfatase; MAPKKK = MAPKK quinase; MAPKK = MAPK quinase; ERK = *Extracellular Signal-Regulated Kinase*; JNK = *Jun N-terminal Kinase*; p38 = quinases da família p38.

A MAPK ERK possui 42 kDa e está relacionada à regulação do crescimento e diferenciação (CHANG; KARIN, 2001; PEARSON et al., 2001). A sinalização através dessa MAPK tem um importante papel na mediação de respostas celulares renais a diversos tipos de estímulos, estando envolvida com a hipertrofia renal compensatória e condições patológicas como as doenças glomerulares e tubulointersticiais (CASSIDY et al., 2012).

As JNKs compreendem a família de MAPKs que se ligam ao fator de transcrição c-Jun, fosforilando-o nos resíduos Ser63 e Ser73. Como todas as MAPKs, as JNKs são ativadas por fosforilação nos resíduos conservados de treonina e tirosina (CASSIDY et al., 2012). No contexto da injúria renal, a sinalização de JNK é mediada por diferentes tipos de insultos incluindo isquemia/reperfusão, ligação uretérica, dano imuno-mediado e hiperglicemia (MA; LIU; NIKOLIC-PATERSON, 2009; POMBO et al., 1994). A ativação desta MAPK foi demonstrada em glomerulonefrites (DE BORST et al., 2007) e a inibição leva à supressão da

inflamação (FLANC et al., 2007), da apoptose tubular e fibrose intersticial (MA et al., 2007), em modelos animais.

A MAPK p38 é ativada em resposta ao choque osmótico, assim como por lipopolissacarídeos e interleucina 1 (IL-1). A p38 também responde aos mesmos agonistas que ativam as JNKs. Esta MAPK também é um importante regulador da senescência da parada do crescimento, devido à sua capacidade de ativar as vias de parada do crescimento da p53 e pRb/p16. Além disso, aumenta a regulação de citocinas específicas como interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e *Tumor Necrosis Factor* α (TNF- α – fator de necrose tumoral α) em vários contextos biológicos incluindo o dano renal (ONO; HAN, 2000; PATIL; KIRKWOOD, 2007; ZHANG; SHEN; LIN, 2007).

1.2 SRAA, gravidez e adaptações fisiológicas

A gravidez humana está associada a aumentos marcantes na hemodinâmica renal. A TFG aumenta em até 50% na gravidez normal devido ao aumento, em até 80%, do fluxo plasmático renal (FPR), à permeabilidade da barreira de filtração (BRAMHAM; RAJASINGHAM, 2012) e à diminuição da pressão oncótica glomerular (MILNE; LINDHEIMER; DAVISON, 2002). O SRAA também desempenha importantes funções durante a gravidez, como na regulação da pressão arterial e no balanço hidroeletrolítico. Existem relatos de aumento da atividade deste sistema durante a gravidez (AUGUST; SEALY, 1990; SKINNER, 1993), o que pode ser acompanhado por aumento da excreção urinária de proteínas, sendo mais prevalente em grávidas diabéticas (REECE; COUSTAN; HAYSLETT, 1988).

Apesar do aumento do FPR, na maioria das vezes, há uma diminuição da pressão arterial sistólica (PAS) em mulheres grávidas devido a uma resposta vasodilatadora, acompanhada por um aumento do débito cardíaco e da estimulação do SRAA (CHAPMAN et al., 1998; GALLERY; BROWN, 1987; HYTTEN; PAINTIN, 1963). A vasodilatação é garantida pela liberação de prostaglandinas vasodilatadoras, especialmente a prostaglandina E2 (PGE2) e as prostaciclinas, que são produzidas em maiores quantidades durante a gravidez (SPITZ et al., 1984), assim como o óxido nítrico (NO) e o seu segundo mensageiro, o 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (CONRAD; VERNIER, 1989; CONRAD et al., 1993; WEINER et al., 1994). Quando os inibidores da produção de NO, tais como o *Nw*-

nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) são dados às ratas grávidas, as alterações hemodinâmicas encontradas normalmente durante a gravidez são completamente revertidas (DENG; ENGELS; BAYLIS, 1996). A progesterona e o *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF - fator de crescimento vascular endotelial) mediados pelas prostaciclinas aumentam a refratariedade vascular ao efeito pressórico da Ang II liberada pelo SRAA (SIBAI; RAMADAN, 1993). Além disso, os receptores AT1R de Ang II, responsáveis pela vasoconstrição, ficam menos responsivos durante a gravidez (BIANCHI et al., 2002).

1.3 Diabetes mellitus (DM)

Em 2010, a população adulta mundial com DM era estimada em cerca de 285 milhões e até 2030 está previsto um aumento de 54%, totalizando cerca de 439 milhões de pessoas diabéticas (TRAMONTI; KANWAR, 2012). Somando-se ao grande número de indivíduos acometidos pelo DM, está o impacto econômico e social sobre os sistemas de governo, principalmente no Brasil, onde os gastos diretos associados com a doença são bastante altos (COBAS et al., 2013).

Os sinais clássicos dessa doença são a hiperglicemia, poliúria (aumento do débito urinário) e polidipsia (aumento da ingestão líquida devido ao aumento da sede). Apresenta-se sob duas formas principais, o tipo 1 (DM 1), que aparece principalmente na infância ou na adolescência, caracterizada por alterações na produção e secreção do hormônio insulina devido à falência do pâncreas (geralmente por destruição auto-imune das células beta (β) pancreáticas) e o tipo 2 (DM 2), o mais frequente, que corresponde aproximadamente a 85 a 90% dos casos e aparece insidiosamente, principalmente em adultos, cuja causa primária é a resistência à insulina (diminuição da resposta das células-alvo a este hormônio) (AIRES, 2008).

Outra forma menos frequente, mas não menos importante, é o diabetes gestacional (DG), que se desenvolve durante a gravidez, podendo ou não ser revertido após o parto. Durante a gravidez, o crescimento e desenvolvimento fetal exigem um aumento do suprimento materno-fetal de glicose. Como consequência, a mãe desenvolve um estado de resistência à insulina, devido à liberação de hormônios diabetogênicos pela placenta, de forma a garantir um gradiente positivo de glicose materno-fetal. Durante o primeiro e no começo do segundo trimestre de gestação, a resistência à insulina não muda substancialmente. O DG

ocorre quando a máxima secreção de insulina não corresponde ao grau de resistência à mesma. Quando isso ocorre, tanto mãe quanto feto são expostos à hiperglicemia (CATALANO et al., 2012; TOBOSO; BENÍTEZ; ROMERO, 2012).

1.4 Efeitos do DM

A hiperglicemia crônica do diabetes está associada à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2008). O DM pode resultar em inúmeras consequências micro e macrovasculares. Dentre as principais consequências microvasculares estão: retinopatia, neuropatia e nefropatia diabéticas (ND); já entre as macrovasculares pode-se citar: acidente vascular encefálico (AVE) e infarto agudo do miocárdio (GRAF; CLAPAUCH; LYRA, 2009; LYRA; CAVALCANTI, 2005; RIELLA, 2010).

A ativação alterada do SRAA intrarrenal tem sido considerada uma das principais causas do dano renal que ocorre no diabetes (BREZNICEANU et al., 2008; LIU et al., 2008), uma vez que o tratamento com bloqueadores de Ang II em animais, cujo DM foi induzido por estreptozotocina (STZ), e em humanos, levou à normalização da excreção urinária de proteínas e também à redução das mudanças estruturais renais (REMUZZI et al., 1993; VOLPINI et al., 2003; ZATZ et al., 1986). Em pacientes diabéticas não-grávidas e em ratas que tiveram indução do diabetes por STZ, a atividade plasmática da renina aparece normal ou baixa, respectivamente, e a atividade de ECA aumentada em humanos e ratos (ERMAN et al., 1993; van DIJK et al., 1994). Células mesangiais em cultura expostas a elevadas concentrações de glicose aumentaram a produção de angiotensinogênio, bem como os níveis de Ang II (SINGH et al., 2003). Também já foi demonstrado que a Ang II estimula a síntese de proteínas da matriz por células mesangiais, além de inibir sua degradação, efeitos que foram bloqueados após o uso de losartan (SINGH et al., 1999).

A ND é uma consequência microvascular crônica do DM que acomete aproximadamente 35% dos pacientes com DM 1, sendo a principal causa de morte neste grupo, aumentando o risco de óbito em 100 vezes. Nos pacientes com DM 2, sua prevalência varia de 10 a 40%, estando associada a um aumento da mortalidade de aproximadamente 5 vezes (GRAF; CLAPAUCH; LYRA, 2009; HOOGWERF, 2010; LYRA; CAVALCANTI, 2005; OLUGBENGA et al., 2004; RIELLA, 2010; SHLIPAK, 2010).

A ND caracteriza-se por lesão glomerular com níveis aumentados de excreção urinária de albumina, de microalbuminúria a macroalbuminúria, podendo evoluir até a insuficiência renal crônica terminal e dialítica, sendo inclusive um preditor de mortalidade nestes pacientes (BERHANE et al., 2011; GRAF; CLAPAUCH; LYRA, 2009; LYRA; CAVALCANTI, 2005; RIELLA, 2010). Os valores laboratoriais para microalbuminúria são: normal, quando a excreção proteica é inferior a 30 mg/dia; microalbuminúria, 30-300 mg/dia; e macroalbuminúria, maior que 300 mg/dia (KIRSZTAJN, 2010).

Para o desenvolvimento da ND, há fatores genéticos (polimorfismos nos genes da ECA, PPAR γ 2, K121Q e Ala54Thyr) e não-genéticos envolvidos (controle glicêmico irregular, hipertensão arterial não controlada, tabagismo, dislipidemia, dieta hiperproteica). Fisiopatologicamente, dados a hiperglicemia e ações mediadas pela Ang II como aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de fatores de crescimento (*Platelet-derived Growth Factor* [PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas], *Transforming Growth Factor* β [TGF- β – fator de transformação do crescimento β], TNF- α) e infiltração de macrófagos, há indução da hiperfiltração, hipertensão e hipertrofia glomerular com o comprometimento dos quatro tipos de células glomerulares: mesangiais, endoteliais e epiteliais visceral e parietal; inflamação tecidual, com aumento progressivo da matriz mesangial, colapso capilar, fibrose, glomerulosclerose, com conseqüente perda da filtração glomerular (GRAF; CLAPAUCH; LYRA, 2009; KAGAMI, 2012; LEEHY et al., 2000; LIM; TESCH, 2012; LYRA; CAVALCANTI, 2005; O'DONNELL et al, 1998; OLUGBENGA et al., 2004; RAPARIA; USMAN; KANWAR, 2013; RIELLA, 2010; ZATZ, 2000).

Além disso, o DM pode interferir na proliferação celular que ocorre no tecido renal. O *Proliferation Cell Nuclear Antigen* (PCNA) é uma proteína nuclear de 36 kD, cuja expressão está relacionada com a fase S do ciclo celular (CELIS; CELIS, 1985; HALL et al., 1990), ou seja, em estudos imunohistoquímicos, células PCNA positivas (PCNA⁺) indicam células em proliferação (HALL et al., 1990; MARQUEZ et al., 2002). Young e colaboradores verificaram um aumento no número de células PCNA⁺ em glomérulos de ratos diabéticos que não receberam insulina, esse aumento foi evidente um dia após a indução, atingiu um pico de expressão no terceiro dia, persistindo por 30 dias, sendo a resposta proliferativa totalmente abolida pela terapia com insulina (YOUNG et al., 1995). Em outro estudo, ratos diabéticos tratados com insulina apresentaram menor quantidade de células PCNA⁺ em células mesangiais, podócitos e tubulointersticiais (GROSS et al., 2003).

Outro componente que pode estar alterado no DM é a α -*Smooth Muscle Actin* (α -SMA), uma proteína que tem função de contratilidade e que se restringe à musculatura lisa

dos vasos em rins adultos normais (JOHNSON et al., 1991). Sob condições patológicas, algumas células renais podem apresentar alterações no seu fenótipo e passarem a expressar α -SMA. Nesse caso, citocinas agem em células renais (tubulares e mesangiais), além de fibroblastos, induzindo proliferação e modificando seus fenótipos para miofibroblastos (GELEILETE et al., 2001). Estas células começam a expressar α -SMA e aumentam a produção de colágeno e outros componentes da MEC (EDDY, 1996; HOWIE et al., 1995; ZHANG; MOORHEAD; EL NAHAS, 1995). Um aumento na expressão de α -SMA também foi verificado em glomérulos de ratos diabéticos não tratados com insulina, tornando-a uma preditora de ND progressiva (ESSAWY et al., 1997; YOUNG, 1995).

1.5 SRAA, gravidez e DM

É amplamente conhecido que o risco de efeitos adversos, tanto para a mãe quanto para o filho, é maior em pacientes com diabetes pré-gestacional (tipos 1 e 2) se comparado com a população geral (TAYLOR; DAVISON, 2007). Similarmente, sabe-se que a glicemia desregulada durante os segundo e terceiro trimestres de gestação está associada com o aumento na taxa de parto prematuro, pré-eclâmpsia (PE), macrossomia, morbidade e mortalidade materna e perinatal (GALINDO et al., 2006; REMSBERG et al., 1999). A PE é uma doença hipertensiva peculiar à gravidez humana e caracteriza-se pelo desenvolvimento gradual de hipertensão, proteinúria, edema generalizado e, às vezes, alterações da coagulação e da função hepática (PASCOAL, 2002). A PE afeta de 5 a 7% das mulheres na primeira gravidez e se repete em 13 a 18% em gravidez subsequente (BOMBRYN et al., 2008; HNAT, 2008). Esse número sobe para 40% em mulheres com nefropatia incipiente e 47% em mulheres com nefropatia declarada (MIODOVNIK et al., 1996). Por estas razões, recomenda-se um controle glicêmico rigoroso tanto no período pré-gestacional, quanto durante a gestação (ADA, 2013; GEDE, 2006).

Em geral, mulheres com diabetes e nefropatia têm algum grau de agravamento durante a gestação, a proteinúria aumenta em consequência do aumento da TFG, assim como aumentam as complicações perinatais. Tanto a microalbuminúria como a nefropatia mais grave associam-se a maior risco de parto prematuro, sobretudo por PE. A gravidez não parece associar-se ao agravamento permanente da função renal, a não ser que ocorra hipertensão

arterial mal controlada ou creatininemias na pré-concepção superiores a 1,5 mg/dL (IRFAN et al., 2004; JONES et al., 1996; PURDY et al., 1996).

Mulheres com hipertensão gestacional acompanhada de proteinúria tem risco aumentado de desenvolver doença renal crônica (DRC) quando comparadas com mulheres grávidas normotensas (MÄNNISTÖ et al., 2013). A gravidez em mulheres com DRC é considerada de alto risco (FISCHER et al., 2004; HOU, 1999), uma vez que pode produzir efeitos adversos tanto à mãe quanto ao filho (NEVIS et al., 2011), na medida em que os rins não são capazes de se adaptarem às mudanças fisiológicas normais de uma gravidez (EPSTEIN, 1996; LINDHEIMER; DAVISON; KATZ, 2001).

Mulheres com ND que não têm uma queda na creatinina no segundo trimestre de gestação são mais propensas a terem mais complicações na gravidez, provavelmente relacionadas com a incapacidade de acomodação das alterações fisiológicas da TFG necessárias durante a gravidez (KITZMILLER; COMBS, 1996). Mulheres hipertensas com baixa TFG apresentaram piora nos dados renais após a gravidez, havendo o desenvolvimento de proteinúria (BIESENBAACH et al., 1999), que geralmente retorna aos níveis basais após o parto (GORDON et al., 1996). Sabe-se que a terapia anti-hipertensiva com a inibição da ECA tem importância para reduzir o risco de complicações renais em pacientes com DM 1 com microalbuminúria (MATHIESEN et al., 1999) e ND (LEWIS et al., 1993). No entanto, esta inibição durante a gravidez está associada à malformação congênita (COOPER et al., 2006) e falência renal do feto (SHOTAN et al., 1994).

Mulheres com ND apresentam risco aumentado de terem falência renal durante e após a gravidez e eventualmente morbidade ou morte por doenças macrovasculares. Aquelas que apresentam insuficiência renal média a moderada geralmente experimentam nenhuma aceleração permanente na taxa de declínio da função renal durante a gravidez e no pós-parto. No entanto, em mulheres com insuficiência renal grave, o declínio da função renal durante a gravidez pode persistir no período pós-parto (SINGH, 2012).

Nas mulheres diabéticas com microalbuminúria ou ND, o efeito da terapia anti-hipertensiva em relação ao desenvolvimento e progressão da hipertensão e proteinúria durante a gravidez parece promissor quando se faz uso de drogas anti-hipertensivas consideradas seguras durante a gravidez. Realizou-se um estudo prospectivo com mulheres grávidas com DM 1 com normoalbuminúria, microalbuminúria ou ND, que foram submetidas a uma estratégia terapêutica anti-hipertensiva. Embora menos grave do que em estudos anteriores, a ND ainda esteve associada com resultados mais adversos na gravidez, como PAS média

maior, aumento da creatinina sérica, diminuição da TFG, parto prematuro e PE (NIELSEN; DAMM; MATHIESEN, 2009).

1.5 Justificativa

Diversas linhas de evidências indicam que a hemodinâmica renal é alterada no DM clínico e experimental e que as mudanças na função hemodinâmica renal desempenham um papel importante na patogênese da nefropatia comumente vista nesta desordem metabólica (BERMAN; RIFKIN, 1973; MAUER et al., 1978; MOGENSEN; ANDERSEN, 1975; REUBI, 1953; STEFFES; BROWN; MAUER, 1978).

Dados do nosso laboratório, já aceitos para publicação (FRANÇA-SILVA; OLIVEIRA; BALBI, 2015), evidenciaram os efeitos do diabetes materno sobre o desenvolvimento e função renais dos filhotes de ratas Wistar, demonstrando que esta doença pode induzir um *programming* de lesão renal na prole de mães hiperglicêmicas, uma vez que houve alterações estruturais importantes que resultaram em queda da TFG e aumentos da PAS e da excreção urinária de proteínas. Estas alterações podem ter sido mediadas por mudanças no padrão de expressão de MAPK como p-JNK e p-p38 (OLIVEIRA, 2014).

Uma vez que o diabetes pode resultar em danos renais para os filhos de mães diabéticas, é possível que as mães também possam sofrer efeitos deletérios dessa doença no período pós-parto. Embora existam muitos estudos sobre alterações renais ocorridas em ratas diabéticas durante a gestação, em pacientes renais crônicas que engravidaram, ou pacientes que passaram por transplante renal e engravidaram, etc, não existem dados na literatura sobre os efeitos renais do diabetes, induzido durante a gestação e mantido no período pós-parto, para as mães em longo prazo.

Assim, a realização desse trabalho poderá contribuir com algumas destas informações. Além disso, poderá evidenciar se a gravidez tem alguma participação nas alterações renais decorrentes do diabetes, no período pós-parto, e se estas alterações encontram-se associadas às mudanças na expressão de MAPK.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar as alterações estruturais renais, bem como a expressão de MAPK, no córtex renal de ratas com diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto; e
- Avaliar as alterações funcionais em ratas com diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar as alterações estruturais renais de ratas com diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto;
- Avaliar o número de células em proliferação (PCNA) e a expressão de α -SMA no córtex renal de ratas com diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto;
- Avaliar o padrão de expressão das MAPKs p-JNK e p-p38 no córtex renal de ratas com diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto;
- Avaliar a TFG de ratas com diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto; e
- Avaliar a PAS de ratas com diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU: 056/14) (**Anexo A**).

3.1.1 Grupo não-gravídico

Foram utilizadas 24 fêmeas de 180g com água e ração *ad libitum*, separadas em caixas individuais e divididas nos seguintes grupos:

- Grupo 1 (**G1 – Controles sem gravidez**): fêmeas que receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% (n=5);
- Grupo 2 (**G2 – Diabéticas sem gravidez**): fêmeas que receberam injeção intraperitoneal de aloxana (100 mg/kg) (*Sigma-Aldrich*) diluída em solução salina 0,9% (n=6).

3.1.1 Grupo gravídico

Foram utilizados para acasalamento 20 ratos Wistar machos de 300g e 276 fêmeas de 180g separados em caixas por sexo, com água e ração *ad libitum*. No final da tarde de cada dia, as fêmeas foram colocadas nas caixas dos machos na proporção de 2 a 3 fêmeas para cada macho. No início da manhã seguinte foi realizado o esfregaço vaginal de cada rata para verificação de uma possível gravidez pela presença de espermatozoides no esfregaço. Uma vez grávidas, as fêmeas foram postas em caixas individuais e divididas nos seguintes grupos:

- Grupo 3 (**G3 – Mães Controles**): mães que receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação (n=12);

- Grupo 4 (**G4 – Mães Diabéticas**): mães que receberam injeção intraperitoneal de aloxana (100 mg/kg) (*Sigma-Aldrich*) diluída em solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação (n=12).

As ratas de todos os grupos ficaram de jejum por cerca de 24 horas para a indução do diabetes através da droga aloxana ou administração de salina. Foi utilizada uma solução de glicose 20% durante 24 horas para evitar a morte das ratas por hipoglicemia, uma vez que a aloxana, ao destruir as células β -pancreáticas, libera grande quantidade de insulina. Dois dias pós-administração, foi coletada uma gota de sangue da cauda das fêmeas para verificação da glicemia com o auxílio de um glicosímetro, sendo consideradas diabéticas as ratas que tiveram glicemia maior ou igual a 150 mg/dL. Esporadicamente foi administrada uma unidade de insulina/rata para garantirmos a sobrevivência das mesmas até o final do protocolo experimental.

Cerca de 50 dias após o parto de G3 e G4 e também em tempo correspondente para G1 e G2, os animais foram submetidos a estudos funcionais (determinação de PAS e TFG), estruturais e imunohistoquímica.

3.2 Determinação da PAS

A PAS foi avaliada de maneira indireta por pletismografia. Antes da medida efetiva de PAS, os animais passaram por um período de habituação de 4 dias, com medida efetiva no 5º dia. Tanto para a habituação, quanto para a medida efetiva, os animais foram previamente aquecidos em uma câmara durante alguns minutos e, em seguida, submetidos à mensuração da PAS utilizando-se um manguito e um eletrodo, colocado diretamente na cauda desses animais. Os sinais captados foram amplificados pelo software *PowerLab* (*ADInstruments*) e convertidos pelo *LabChart 7 Pro* (*ADInstruments*) em valores de PAS em mmHg.

3.3 Estudos de função renal

Para os estudos de função renal de todos os grupos, as ratas foram colocadas em gaiolas metabólicas durante 24 horas para adaptação. Em seguida, permaneceram por mais 24

horas para a coleta de urina, quando também foi coletada uma amostra de sangue através de ordenhamento de cauda. Para determinação do clearance de creatinina e, conseqüentemente, da TFG, a dosagem de creatinina urinária e plasmática foi feita utilizando-se um método colorimétrico (YAN et al., 2014).

3.4 Retirada dos rins

Após os estudos funcionais, os animais foram devidamente anestesiados com halotano (*Cristália*) e tiveram os rins coletados para a realização das análises histológica e imunohistoquímica. Os animais foram pesados antes da coleta, assim como os rins, posteriormente. O rim direito foi fixado em metacarn por 24 horas e o esquerdo em bouin por 4 horas e, posteriormente, lavados em álcool 70%. Em seguida, os rins foram processados e incluídos em parafina para a realização de cortes de 4 µm de espessura com auxílio de um micrótomo.

3.5 Análises histológica e morfométrica

As lâminas foram coradas com tricrômico de Masson, Picrosirius Red e azul de toluidina. A coloração com tricrômico de Masson permitiu a análise do tecido renal, bem como a contagem do número de glomérulos/área de secção renal e medida da área de secção renal total. Esta medida foi realizada através do escaneamento das lâminas no *Scanner HP Scanjet 2400*. Além disso, determinaram-se as medidas das áreas totais dos glomérulos, dos tufo glomerulares e dos espaços capsulares de 20 glomérulos aleatórios/lâmina capturados no aumento de 40x com o auxílio de um microscópio (*Leica ICC50*) acoplado a uma vídeo-câmera, que transmitia as informações para o computador. A quantificação das áreas supracitadas foi realizada no programa *Image J* (Versão 1.4).

A coloração com Picrosirius Red foi utilizada para quantificação de colágeno. Nesta etapa, foram capturadas imagens da lâmina inteira no aumento de 10x e a ferramenta *Threshold* do programa *Image J* (Versão 1.4) foi utilizada para quantificar a porcentagem de área marcada com colágeno. Já a coloração de azul de toluidina permitiu a identificação e contagem de mastócitos/área em um microscópio de luz.

3.6 Análise imunohistoquímica

Para as imunorreações, os cortes foram incubados com os anticorpos primários monoclonais anti- α -SMA (1:1000 – *DAKO Corporation*), anti-p-JNK (1:30 – Santa Cruz Biotechnology) e anti-p-p38 (1:400 – *Sigma Chemical Company*), *overnight* a 4°C, e monoclonal anti-PCNA (1:1000 – *Sigma Chemical Company*), durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, os cortes foram submetidos a uma nova incubação, agora com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:200 – monoclonal – *Vector Laboratories*) durante 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi detectada com o sistema avidina-biotina peroxidase (*Vector Laboratories*), sendo que a adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Chemical Company*) juntamente com peróxido de hidrogênio permitiu o desenvolvimento de cor e a contracoloração foi feita com *metilgreen* (α -SMA, PCNA e p-p38) ou hematoxilina de Harris (p-JNK).

Foi utilizado também solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS – tampão fosfato salino) com *Bovine Serum Albumin* (BSA – albumina bovina – *Sigma Chemical Company*) 5% para diluir os anticorpos e, assim, bloquear ligações inespecíficas.

3.7 Avaliação dos resultados de imunohistoquímica

A imunohistoquímica para os anticorpos anti- α -SMA e p-JNK foi avaliada analisando-se a porcentagem do glomérulo ou do compartimento tubulointersticial (TBI) renal marcado, atribuindo-se um escore de 0 a 4. O escore 0 equivale em 0 a 5% do campo marcado, o escore 1, entre 5 e 25%, o escore 2, entre 25 e 50%, o escore 3, entre 50 e 75% e o escore 4, entre 75 e 100% (KLIEM et al., 1996). Já as reações de PCNA e p-p38 foram analisadas pela contagem de células positivas por glomérulo ou compartimento TBI renal. Foi determinado um escore ou número médio de células por compartimento TBI e glomerular para cada animal, sendo que análise foi realizada na lâmina inteira.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism Version 5.00 (Trial)*. Verificou-se primeiramente se os dados apresentavam ou não distribuição normal utilizando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Como os dados não apresentaram distribuição gaussiana e dada a necessidade de se comparar 4 grupos no mesmo momento, optou-se pelo teste não-paramétrico de *Kruskall-Wallis*, com pós-teste de *Dunn*. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Animais e indução de diabetes

Foram utilizadas 300 ratas durante todo o protocolo experimental. Destas, 24 foram destinadas para os grupos não-gravídicos e 276, para os grupos gravídicos.

4.1.1 Grupo não-gravídico

Tendo em vista o número de animais pertencentes a este grupo, do total de ratas usadas durante os experimentos, 5 foram destinadas para o G1 e 19 para o G2. Houve 52,63% (n=10) de sucesso na indução do diabetes com aloxana nos animais de G2. No entanto, daquelas que ficaram hiperglicêmicas, apenas 6 sobreviveram até o final do desenho experimental. A glicemia média de G2 verificada após a indução foi de 416,55 mg/dL.

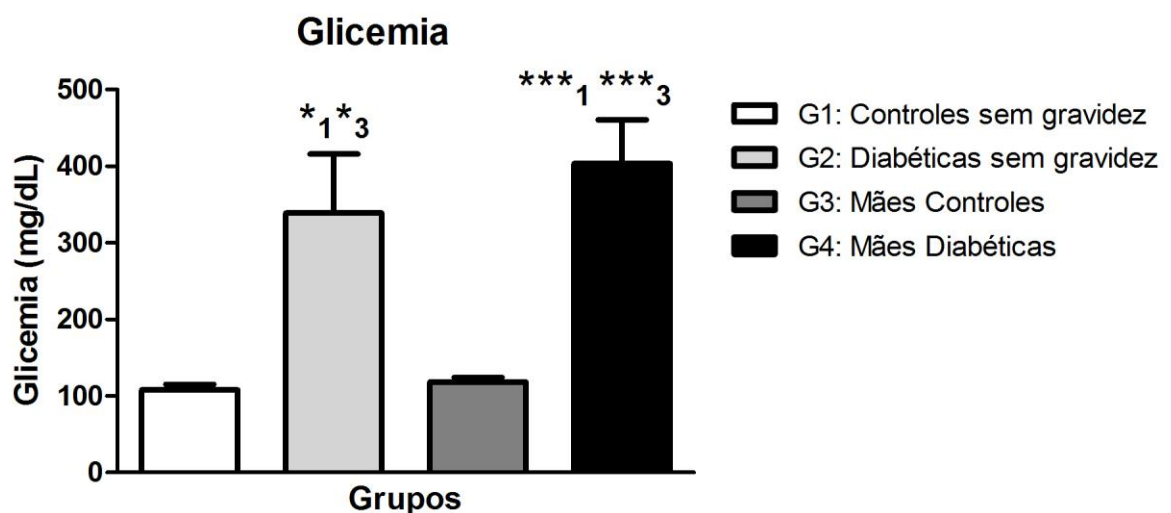
4.1.2 Grupo gravídico

Considerando todas as ratas colocadas para acasalamento e que foram consideradas grávidas (n=276) e, em seguida, submetidas à indução do diabetes com aloxana, apenas 19% (n=57) ficaram diabéticas. Quanto ao nascimento dos filhotes, em G3, 87,5% (n=21) das ratas pariram, enquanto que, em G4, somente 24,56% (n=14) tiveram seus filhotes, ou seja, em G4, 75,43% das ratas consideradas grávidas não pariram e/ou morreram. A média de filhotes/ninhada do G3 foi de 11,11, com número médio de 6 fêmeas e 5,11 machos. Já o G4 apresentou número médio de 10,6 animais/ninhada, com média de 5,2 fêmeas e 5,4 machos. A glicemia média verificada após a indução foi de 404,42 mg/dL para as ratas do G4.

4.2 Quadro de diabetes e estudos funcionais

Com relação à indução e manutenção do diabetes, após o período de acompanhamento dos animais, observou-se que a glicemia foi maior nos animais G2 ($338 \pm 77,02$) e G4 ($403 \pm 57,09$) quando comparados aos de G1 ($108 \pm 7,29$) e de G3 ($118 \pm 5,87$), mas não houve diferenças entre os grupos G2 e G4 (**Figura 2; Tabela 1**). Além disso, os animais diabéticos de G2 ($60,20 \pm 16,01$) e G4 ($58,78 \pm 11,26$) apresentaram maior volume urinário que os animais de G1 ($13,20 \pm 1,46$) e G3 ($16,72 \pm 1,96$), mas não houve diferenças significativas entre eles (**Figura 3; Tabela 1**).

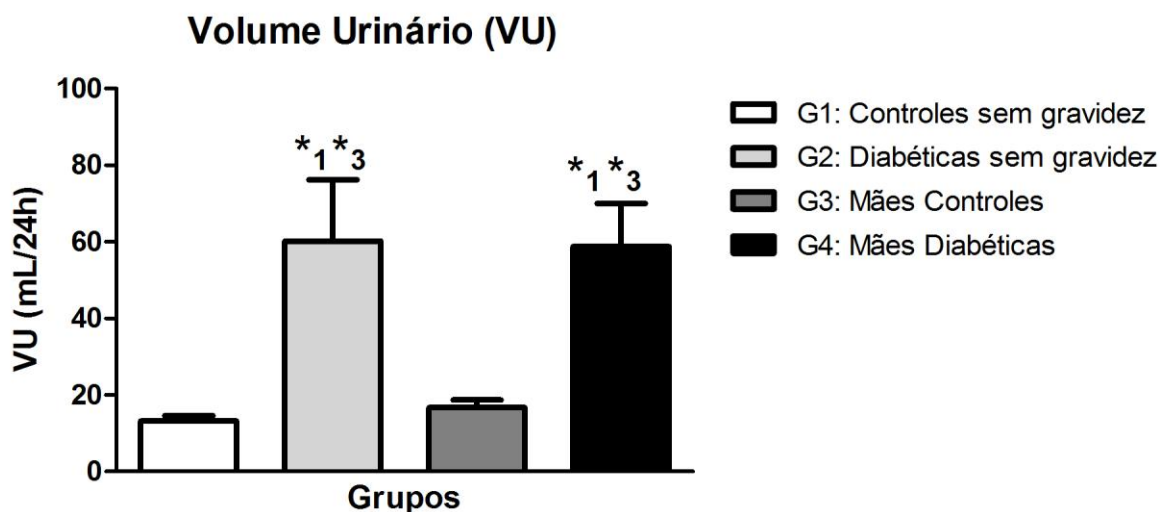
Figura 2 – Valores glicêmicos apresentados pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Valores de glicemia dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; *¹ p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3); ***¹ p<0,001 (vs. Controles sem gravidez: G1); ***³ p<0,001 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Figura 3 – Volume urinário apresentado pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Valores urinários dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; *¹ p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Tabela 1 – Dados de glicemia e volume urinário das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

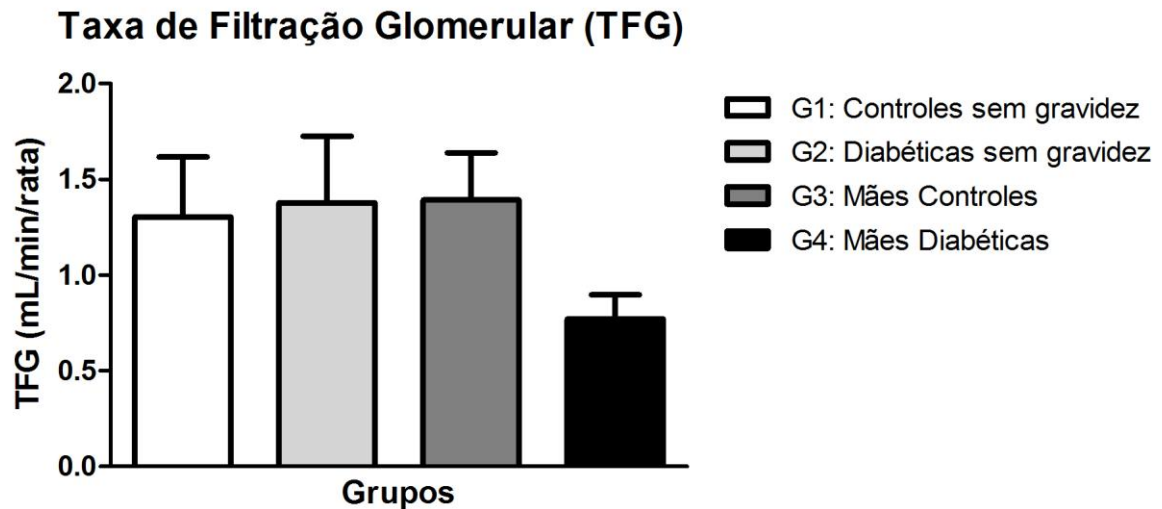
Grupos	Glicemia (mg/dL)	Volume urinário (mL/24h)
G1	108,00 ± 7,29	13,20 ± 1,46
G2	338,80 ± 77,02* ¹ * ³	60,20 ± 16,01* ¹ * ³
G3	118,70 ± 5,87	16,72 ± 1,96
G4	403,4 ± 57,09*** ¹ *** ³	58,78 ± 11,26* ¹ * ³

Fonte: A autora (2015).

Valores glicêmicos e volume urinário dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas). Os dados são expressos como Média ± EPM; *¹ p<0,05 (vs. Controle sem gravidez: G1); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3); ***¹ p<0,001 (vs. Controles sem gravidez: G1); ***³ p<0,001 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Não houve diferenças significativas nos valores de TFG entre os grupos estudados, mas em G4 percebeu-se uma tendência à redução ($0,77 \pm 0,13$), quando comparado a todos os outros grupos (G1: $1,30 \pm 0,31$; G2: $1,38 \pm 0,35$; G3: $1,39 \pm 0,25$) (**Figura 4; Tabela 2**). Com relação à medida da PAS, verificada por pletismografia, não foram registradas diferenças significativas entre os grupos estudados (**Figura 5; Tabela 2**).

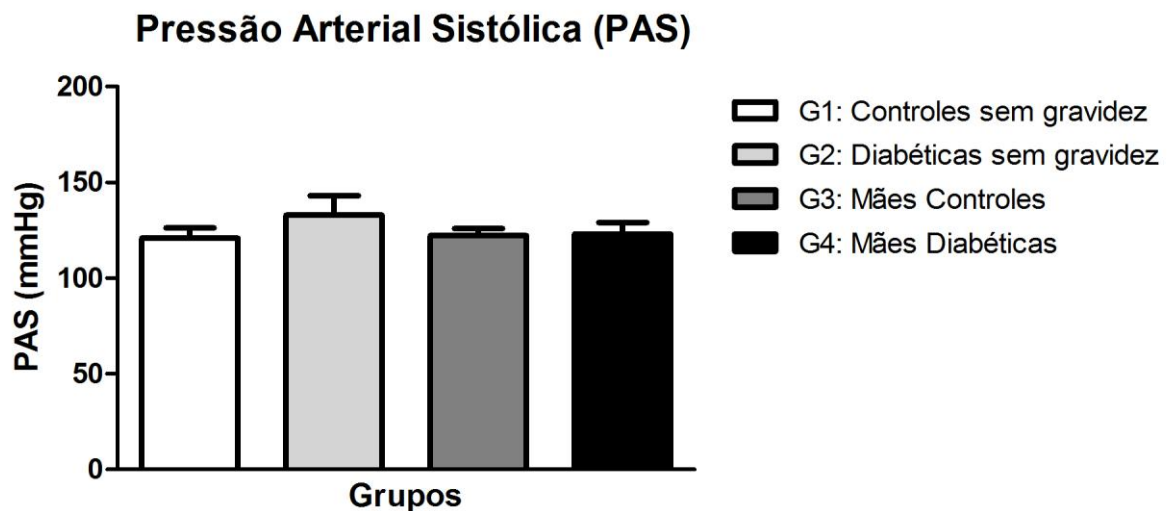
Figura 4 – Taxa de Filtração Glomerular (TFG) apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Determinação da TFG pelo clearance de creatinina nos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM. (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 5 – Pressão arterial sistólica (PAS) apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Determinação de PAS por pletismografia nos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM. (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 2 – Dados de TFG e PAS das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

Grupos	TFG (mL/min/rata)	PAS (mmHg)
G1	1,30 ± 0,31	120,90 ± 5,29
G2	1,38 ± 0,35	132,90 ± 10,19
G3	1,39 ± 0,25	122,20 ± 3,73
G4	0,77 ± 0,13	123,10 ± 5,95

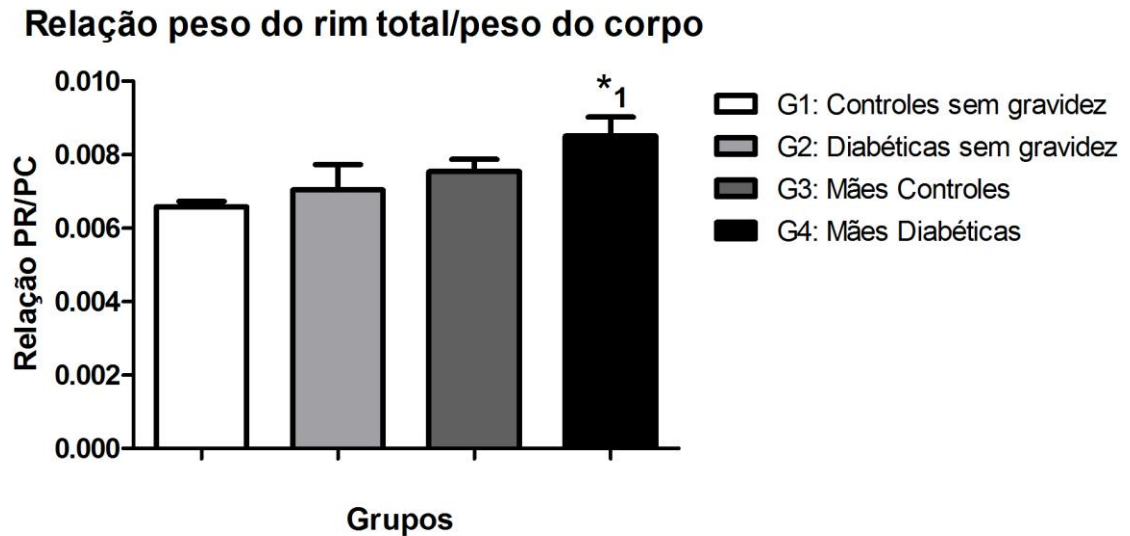
Fonte: A autora (2015).

TFG determinada pelo clearance de creatinina e PAS avaliada por pletismografia dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas). Os dados são expressos como Média ± EPM. (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.3 Análise dos pesos corporal e renal

Com relação ao peso dos rins e peso corporal das ratas estudadas, G4 ($0,0085 \pm 0,0005$) apresentou maior relação peso do rim total/peso do corpo quando comparado a G1 ($0,0065 \pm 0,0001$), sem diferenças significativas entre os demais grupos estudados (**Figura 6; Tabela 3**). No entanto, os animais de G3 ($0,0039 \pm 0,0001$) e G4 ($0,0042 \pm 0,00029$) apresentaram maior relação peso do rim direito/peso do corpo quando comparados ao G1 ($0,0030 \pm 0,0000$), mas os valores não foram diferentes entre si (**Figura 7; Tabela 3**). Já a relação peso rim esquerdo/peso do corpo foi maior em G4 ($0,0042 \pm 0,0002$) quando comparado ao G1 ($0,0028 \pm 0,0002$) (**Figura 8; Tabela 3**).

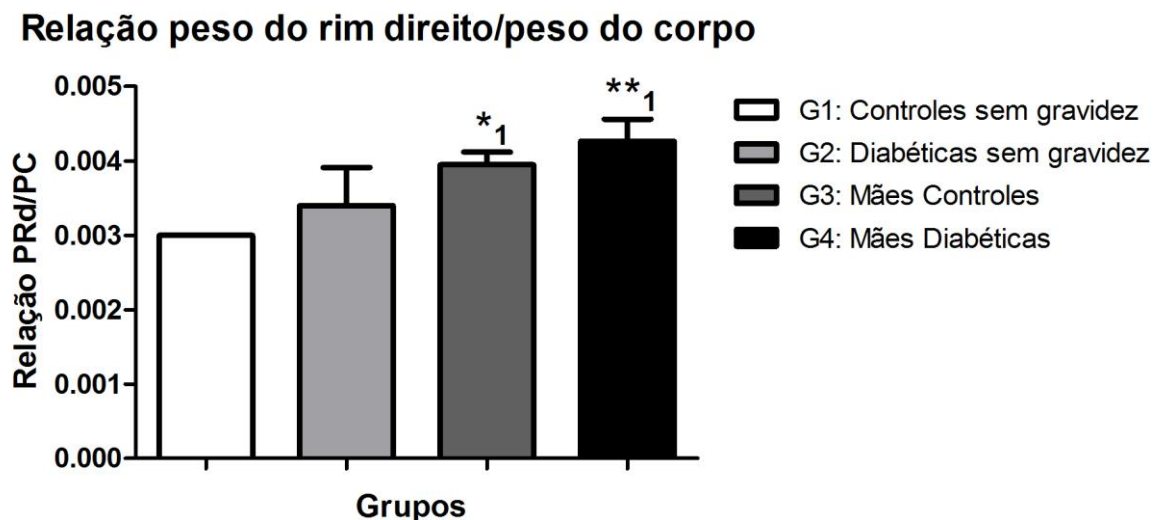
Figura 6 – Relação peso renal total/peso corpo apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Relação peso do rim total/peso corpo dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; ^{*1} p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Figura 7 – Relação peso do rim direito/peso do corpo apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

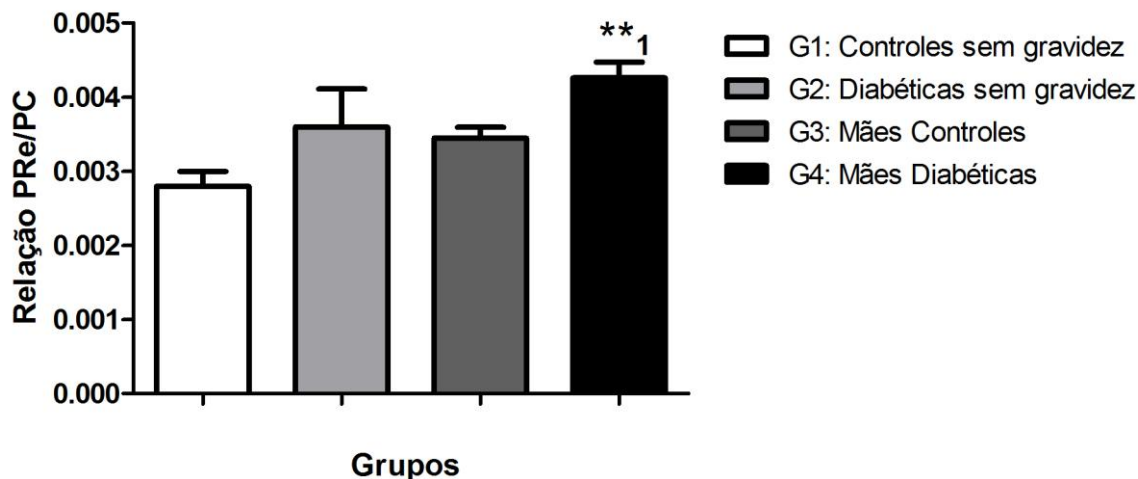


Fonte: A autora (2015).

Relação peso do rim direito/peso corpo dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; ^{*1} p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1); ^{**1} p<0,01 (vs. Controle sem gravidez: G1) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Figura 8 – Relação peso do rim esquerdo/peso do corpo apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

Relação peso do rim esquerdo/peso do corpo



Fonte: A autora (2015).

Relação peso do rim esquerdo/peso do corpo dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; ^{**1} p<0,01 (vs. Controle sem gravidez: G1) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Tabela 3 – Dados da relação peso rim total/peso do corpo (PR/PC), peso rim direito/peso do corpo (PRd/PC) e peso rim esquerdo/peso do corpo (PRe/PC) das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

Grupos	PR/PC	PRd/PC	PRe/PC
G1	0,0065 ± 0,0001	0,0030 ± 0,0000	0,0028 ± 0,0002
G2	0,0070 ± 0,0006	0,0034 ± 0,0000	0,0036 ± 0,0005
G3	0,0075 ± 0,0003	0,0039 ± 0,0001 ^{*1}	0,0034 ± 0,0001
G4	0,0085 ± 0,0005 ^{*1}	0,0042 ± 0,0002 ^{**1}	0,0042 ± 0,0002 ^{**1}

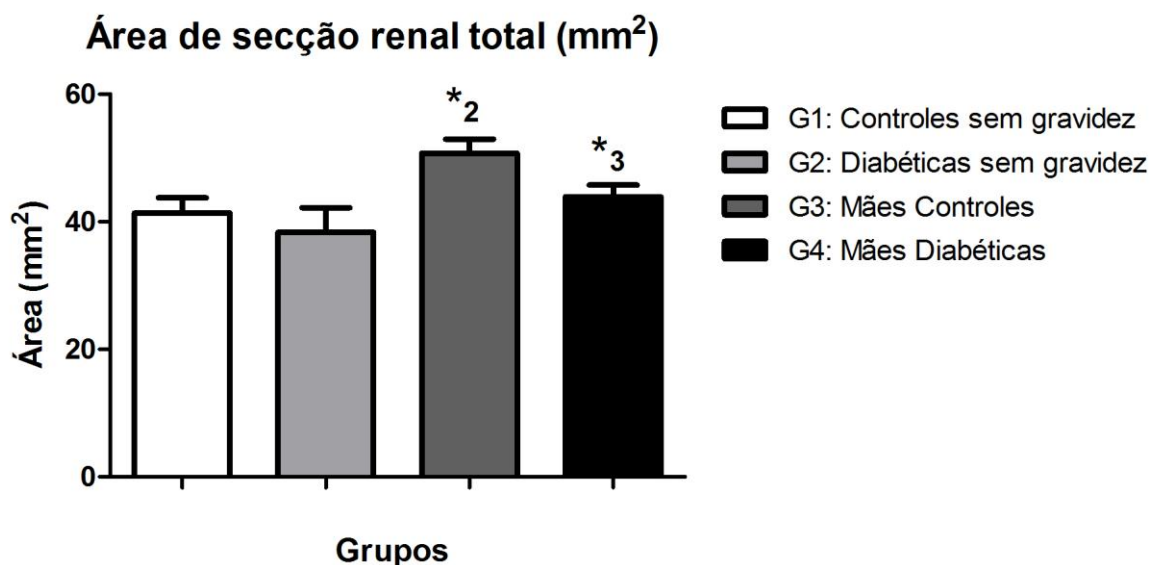
Fonte: A autora (2015).

Relação peso rim total/peso do corpo (PR/PC), peso rim direito/peso do corpo (PRd/PC) e peso rim esquerdo/peso do corpo (PRe/PC) dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas). Os dados são expressos como Média ± EPM; ^{*1} p<0,05 (vs. Controle sem gravidez: G1); ^{**1} p<0,01 (vs. Controle sem gravidez: G1) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

4.4 Análises histológica, morfométrica e imunohistoquímica

A coloração com Tricrômico de Masson permitiu a determinação da área de secção renal total, áreas totais dos glomérulos, dos tufo glomerulares e dos espaços capsulares, bem como a contagem do número de glomérulos/área de secção renal. A área de secção renal total foi significativamente maior em G3 ($50,76 \pm 2,21$) quando comparada a G2 ($38,38 \pm 3,84$), assim como houve redução significativa desta área em G4 ($43,94 \pm 1,84$) em relação a G3 (**Figura 9; Tabela 4**). A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa quanto às áreas glomerulares totais (**Figura 10; Tabela 4**) e aos espaços capsulares (**Figura 11; Tabela 4**), entre os grupos estudados. Entretanto, a área do tufo glomerular foi significativamente maior em G3 ($7,90 \pm 0,31$) e G4 ($8,00 \pm 0,27$) quando comparadas a G1 ($6,22 \pm 0,36$) e G2 ($6,50 \pm 0,36$) (**Figura 12; Tabela 4**).

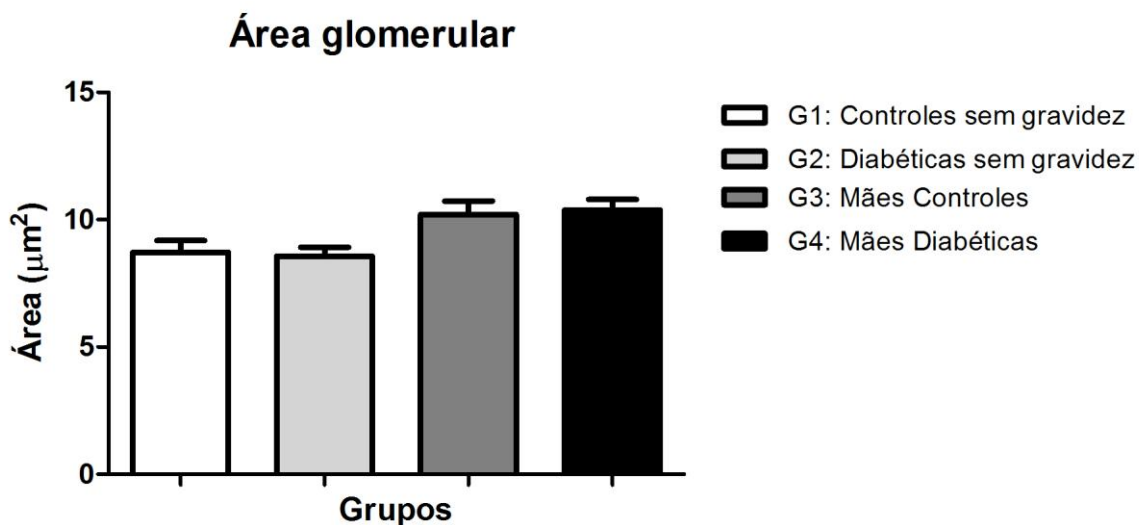
Figura 9 – Área de secção renal total apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Medida da área de secção renal total dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM; *² p<0,05 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

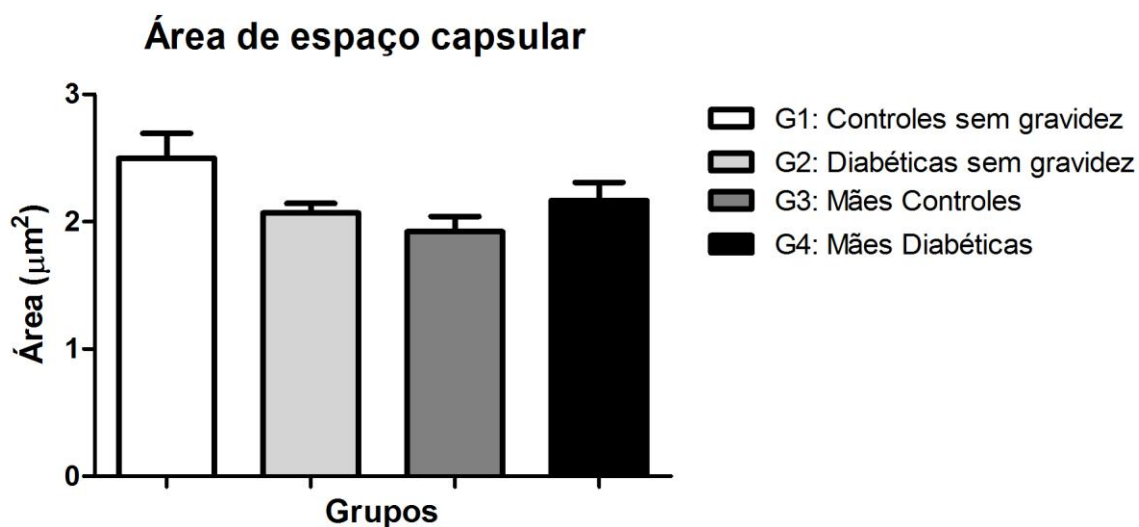
Figura 10 – Área glomerular apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Medida da área do glomérulo dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM. (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

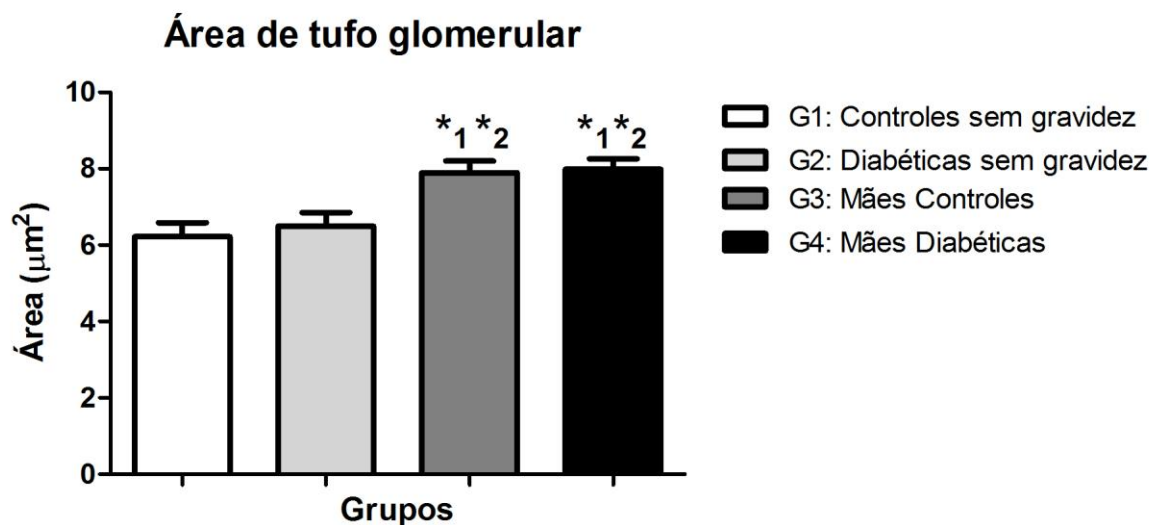
Figura 11 – Área de espaço capsular apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Medida da área do espaço capsular dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM. (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 12 – Área do tufo glomerular apresentada pelas ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Medida da área do tufo glomerular dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; *¹ p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1); *² p<0,05 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Tabela 4 – Dados de área de secção renal total, de área glomerular, de tufo glomerular e de espaço capsular das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

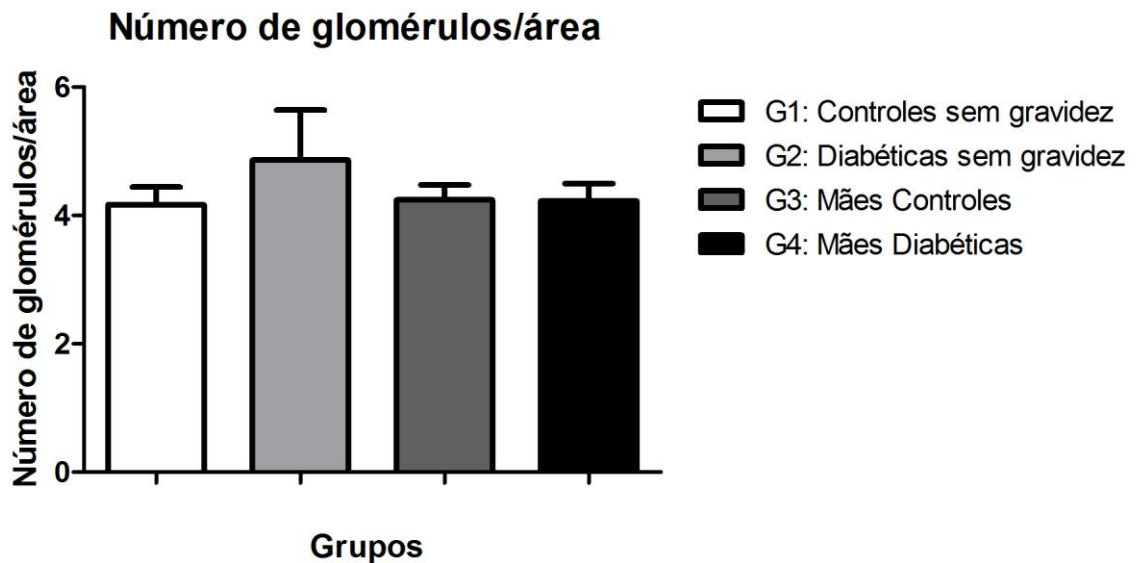
Grupos	Área de secção renal total	Área glomerular	Área de tufo glomerular	Área de espaço capsular
G1	41,39 ± 2,40	8,72 ± 0,45	6,22 ± 0,36	2,50 ± 0,19
G2	38,38 ± 3,84	8,57 ± 0,35	6,50 ± 0,36	2,07 ± 0,08
G3	50,76 ± 2,21* ²	10,20 ± 0,52	7,90 ± 0,31* ¹ * ²	1,92 ± 0,12
G4	43,94 ± 1,84* ³	10,38 ± 0,41	8,00 ± 0,27* ¹ * ²	2,17 ± 0,14

Fonte: A autora (2015).

Área de secção renal total, área glomerular, área de tufo glomerular e área de espaço capsular dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas). Os dados são expressos como Média ± EPM; *¹ p<0,05 (vs. Controle sem gravidez: G1); *² p<0,05 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

Com relação à contagem do número de glomérulos/área de secção renal, não houve diferença estatística entre os animais de todos os grupos estudados (**Figura 13; Tabela 5**).

Figura 13 – Determinação do número de glomérulos/área de secção renal no córtex de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

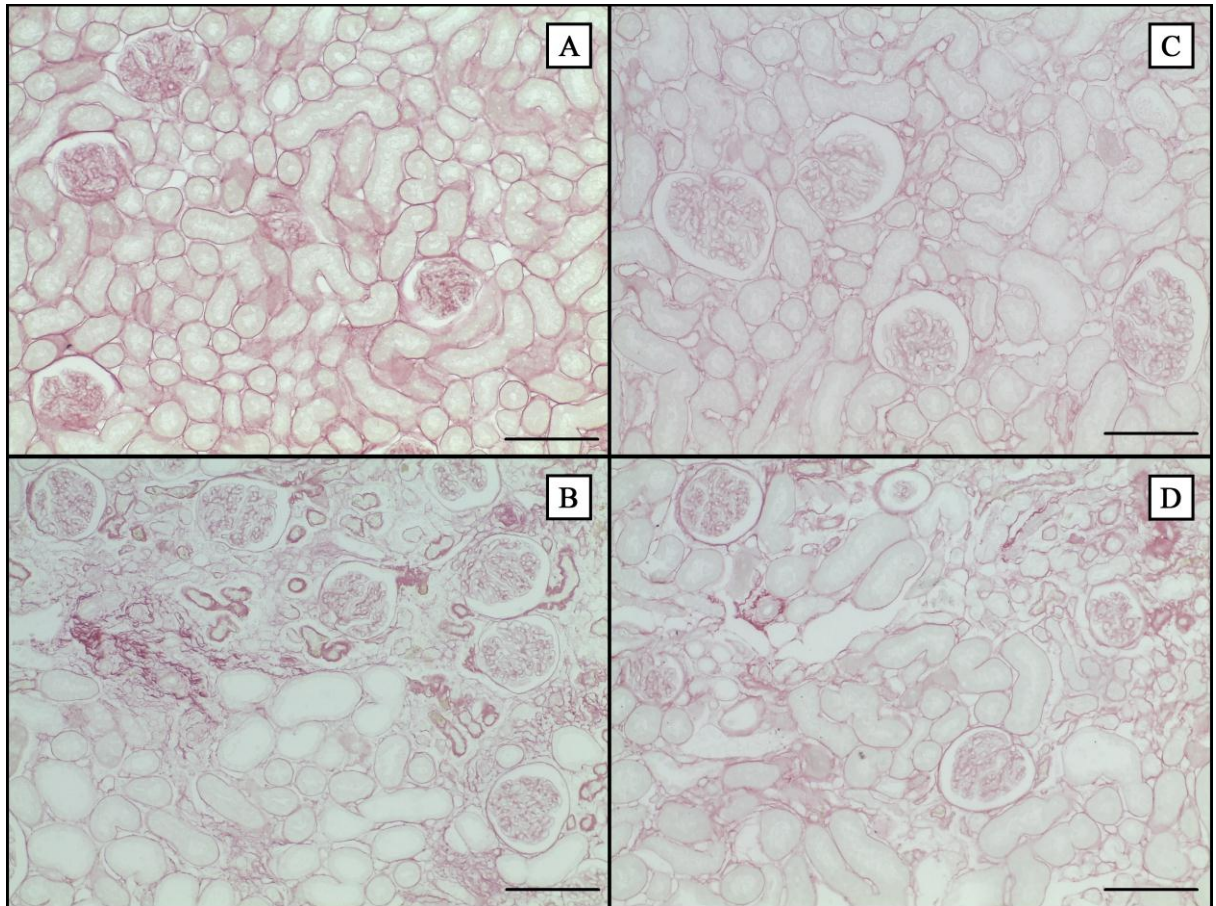


Fonte: A autora (2015).

Número de glomérulos do córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=12) e G4 (Mães Diabéticas; n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM. (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A coloração de Picrosirius Red permitiu a quantificação da porcentagem de colágeno cortical. Os animais de G2 ($1,41 \pm 0,14$) e G4 ($1,46 \pm 0,10$) apresentaram maior porcentagem de colágeno cortical quando comparados aos seus respectivos controles (G1: $0,65 \pm 0,12$; G3: $0,92 \pm 0,08$), que não apresentaram diferenças entre si. G4 ainda apresentou maior porcentagem de colágeno que G1 (**Figuras 14 e 15; Tabela 5**).

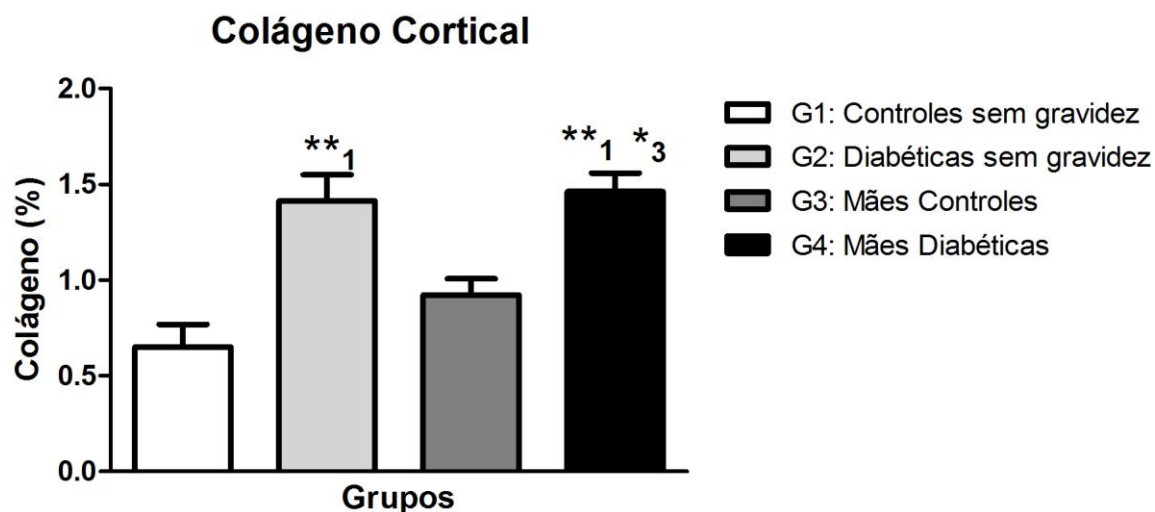
Figura 14 – Coloração de Picrosirius Red do córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Cortes histológicos do córtex renal dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez- **A**), G2 (Diabéticas sem gravidez - **B**), G3 (Mães Controles - **C**) e G4 (Mães Diabéticas - **D**), respectivamente, corados com Picrosirius Red. Observar maior deposição de colágeno em G2 e G4 quando comparado com G1 e G3. Barra = 100 μ m.

Figura 15 – Quantificação da porcentagem de colágeno cortical das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

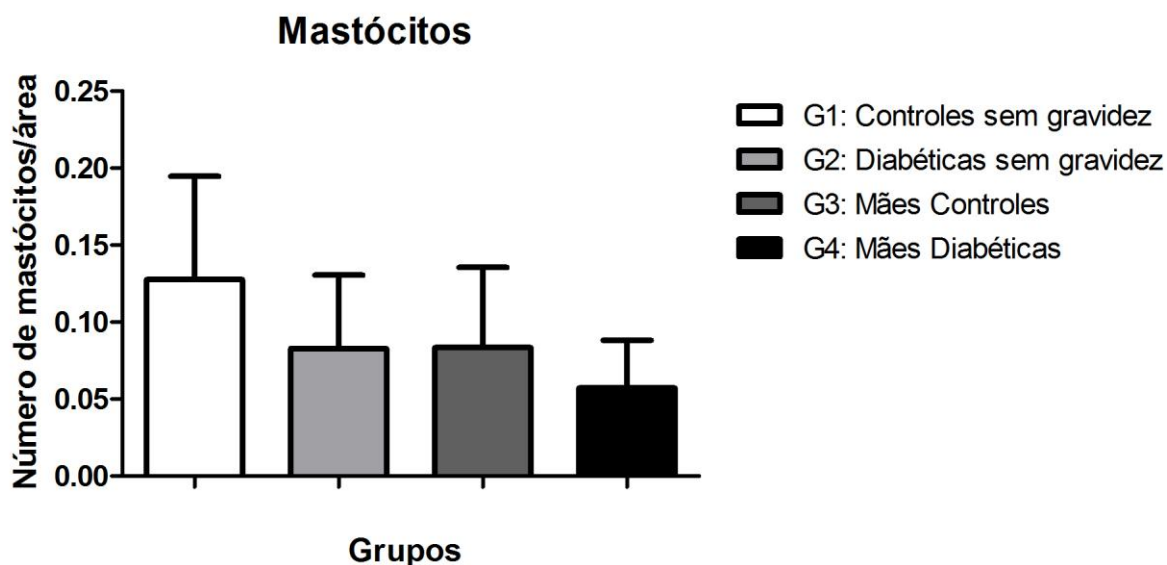


Fonte: A autora (2015).

Quantificação da porcentagem de colágeno cortical dos grupos G1 (Controles sem gravidez: n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez: n=6), G3 (Mães Controles: n=12) e G4 (Mães Diabéticas: n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM; **¹ p<0,01 (vs. Controle sem gravidez: G1); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p<0,05.

A coloração de azul de toluidina permitiu a identificação e contagem do número de mastócitos/área do córtex renal. Os dados obtidos não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos estudados (**Figura 16; Tabela 5**).

Figura 16 – Contagem do número de mastócitos/área do córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Número de mastócitos/área do córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=12) e G4 (Mães Diabéticas; n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM. (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 5 – Dados de número de glomérulos, porcentagem de colágeno cortical e número de mastócitos/área do córtex renal das ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

Grupos	Número de glomérulos	Colágeno cortical (%)	Número de mastócitos/área
G1	4,17 ± 0,27	0,65 ± 0,12	0,13 ± 0,07
G2	4,86 ± 0,78	1,41 ± 0,14** ¹	0,08 ± 0,05
G3	4,24 ± 0,24	0,92 ± 0,08	0,08 ± 0,05
G4	4,23 ± 0,27	1,46 ± 0,10 ** ¹ * ³	0,06 ± 0,03

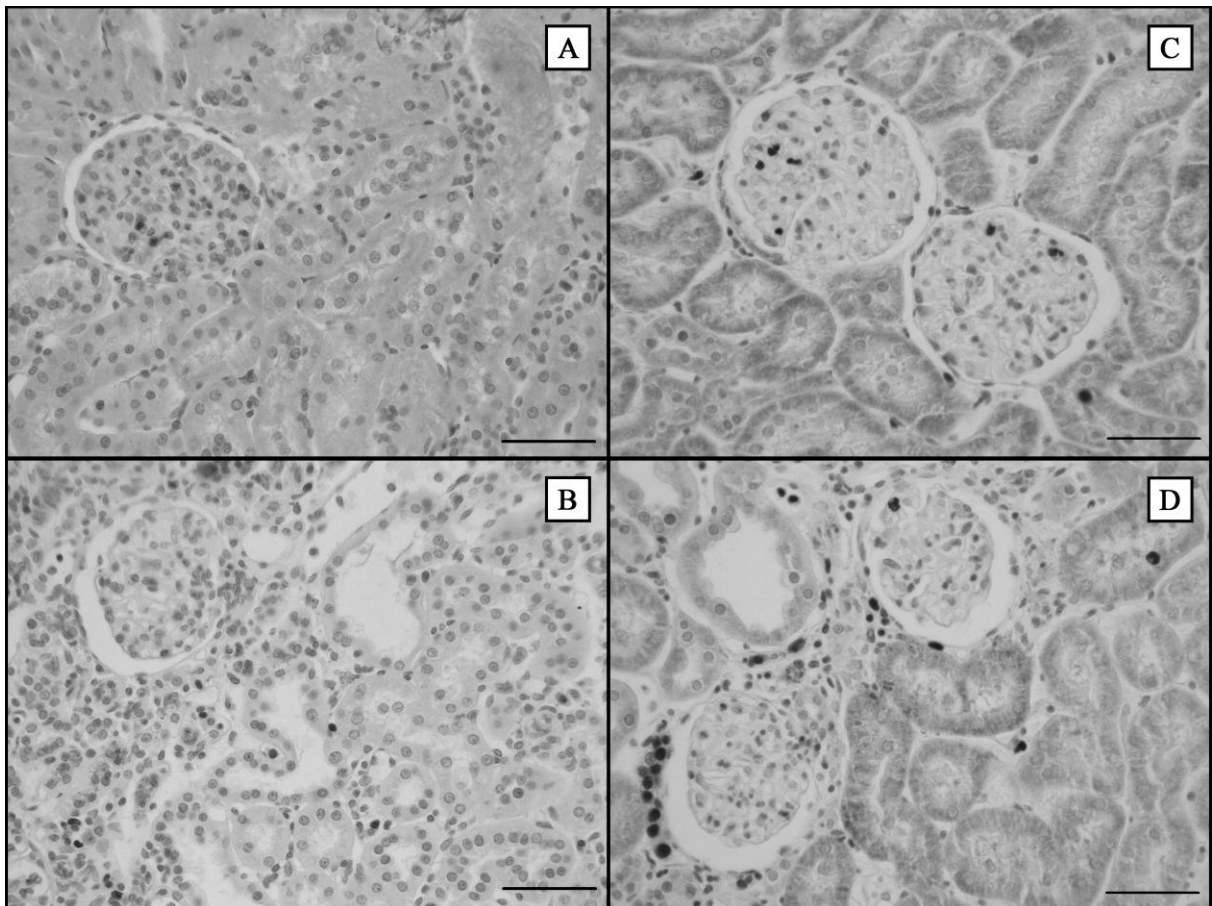
Fonte: A autora (2015).

Número de glomérulos, porcentagem de colágeno cortical e número de mastócitos/área do córtex renal dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas). Os dados são expressos como Média ± EPM; **¹ $p < 0,01$ (vs. Controles sem gravidez: G1); *³ $p < 0,05$ (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A imunorreação para PCNA realizada para detecção de células em proliferação evidenciou que G3 apresentou aumento significativo das células glomerulares em proliferação

($3,87 \pm 0,73$) quando comparado a G1 ($1,13 \pm 0,07$) e G2 ($1,49 \pm 0,28$), enquanto G4 apresentou uma redução de células PCNA⁺ glomerulares ($2,08 \pm 0,21$) quando comparado às mães de G3 (**Figuras 17 e 18; Tabela 6**). Com relação à quantificação da imunorreação para PCNA no compartimento TBI, observou-se que G3 ($6,08 \pm 0,70$) apresentou maior número de células PCNA⁺ em relação a G1 ($3,31 \pm 0,40$). Já o G4 ($11,50 \pm 0,74$) mostrou maior número de células em proliferação quando comparado a todos os outros grupos (**Figuras 17 e 19; Tabela 6**).

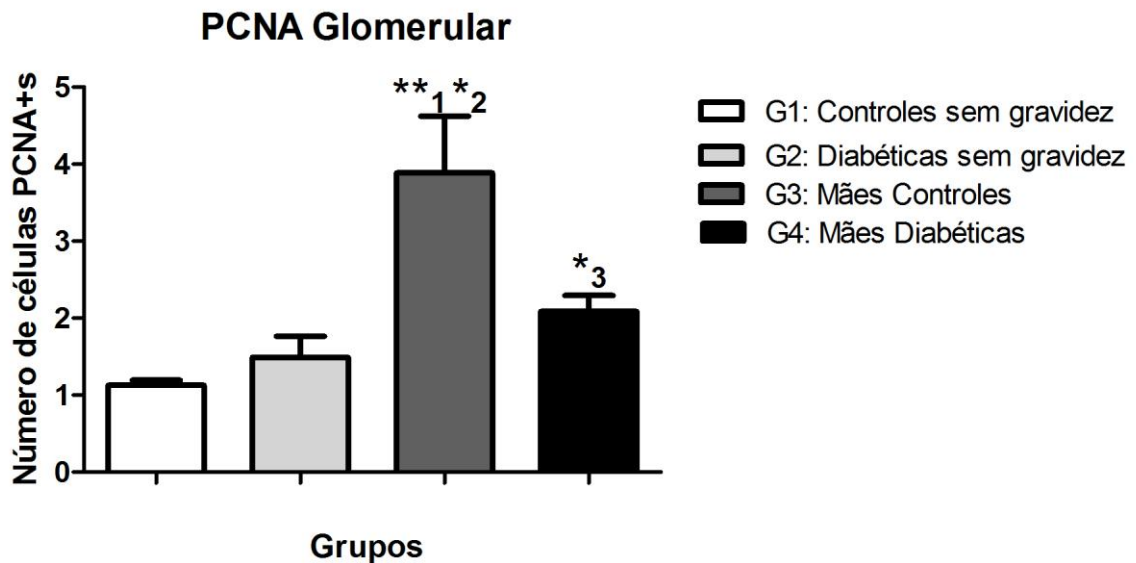
Figura 17 – Imunorreação para células em proliferação (PCNA⁺) no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Imunorreação para PCNA no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez - **A**), G2 (Diabéticas sem gravidez - **B**), G3 (Mães Controles - **C**) e G4 (Mães Diabéticas - **D**). Observar que o número de células PCNA⁺ por glomérulo é maior nos animais de G3 e menor em G4 e que no TBI é maior em G4 do que nos demais grupos. Barra = 50 μ m.

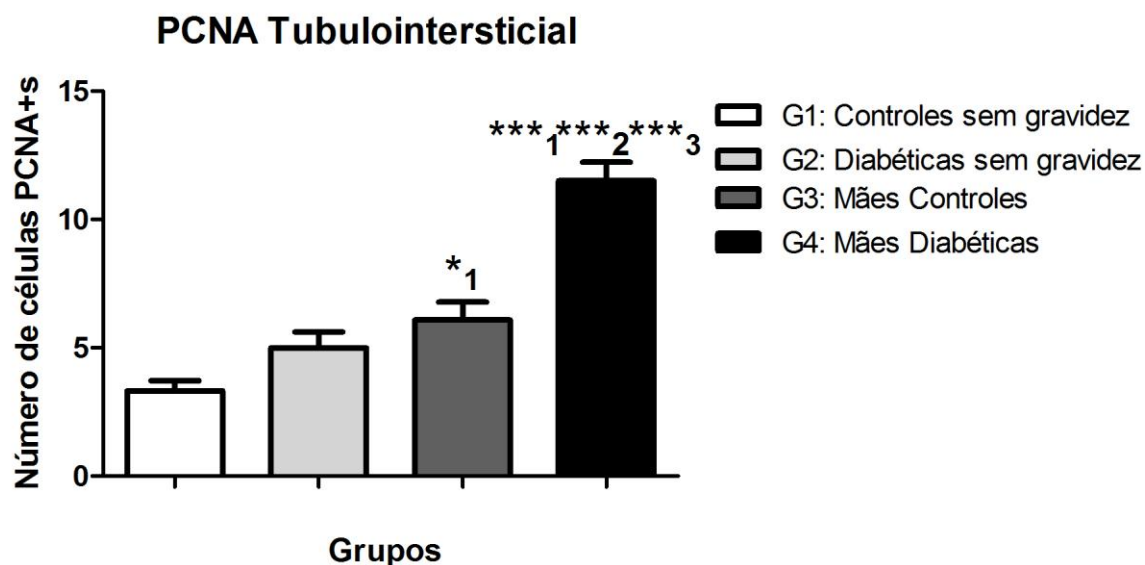
Figura 18 – Quantificação do número de células PCNA⁺ por glomérulo no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Expressão de células PCNA⁺ por glomérulo no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=5), G3 (Mães Controles; n=9) e G4 (Mães Diabéticas; n=7). Os dados são expressos como Média ± EPM; **¹ p<0,01 (vs. Controles sem gravidez: G1); *² p<0,05 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p < 0,05.

Figura 19 – Quantificação do número de células PCNA⁺ TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

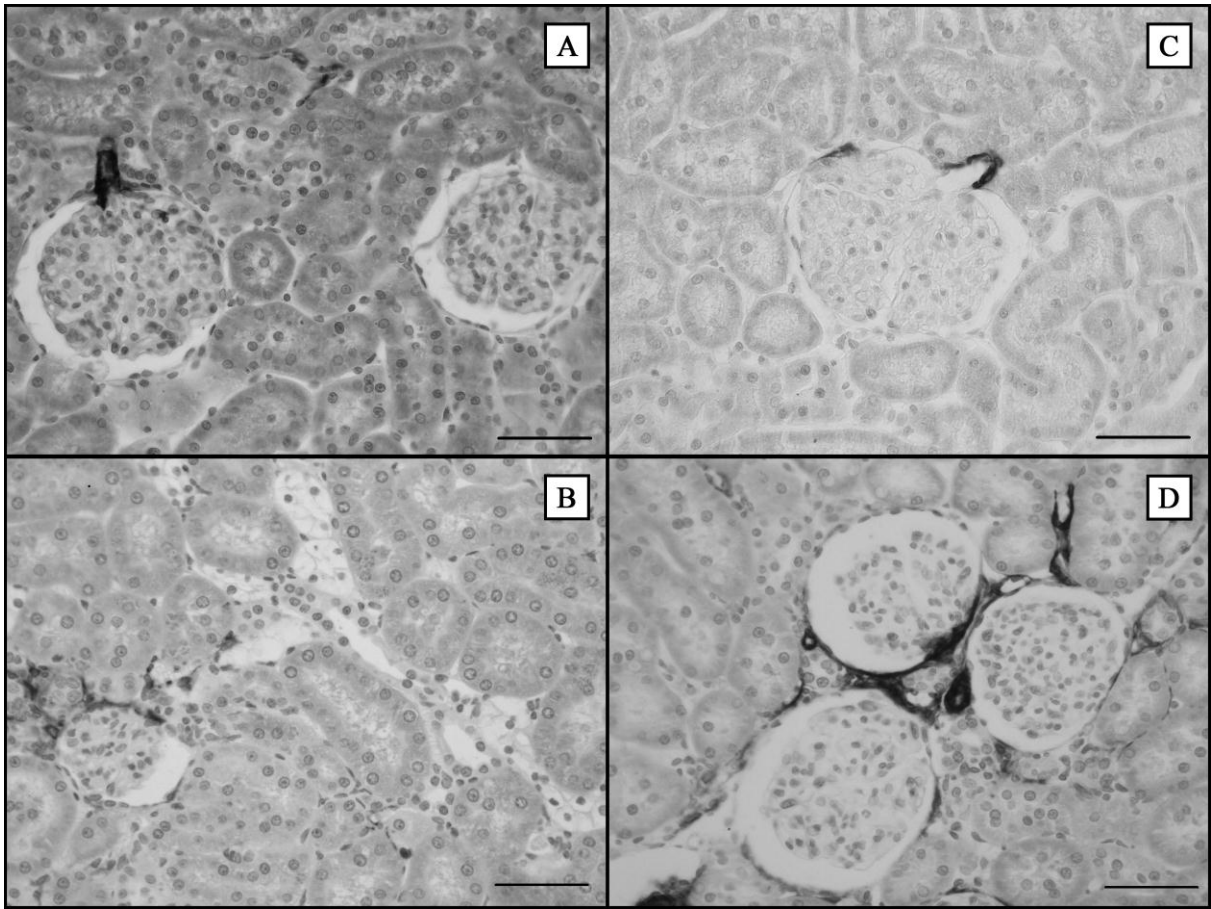


Fonte: A autora (2015).

Expressão do número de células PCNA⁺ TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=12) e G4 (Mães Diabéticas; n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; *¹ p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1); ***¹ p<0,001 (vs. Controles sem gravidez: G1); ***² p<0,001 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); ***³ p<0,001 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p < 0,05.

Quanto à marcação de α -SMA glomerular, o G4 ($0,14 \pm 0,03$) apresentou maior expressão glomerular de α -SMA do que G1 ($0,04 \pm 0,01$) e G3 ($0,01 \pm 0,00$) e uma tendência a aumento quando comparado a G2 ($0,06 \pm 0,03$) (**Figuras 20 e 21; Tabela 6**). A análise da marcação para o TBI mostrou que G2 ($0,33 \pm 0,03$) apresentou maior expressão de α -SMA do que as controles de G1 ($0,18 \pm 0,02$), assim como houve aumento da expressão desta proteína no compartimento TBI de G4 ($0,55 \pm 0,06$) quando comparado aos demais grupos (G1, G2 e G3) (**Figuras 20 e 22; Tabela 6**).

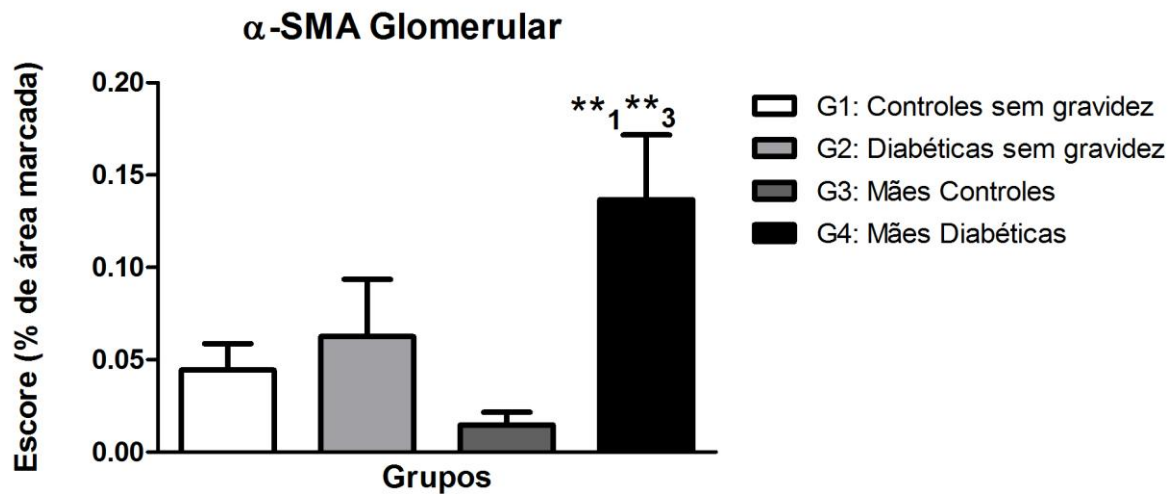
Figura 20 – Imunorreação para α -SMA no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Imunorreação para α -SMA no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez - **A**), G2 (Diabéticas sem gravidez - **B**), G3 (Mães Controles - **C**) e G4 (Mães Diabéticas - **D**). Observar maior expressão de α -SMA glomerular em G4 quando comparado a G1 e G3 e maior expressão TBI em G2 e G4. Barra = 50 μ m.

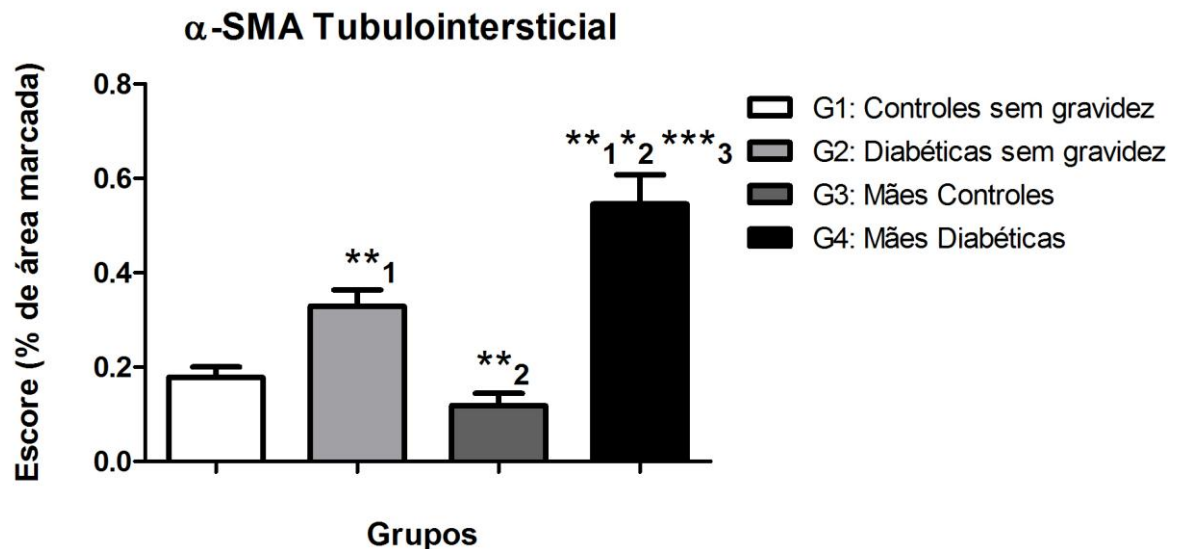
Figura 21 – Quantificação da expressão de α -SMA glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Expressão de α -SMA glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=12) e G4 (Mães Diabéticas; n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM; **1 $p < 0,01$ (vs. Controles sem gravidez: G1); **3 $p < 0,01$ (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 22 – Quantificação da expressão de α -SMA TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Expressão de α -SMA TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=12) e G4 (Mães Diabéticas; n=12). Os dados são expressos como Média \pm EPM; **1 $p < 0,01$ (vs. Controles sem gravidez: G1); **2 $p < 0,01$ (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); *2 $p < 0,05$ (vs. Diabética sem gravidez: G2); ***3 $p < 0,001$ (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 6 – Número médio de células PCNA⁺ e escore médio para α -SMA glomerular e TBI nos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

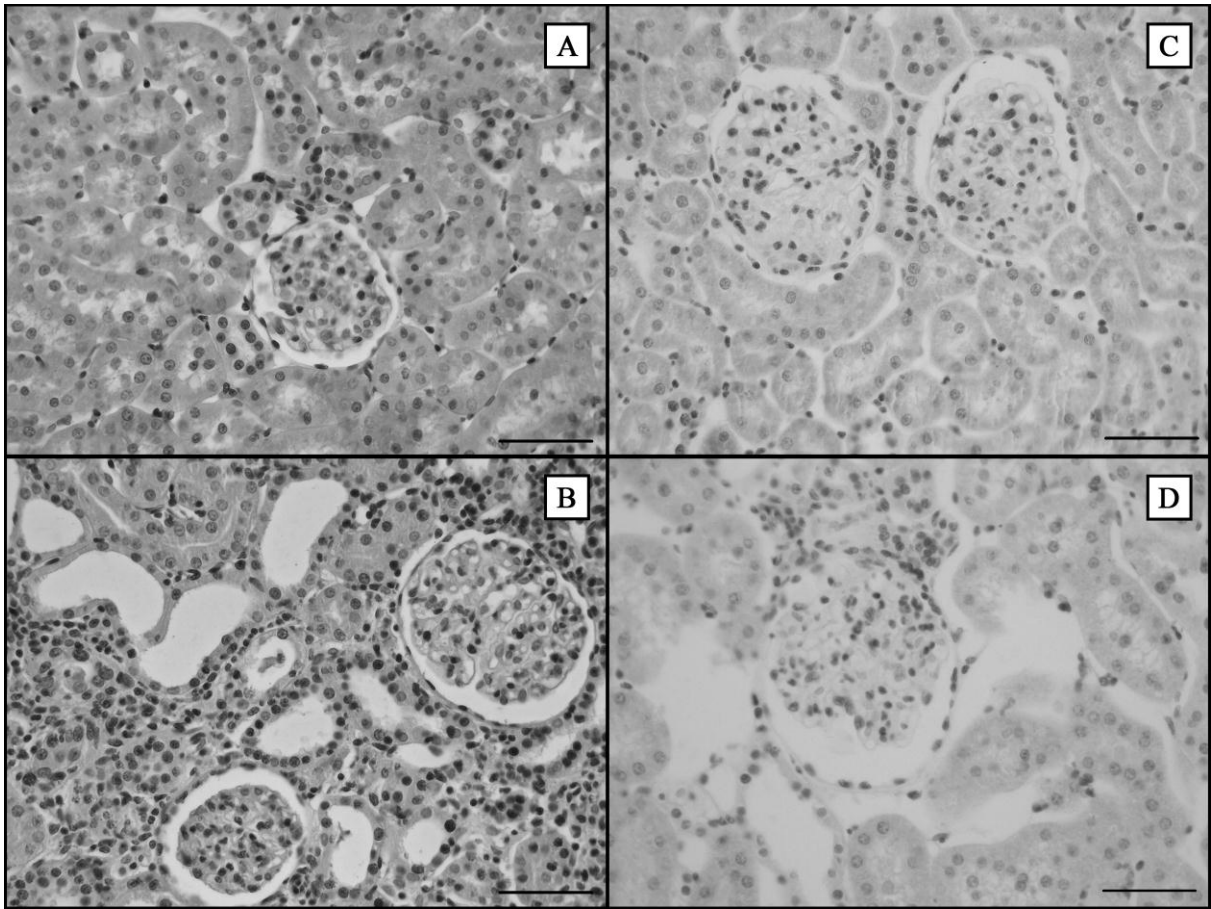
Grupos	PCNA ⁺	PCNA ⁺	α -SMA	α -SMA
	glomerular	TBI	glomerular	TBI
G1	1,13 \pm 0,07	3,31 \pm 0,40	0,04 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02
G2	1,49 \pm 0,28	4,99 \pm 0,63	0,06 \pm 0,03	0,33 \pm 0,03** ¹
G3	3,87 \pm 0,73 ** ¹ * ²	6,08 \pm 0,70* ¹	0,01 \pm 0,00	0,12 \pm 0,02** ²
G4	2,08 \pm 0,21* ³	11,50 \pm 0,74 *** ¹ *** ² *** ³	0,14 \pm 0,03** ¹ ** ³	0,55 \pm 0,06** ¹ * ² *** ³

Fonte: A autora (2015).

Número médio de células PCNA⁺ e escore médio para α -SMA glomerular e TBI dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas). Os dados são expressos como Média \pm EPM; **¹ p<0,01 (vs. Controle sem gravidez: G1); *² p<0,05 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3); *¹ p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1); ***¹ p<0,001 (vs. Controles sem gravidez: G1); ***² p<0,001 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); ***³ p<0,001 (vs. Mães Controles: G3); ***³ p<0,01 (vs. Mães Controles: G3); **² p<0,01 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p < 0,05.

A imunorreação para p-p38 revelou maior expressão desta MAPK nos glomérulos das ratas de G2 (18,39 \pm 0,46) e G3 (17,78 \pm 0,71) quando comparadas às de G1 (13,83 \pm 0,79). Já G4 (14,06 \pm 0,66) apresentou redução na expressão de células p-p38 positivas (p-p38⁺) glomerulares quando comparado a G2 e G3 (**Figuras 23 e 24; Tabela 7**).

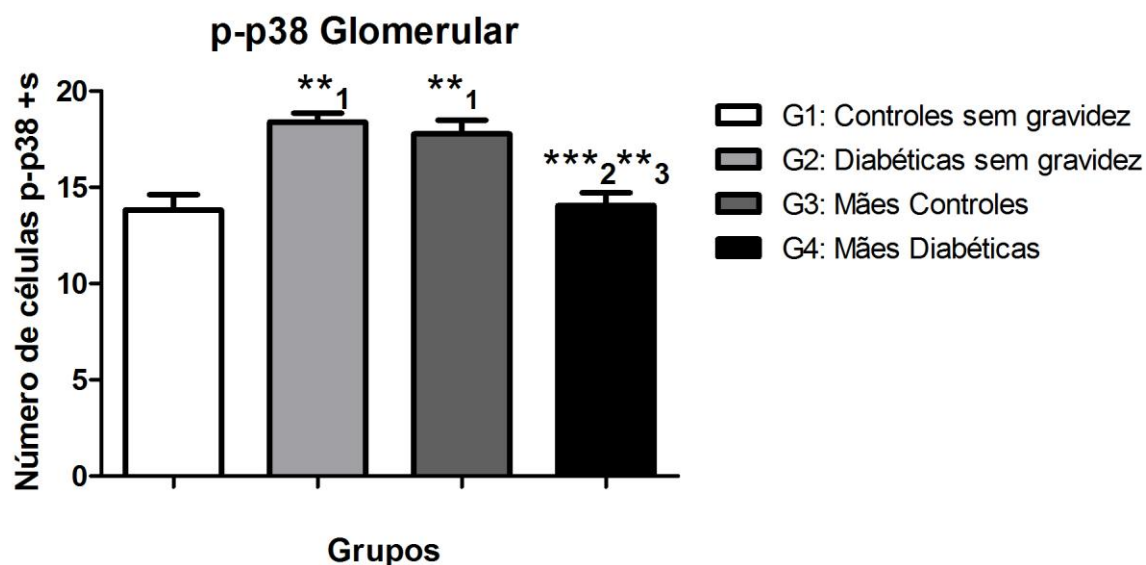
Figura 23 – Imunorreação para p-p38 no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Imunorreação para p-p38 no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez - **A**), G2 (Diabéticas sem gravidez - **B**), G3 (Mães Controles - **C**) e G4 (Mães Diabéticas - **D**). Observar maior expressão de p-p38 glomerular em G2 e G3 e menor em G4. Barra = 50 μ m.

Figura 24 – Quantificação da expressão de p-p38 glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

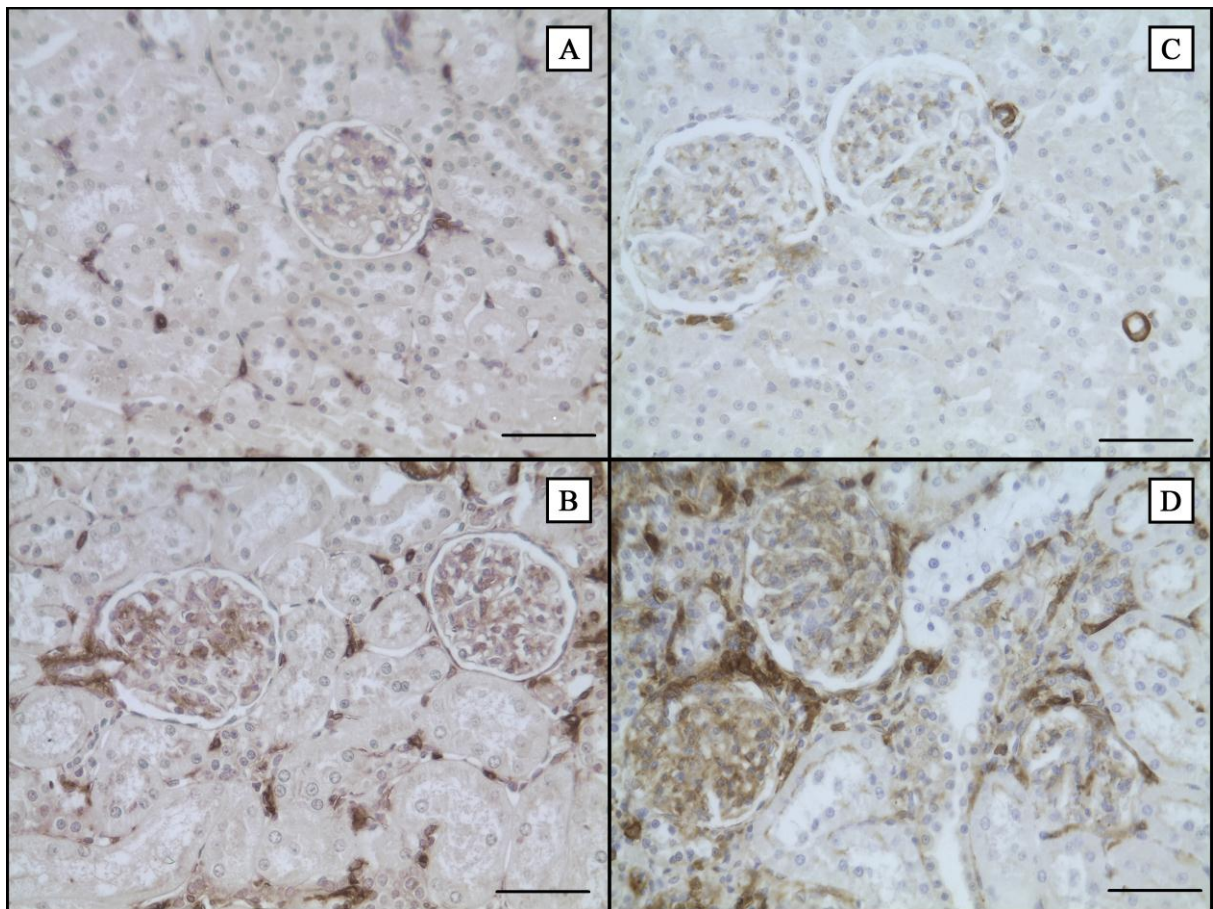


Fonte: A autora (2015).

Expressão de p-p38 glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=9) e G4 (Mães Diabéticas; n=6). Os dados são expressos como Média ± EPM; **¹ p<0,01 (vs. Controles sem gravidez: G1); ***² p<0,001 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); ***³ p<0,01 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p < 0,05.

Quanto à marcação para a MAPK p-JNK, os dados revelaram aumento da expressão glomerular dessa MAPK nos animais de G3 ($2,09 \pm 0,22$) quando comparado a G1 ($0,65 \pm 0,17$) e G2 ($0,98 \pm 0,08$). Além disso, o G4 ($2,76 \pm 0,07$) apresentou maior expressão desta MAPK quando comparado aos demais grupos (**Figuras 25 e 26; Tabela 7**). Com relação à marcação no compartimento TBI, esta imunorreação revelou aumento significativo da expressão TBI em G2 ($0,82 \pm 0,07$) quando comparada a G1 ($0,58 \pm 0,05$), assim como G4 ($1,75 \pm 0,17$) apresentou aumento significativo de p-JNK TBI em relação aos grupos G1, G2 e G3 ($1,75 \pm 0,17$) (**Figuras 25 e 27; Tabela 7**).

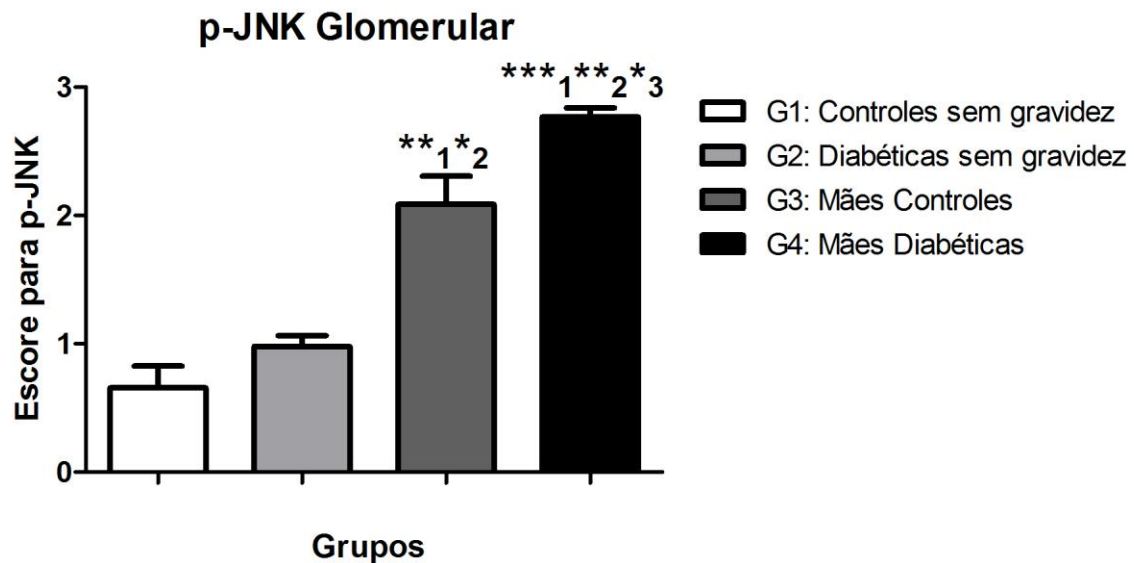
Figura 25 – Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez - **A**), G2 (Diabéticas sem gravidez - **B**), G3 (Mães Controles - **C**) e G4 (Mães Diabéticas - **D**). Observar maior expressão glomerular e tubulointerstitial de p-JNK no G4 em relação aos demais grupos. Barra = 50 μ m.

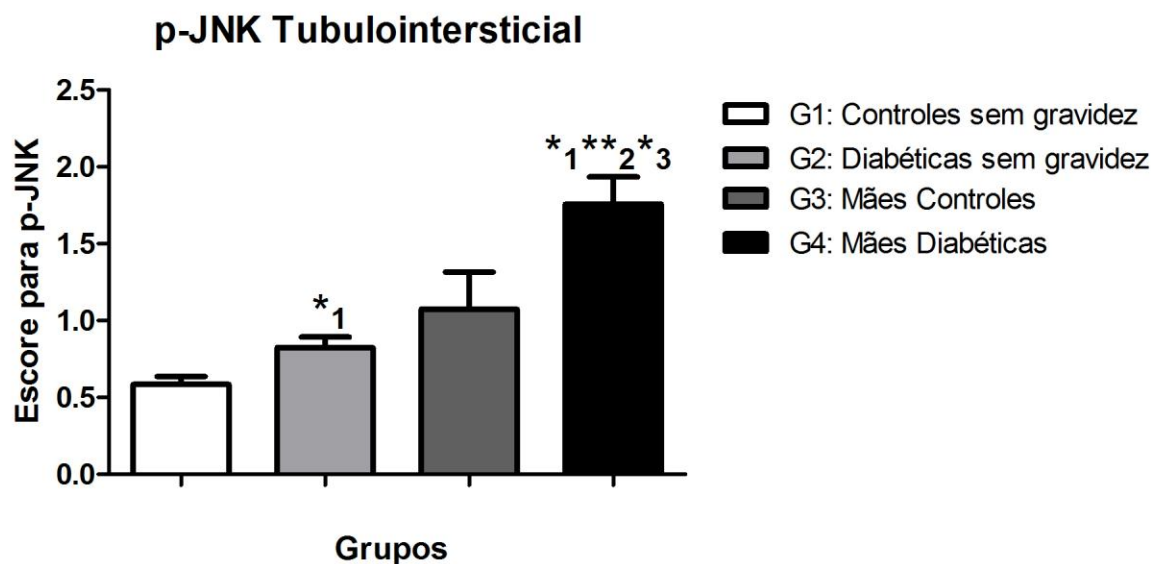
Figura 26 – Quantificação da expressão de p-JNK glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Expressão de p-JNK glomerular no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=12) e G4 (Mães Diabéticas; n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; $^{*1}p < 0,01$ (vs. Controles sem gravidez: G1); $^{*2}p < 0,05$ (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); $^{***1}p < 0,001$ (vs. Controles sem gravidez: G1); $^{**2}p < 0,01$ (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); $^{*3}p < 0,05$ (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 27 – Quantificação da expressão de p-JNK TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).



Fonte: A autora (2015).

Expressão de p-JNK TBI no córtex renal de ratas dos grupos G1 (Controles sem gravidez; n=5), G2 (Diabéticas sem gravidez; n=6), G3 (Mães Controles; n=12) e G4 (Mães Diabéticas; n=12). Os dados são expressos como Média ± EPM; *¹ p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1); **² p<0,01 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p < 0,05.

Tabela 7 – Número médio de células p-p38⁺ glomerulares e escore médio para p-JNK glomerular e TBI nos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas).

Grupos	p-p38 glomerulares	p-JNK glomerular	p-JNK TBI
G1	13,83 ± 0,79	0,65 ± 0,17	0,58 ± 0,05
G2	18,39 ± 0,46** ¹	0,98 ± 0,08	0,82 ± 0,07* ¹
G3	17,78 ± 0,71** ¹	2,09 ± 0,22** ¹ * ²	1,07 ± 0,24
G4	14,06 ± 0,66 *** ² * ³	2,76 ± 0,07*** ¹ ** ² * ³	1,75 ± 0,17* ¹ ** ² * ³

Fonte: A autora (2015).

Número médio de células p-p38⁺ glomerulares e escore médio para p-JNK glomerular e TBI dos animais dos grupos G1 (Controles sem gravidez), G2 (Diabéticas sem gravidez), G3 (Mães Controles) e G4 (Mães Diabéticas). Os dados são expressos como Média ± EPM; **¹ p<0,01 (vs. Controle sem gravidez: G1); ***² p<0,001 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); **³ p<0,01 (vs. Mães Controles: G3); *² p<0,05 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); ***¹ p<0,001 (vs. Controles sem gravidez); **² p<0,01 (vs. Diabéticas sem gravidez: G2); *³ p<0,05 (vs. Mães Controles: G3); *¹ p<0,05 (vs. Controles sem gravidez: G1) (Teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn). O nível de significância adotado foi de p < 0,05.

5 DISCUSSÃO

A STZ é uma droga amplamente utilizada como agente indutor de DM 1 por ser citotóxica para células β -pancreáticas (GROSS et al., 2003; KALENDER et al., 2002; LI; QU; BERTRAM, 2009; MATAVELLI; HUANG; SIRAGY, 2012; VOLPINI et al., 2003; YOUNG et al., 1995). Outra droga com características semelhantes é a aloxana, responsável por liberação súbita de insulina pelas células β -pancreáticas, seguida por completa supressão da resposta celular à glicose plasmática. Por conta desse efeito, experimentalmente vários animais morrem de hipoglicemia pós-indução, se não forem tratados com solução de glicose nas primeiras 24 horas (SZKUDELSKI, 2001). Nesse sentido, esta manobra teve de ser utilizada neste trabalho, pois no início a mortalidade das ratas de G2 e G4 foi bastante elevada no período pós-indução.

A aloxana é uma substância hidrofílica instável que adentra facilmente a célula β -pancreática e promove liberação de espécies reativas de oxigênio que fragmentam o DNA celular, efeito bastante parecido ao da STZ, embora esta última seja mais efetiva em induzir o DM, resultando em maior sucesso de indução (DICKINSON et al., 1991; JUNOD et al., 1967; JUNOD et al., 1969; LENZEN; PANTEN, 1988; RAMSAY; WOLVERTON; STEELE, 1994; SZKUDELSKI, 2001; TSAI et al., 1982). O nosso protocolo de indução com aloxana, embora com alta mortalidade, foi eficiente e mostrou que os animais de G2 e G4 que sobreviveram apresentaram alterações clínicas bem definidas, iniciadas 48h pós-indução, incluindo elevada ingesta hídrica (polidipsia), poliúria e valores glicêmicos acima de 400 mg/dL, que constituem sinais clássicos de DM 1, além de odor forte da urina e perda de peso. A poliúria observada em diabéticos é tradicionalmente atribuída à diurese osmótica secundária ao aumento da glicemia (glicosúria) (HOWARTH et al., 2005). A mortalidade dos animais de G2 e G4, não somente pós-indução, mas também no decorrer do protocolo experimental, está de acordo com o trabalho de Lukens, que, em extensa revisão da literatura a respeito da ação da aloxana em animais de várias espécies, mostrou índices muito variáveis de mortalidade, oscilando entre 33% e 100%, na mesma espécie (LUKENS, 1948).

O SRAA é um dos mediadores do dano renal decorrente do DM e também tem sua atividade aumentada durante a gestação para garantir as adaptações fisiológicas necessárias nesta fase. Assim, nossos resultados mostraram que houve uma tendência a redução na TFG em G4 em comparação a todos os outros grupos, mostrando que a gravidez associada ao quadro de DM 1 resulta em relativo prejuízo de função renal para as mães no período pós-

parto, quando comparado aos quadros isolados de diabetes (G2) e de gravidez (G3). Dados da literatura mostram que uma gestação sem complicações em uma mulher diabética que tem função renal normal não aumenta seu risco de desenvolver nefropatia (MODOVNIK et al., 1996), mas a filtração glomerular pode diminuir mais rapidamente naquelas gestantes que apresentam insuficiência renal crônica ou proteinúria (BIESENBACH; STÖGER; ZAZGORNİK, 1992). Em geral, após o parto, a função renal e a pressão arterial retornam aos níveis pré-gestação (GOLBERT; CAMPOS, 2008).

Existem alguns trabalhos mostrando que a gravidez pode acelerar a perda de função renal em mulheres com ND (MACKIE et al., 1996; MODOVNIK et al., 1996). No estudo de Biesenbach e colaboradores, analisando cinco mulheres com DM insulino-dependente, diagnosticadas com ND (*clearance* de creatinina < 75 mL/min) e hipertensão, houve redução da taxa média de depuração da creatinina, tanto durante a gravidez, onde houve uma diminuição de 22 mL/min, como no período pós-parto, com redução de 17 mL/min. A hipertensão agravou-se em todas as cinco mulheres durante a gravidez e todas tinham, 42 meses pós-parto, estágio final de doença renal (BIESENBACH; STÖGER; ZAZGORNİK, 1992). No trabalho de Gordon e colaboradores, a avaliação dos resultados de 29 pacientes com ND (definida como proteinúria > 400 mg em 24 horas), acompanhadas por uma média de 2,8 anos pós-parto, mostrou uma queda na depuração de creatinina maior que 10 mL/min/ano em 12 destas pacientes (GORDON et al., 1996). Algumas teorias poderiam explicar o agravamento da função renal em mulheres grávidas com ND. O aumento na TFG seria o início da lesão microvascular renal, o que eventualmente poderia levar a nefrosclerose (KITZMILLER; COMBS, 1996; MOGENSEN; CHRISTENSEN; VITTINGHUS, 1983). Além disso, o aumento na excreção de proteína, que acontece neste período, pode ter algum efeito negativo na função renal (HOU, 1999).

Neste estudo, também foram verificados os níveis pressóricos das ratas de todos os grupos por pletismografia, mas não foram encontradas diferenças significativas entre eles, mostrando que, neste modelo experimental, com o método utilizado e no intervalo de tempo estipulado para análise, a associação entre gravidez e diabetes não interferiu nos parâmetros cardiovasculares pós-parto.

A PE é uma complicação da gestação que causa morbidade de curto e longo prazo e a eclâmpsia é potencialmente letal tanto para as mulheres grávidas quanto para os recém-nascidos. A patogênese da PE/eclâmpsia permanece desconhecida por ser uma doença multifatorial (VALENZUELA et al., 2012) e os rins são usualmente o primeiro e mais severo órgão afetado (HAN et al., 2014), de modo que este órgão merece atenção particular devido à

sua importância fisiológica e às mudanças patológicas durante a gestação. Han e colaboradores realizaram biópsia renal antes e logo após o parto de mulheres com PE ou eclâmpsia e observaram uma série de alterações morfológicas (endoteliose, vacuolização dos podócitos, proliferação de células mesangiais e restos protéicos) no glomérulo renal, que foram associadas com a proteinúria. Além disso, observou-se também que a deposição de componentes do complemento e imunoglobulinas (Ig), especialmente C4 e IgM, podem contribuir para as lesões renais encontradas (HAN et al., 2014).

Um grupo de pesquisadores observou que mulheres que desenvolveram DG são reconhecidamente constituintes de um grupo de alto-risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (EHRENTHAL et al., 2014). A gravidez e o período pós-parto apresentam importantes oportunidades para os profissionais de saúde lidar com os fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardíaca futura para todas as mulheres, sendo particularmente importante em mulheres que apresentaram alguma adversidade durante a gravidez (EHRENTHAL et al., 2014). Bom atendimento pré-natal, auto-monitorização frequente da glicemia e terapia médico-nutricional estão associados a um melhor controle glicêmico e uma redução do risco de resultados adversos maternos e neonatais para as mulheres com diabetes na gravidez (ACOG, 2005). Segundo estudos, mulheres grávidas com DM apresentam maior risco de desenvolverem fetos com malformação, sendo que os recém-nascidos podem ter aumento de morbidade e comprometimento renal (CHEN et al., 2009). Nestas condições, aumenta-se de 2 a 4 vezes a probabilidade de resultados desfavoráveis durante a gravidez para a mãe e para o feto (FISCHER et al., 2004).

A gravidez não resultou em alteração na relação peso do rim total/peso do corpo das ratas de G3, no período pós-parto, quando comparada a situação controle sem gravidez (G1). Esta relação, bem como as relações pesos dos rins direito e esquerdo/peso do corpo foram significativamente maiores para as ratas de G4, quando comparadas a G1, ou seja, o diabetes juntamente com a gravidez provocou aumento do peso renal, o que também foi registrado nas ratas de G3 na relação peso do rim direito/peso do corpo, mas em menor intensidade. De acordo com os estudos desenvolvidos por van Dijk e colaboradores, foi observado que o peso corporal das ratas diabéticas não-tratadas com insulina durante e após a gravidez era menor que das controles, enquanto a concentração de glicose sanguínea e o peso do rim foram maiores. Já as ratas diabéticas tratadas apresentaram peso corporal similar às controles, mas o peso do rim foi menor do que aquele observado nas ratas diabéticas não-tratadas após o parto. Com relação ao SRAA, estes autores mostraram que a atividade da ECA plasmática foi maior nas ratas diabéticas não-tratadas quando comparadas às tratadas e controles, nos dias 17 e 18

de gestação e também 24 horas após o parto, embora a atividade da ECA cortical renal tenha sido menor no grupo não tratado. Esse estudo demonstrou ainda que as concentrações plasmáticas de Ang II nas ratas diabéticas não tratadas, no mesmo período, aumentaram mais de 2 vezes quando comparadas às controles. As ratas diabéticas não-tratadas excretaram o dobro de proteínas na urina em comparação com as ratas controles, fato que pode ser atribuído ao aumento da atividade de ECA associado ao aumento dos níveis plasmáticos de Ang II (van DIJK et al., 2001).

Apesar de não provocar mudanças no peso dos rins das ratas de G3, a gestação foi capaz de alterar a área de secção renal total destes animais, cerca de 50 dias após o parto, quando comparadas as de G1. No entanto, apesar de apresentarem maior peso renal, as ratas diabéticas no período pós-parto (G4) apresentaram menor área de secção renal transversal quando comparadas às mães controles (G3) no mesmo período. Não houve diferença quanto às áreas glomerulares e do espaço capsular entre os grupos estudados. No entanto, G3 e G4 apresentaram aumento da área de tufo glomerular em comparação com G1 e G2, mostrando que a gravidez pode ter interferido neste parâmetro. Já foi constatado que mulheres grávidas apresentam aumento de mais ou menos 50% na TFG devido ao aumento, em até 80%, do FPR, à permeabilidade da barreira de filtração (BRAMHAM; RAJASINGHAM, 2012) e à diminuição da pressão oncótica glomerular (MILNE; LINDHEIMER; DAVISON, 2002). No entanto, nossos dados mostraram que a gravidez, quando associada ao diabetes, resulta em relativo comprometimento da função renal das mães no período pós-parto, embora a área disponível para filtração possa estar aumentada e o número de glomérulos/área de secção renal transversal não ter se alterado nos grupos avaliados, mostrando que a filtração foi afetada, apesar da compensação/adaptação estrutural.

Os estudos imunohistoquímicos para células em proliferação mostraram que a gravidez (G3) pode resultar em aumento da expressão de células PCNA⁺ glomerulares em relação a G1, mas quando se encontra associada ao DM (G4) ocorre alteração neste padrão e redução de células PCNA⁺. Silveira e colaboradores também verificaram redução de células glomerulares em proliferação em ratas *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR) diabéticas quando comparadas às SHR controles (SILVEIRA et al., 2002). Portanto, neste estudo, a redução de células glomerulares em proliferação pode ser atribuída a variações da PAS que podem ter ocorrido durante a gravidez das ratas diabéticas, já que mães nestas condições estão mais propensas a aumento da PAS (GALINDO et al., 2006; REMSBERG et al., 1999).

Já no compartimento TBI, a gravidez resultou em aumento de células em proliferação, sendo que a associação entre diabetes e gestação (G4) aumentou este número de forma ainda

mais significativa quando comparado a todas as outras situações (G1, G2 e G3). Maeda e colaboradores utilizando camundongos espontaneamente diabéticos indicou que a ND está associada com a hipertrofia renal. Nos glomérulos, houve aumento no diâmetro nos estágios iniciais do diabetes e no 40º dia da doença, os camundongos apresentaram expansão do mesângio e espessamento da membrana basal glomerular. Isto sugere que glomérulos de camundongos são relativamente resistentes durante a fase aguda do DM, embora as lesões comecem desde as fases iniciais (MAEDA et al., 2003). Um estudo com cultura de células mesangiais constatou que a alta concentração de glicose estimulou a atividade de renina intracelular e a geração de Ang II, promovendo o crescimento e proliferação celular, expansão da MEC e inibindo a sua degradação (VIDOTTI et al., 2004). van Dijk e colaboradores verificaram um aumento nas concentrações de Ang II plasmáticas nas ratas grávidas diabéticas sem tratamento, demonstrando que a Ang II induz um aumento da síntese de proteínas, podendo contribuir com a hipertrofia renal e causar um aumento da pressão intraglomerular resultando em proteinúria (van DIJK et al., 2001).

A imunorreação para a α -SMA não mostrou diferença entre os grupos controles (G1 e G3) estudados, indicando que a gravidez, neste caso, não interferiu na expressão de α -SMA. No entanto, para os grupos diabéticos (G2 e G4) houve maior expressão de α -SMA glomerular e TBI, sendo estatisticamente maior em G4. Os dados obtidos para a marcação desta proteína do citoesqueleto demonstraram que a associação entre diabetes e gestação resultou em maior expressão de α -SMA cortical renal do que o quadro de diabetes isoladamente. Este aumento pode indicar uma ativação exacerbada de células mesangiais e/ou fibroblastos, que são potencialmente capazes de proliferar e produzir mais colágeno e outros componentes da MEC. Em algumas situações patológicas, a expressão dessa proteína pode aumentar no córtex renal e este aumento tem sido relacionado com a progressão da doença renal (ALPERS et al., 1992; JOHNSON et al., 1991; MAKINO et al., 1996; NARUSE et al., 1998; NARUSE et al., 1999). Os miofibroblastos são bem conhecidos por ser o principal tipo de célula responsável pela síntese de MEC e desenvolvimento de fibrose (BOUKHALFA, 1996; GABBIANI, 1992). A diferenciação de miofibroblastos é um dos principais eventos celulares iniciais que antecede o desenvolvimento da fibrose nos órgãos (GABBIANI, 1992; TANG; VAN; QI, 1997). Estas células parecem participar ativamente na reparação dos tecidos e na produção de MEC que reduz a área da superfície de filtração nos rins. Além disso, estas células contráteis são caracterizadas pela presença de feixes citoplasmáticos microfilamentosos que expressam α -SMA, uma isoforma de actina de células de músculo liso vascular (DARBY, SKALLI, GABBIANI, 1990; SKALLI et al., 1986). A infiltração

intersticial de miofibroblastos foi correlacionado fortemente com o prognóstico em muitas doenças glomerulares, e foi demonstrado que a expressão de α -SMA intersticial é um marcador do início da nefropatia membranosa (BADID et al., 1999).

A quantificação do colágeno cortical através da coloração de Picrosirius Red mostrou que a gravidez não resultou em alteração na deposição de colágeno cortical renal, quando controles com (G3) e sem (G1) gravidez são comparados. No entanto, o diabetes provocou aumento de colágeno no córtex renal das ratas de G2 e G4 quando comparadas aos seus respectivos controles (G1 e G3). Assim, a associação entre gravidez e diabetes (G4) não modificou a expressão de colágeno quando comparada ao quadro somente de diabetes (G2). A mudança fenotípica pela qual as células mesangiais podem passar tem um papel importante no acúmulo de MEC na ND e foi observada em estágios iniciais do diabetes, favorecendo a progressão da fibrose intersticial e glomerulosclerose (LI; QU; BERTRAM, 2009; MAKINO et al., 1996; PEDAGOGOS et al., 1997; YONEMOTO et al., 2006; YOUNG et al., 1995). Existe uma grande controvérsia entre os estudos em relação ao desenvolvimento e progressão da ND durante a gravidez. De acordo com Young e colaboradores, a gravidez não está associada com a progressão da ND em mulheres com função renal normal ou disfunção renal leve. No entanto, mulheres grávidas com ND têm mais complicações perinatais quando comparadas com mulheres sem esta síndrome (YOUNG et al., 2011).

Na presente investigação, embora tenha ocorrido diminuição de células PCNA⁺ no glomérulo do G4, houve aumento de células em proliferação tubulares concomitante ao aumento de α -SMA. Esses dados corroboram com o trabalho de Geleilete e colaboradores com pacientes com glomeruloesclerose segmentar e focal idiopática, a expressão de α -SMA TBI foi correlacionada com a expressão de PCNA TBI e estas alterações foram provavelmente induzidas por algumas citocinas como o TGF- β , PDGF, endotelina e Ang II (GELEILETE et al., 2001). Johnson e colaboradores mostraram que o córtex renal de ratos com glomerulonefrite continha células em proliferação que co-expressavam α -SMA. Além disso, medidas para evitar ou reduzir a proliferação celular, como depleção do complemento e de plaquetas, respectivamente, foram associadas à prevenção ou redução na marcação para α -SMA (JOHNSON et al., 1991).

A contagem do número de mastócitos/área do córtex renal não mostrou diferenças significativas entre todos os grupos estudados, evidenciando que estas células não tem participação nas alterações renais resultantes do DM induzido durante a gestação e mantido no pós-parto. Os mastócitos são células pluripotentes derivadas da medula óssea que tem um papel chave no processo inflamatório. A degranulação destas células libera vários mediadores,

incluindo citocinas inflamatórias, endotelinas, fatores de crescimento e enzimas proteolíticas. Em um estudo de revisão, notou-se que a infiltração de mastócitos pode ocorrer em doenças renais e que a densidade deste tipo celular é significativamente aumentada em pacientes diabéticos com ND (BALAKUMAR; REDDY; SINGH, 2009).

As cascatas de sinalização intracelular constituem as primeiras vias de comunicação entre a membrana plasmática e alvos regulatórios em vários compartimentos intracelulares. A ativação sequencial de quinases é um mecanismo amplamente conservado de transdução de sinais em muitos processos celulares. A transmissão de sinais extracelulares para vários alvos intracelulares é um processo multifatorial que frequentemente envolve a atividade de uma ou mais MAPKs (CASSIDY et al., 2012). Para investigarmos a participação de MAPK nas possíveis alterações renais resultantes do diabetes induzido durante a gestação e mantido no pós-parto, foram realizadas imunorreações para as MAPKs p-p38 e p-JNK para verificar o perfil de expressão destas proteínas quinases.

A imunorreação para p-p38 revelou que a gravidez aumenta a expressão desta MAPK nos glomérulos das mães controles (G3) quando comparadas a G1. O diabetes também aumentou a expressão de p-p38 nas ratas diabéticas sem gravidez (G2), mas a associação entre diabetes e gravidez (G4) provocou redução na expressão de células p-p38⁺ glomerulares quando comparado às mães controles (G3) e às ratas diabéticas (G2). É importante lembrar que a mesma alteração foi observada na imunorreação para PCNA, em que esta associação também reduziu o número de células glomerulares em proliferação, sugerindo uma relação entre a MAPK p-p38 e proliferação. Outro fato que reforça esta hipótese, é que este mesmo padrão de expressão (PCNA e p-p38 reduzidos) foi observado em rins de filhotes de mães com diabéticas (FRANÇA-SILVA; OLIVEIRA; BALBI, 2015; OLIVEIRA, 2014). Além disso, pode-se imaginar que há alteração na expressão de AT1R e AT2R no período pós-parto, com aumento de AT2R, como ocorre na gestação, e isto resultaria em redução da proliferação e da marcação para p-p38. A partir de um modelo experimental de diabetes induzido por STZ utilizando ratos Wistar adultos, Komers e colaboradores observaram superexpressão de p-p38 nos túbulos distais e glomérulos em estágios iniciais e finais de ND, o que foi diminuído pelo tratamento com insulina e controle metabólico (KOMERS et al., 2007). Foi demonstrado que a inibição da MAPK p-p38 em doenças renais auto-imunes reduz a severidade da doença (IWATA et al., 2003). Essa proteção contra o dano renal *in vivo* é resultado da redução da infiltração de leucócitos, diminuição da expressão de citocinas que são conhecidas por promover o dano renal e redução da produção de Ig, levando à conclusão que a ativação da MAPK p38 é requerida para promover a produção de citocinas/quimiocinas

e Ig, que resultam em injúria renal auto-imune. Em um modelo de inflamação renal aguda, foram encontrados componentes da via da p38 em células endoteliais, neutrófilos que infiltraram e em podócitos, assim como em glomerulonefrites pós-infecção (STAMBE et al., 2003). O bloqueio da via da p38 diminuiu significativamente a falência renal aguda, bem como a proteinúria, sugerindo uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de inflamação renal aguda (CASSIDY et al., 2012).

Quanto à marcação para a MAPK p-JNK, os dados revelaram que a gravidez (G3) aumentou a expressão glomerular dessa MAPK quando comparada aos controles sem gravidez (G1), mas quando associada ao diabetes (G4), a expressão de p-JNK foi ainda maior. Já a reação para p-JNK no compartimento TBI mostrou que o diabetes (G2 e G4) aumenta a expressão de p-JNK, com aumento ainda maior quando em associação a gestação (G4). A literatura mostra que a administração de inibidores de JNK previamente à isquemia/reperfusão previne o dano tubular e a disfunção renal, sugerindo o envolvimento da ativação de JNK tanto na rejeição celular, quanto na necrose tubular aguda (KANELLIS et al., 2010). Dessa forma, nossos dados indicam que os danos renais observados no grupo de diabetes associado à gravidez (G4) possam estar relacionados também à super ativação dessa via de sinalização de MAPK.

Embora muitos estudos a respeito do DM 1 e suas consequências tenham sido realizados, a literatura ainda é escassa a respeito das alterações renais que podem acometer mulheres com diabetes desenvolvido durante a gestação e mantido no período pós-parto.

6 CONCLUSÃO

O DM 1 induzido durante a gestação e mantido no período pós-parto causou hipertrofia cortical associada à maior atração de fibroblastos/miofibroblastos, que aumentam a deposição de proteínas de MEC, principalmente colágeno, prejudicando a TFG. Adicionalmente, a superexpressão da via de sinalização das MAPKs em associação às alterações acima descritas pode ter papel importante nos danos renais observados na presente investigação.

REFERÊNCIAS

- ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. Number 60, March 2005. Pregestational Diabetes Mellitus. **Obstet Gynecol**, New York, v. 105, n. 3, p. 675-685, 2005.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. Colaboração de Ana Maria de Lauro Castrucci et al. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 1032-1050.
- ALPERS, C. E. et al. Developmental patterns of PDGF B chain, PDGF receptor and α -actin expression in human glomerulogenesis. **Kidney Int.**, Malden, v. 42, p. 390-399, 1992.
- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, New York, v. 31, suppl. 1, Janeiro, 2008.
- American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes – 2013. **Diabetes Care**, New York, v. 36, suppl. 1, p. 11-66, 2013.
- ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **J. Manag. Care Pharm.**, Alexandria, v. 13, n. 8, p. S9-S20, 2007.
- AUGUST, P.; SEALY, J. E. The renin-angiotensin system in normal and hypertensive pregnancy and in ovarian function. In: LARAGH, J. H.; BRENNER, B. M. (Eds.). **Hypertension: Pathology, Diagnosis and Management**. New York: Raven Press, 1990, p.1761-78.
- BADID, C. Interstitial alpha-smooth muscle actin: a prognostic marker in membranous nephropathy. **Clin. Nephrol.**, München-Deisenhofen, v. 52, n. 4, p. 210-217, 1999.
- BALAKUMAR, P.; REDDY, J.; SINGH, M. Do resident renal mast cells play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy? **Mol. Cell. Biochem.**, [S.l.], v. 330, p. 187-192, 2009.
- BALBI, A. P. C. et al. Mitogenic-activated protein kinase and angiotensin II receptor in kidney of newborn rats from losartan-treated dams. **Pediatr. Nephrol.**, Berlin, v. 23, p. 1433-1444, 2008.
- BERHANE, A. M. et al. Albuminuria and estimated glomerular filtration rate as predictors of diabetic end-stage renal disease en death. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, Washington, v. 6, n. 10, p. 2444-2451, 2011.
- BERMAN, J; RIFKIN, H. Unilateral nodular diabetic glomerulosclerosis (Kimmelsteil-Wilson): report of a case. **Metabolism. Clin. Exp.**, Philadelphia, v. 22, p. 715-722, 1973.
- BIANCHI, V. et al. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood**, New York, n. 100, p.710–713, 2002.

- BIESENBACH, G. et al. How pregnancy influences renal function in nephropathic type 1 diabetic women depends on their pre-conceptional creatinine clearance. **J. Nephrol.**, Rome, v. 12, p. 41-46, 1999.
- BIESENBACH, G., STOGER, H., ZAZGORNIAK, J. Influence of pregnancy on progression of diabetic nephropathy and subsequent requirement of renal replacement therapy in female type 1 diabetic patients with impaired renal function. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v. 7, p. 105-109, 1992.
- BOKEMEYER, D.; SOROKIN, A.; DUNN, M. J. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. **Kidney Int.**, New York, v. 49, p. 1187 - 1198, 1996.
- BOMBRYIS, A. E. et al. Expectant management of severe preeclampsia at less than 27 weeks' gestation: maternal and perinatal outcomes according to gestational age by weeks at onset of expectant management. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 199, p. 247–252, 2008.
- BRAMHAM, K.; RAJASINGHAM, D. Pregnancy in diabetes and kidney disease. **J. Ren. Care.**, Paris, v. 38, n. 1, p. 78-89, 2012.
- BREZNICEANU, M. L. et al. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. **Diabetes**, New York, v. 57, p. 451–459, 2008.
- CASSIDY, H. et al. The role of MAPK in drug-induced kidney injury. **J. Signal Transduct.**, New York, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- CATALANO, P. M. et al. The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes. **Diabetes Care**, Alexandria, n. 35, p. 780–786, 2012.
- CELIS, J. E.; CELIS, A. Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 82, p. 3262-3266, 1985.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, London, v. 410, n. 6824, p. 37-40, 2001.
- CHAPMAN, A. B. et al. Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. **Kidney Int.**, New York, v. 54, p. 2056-2063, 1998.
- CHEN, Y.W. et al. Maternal diabetes programs hypertension and kidney injury in offspring. **Pediatr. Nephrol.**, Berlin, v. 25, p. 1319-1329, 2010.
- COBAS, R. A. et al. The cost of type 1 diabetes: a nationwide multicentre study in Brazil. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 91, n. 6, 2013.
- CONRAD, K. P. et al. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. **FASEB J.**, Bethesda, n. 7, v. 29, p. 566–571, 1993.

CONRAD, K. P.; VERNIER, V. A. Plasma levels, urinary excretion and metabolic production of cGMP during gestation in rats. **Am. J. Physiol.**, Washington, n. 257, v. 30, p. R847-R853, 1989.

COOPER, W. O. et al. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 354, p. 2443–2451, 2006.

CROWLEY, S.D.; COFFMAN, T.M. Recent advances involving the renin-angiotensin system. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 318, n. 9, p. 1049-1056, 2012.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 63, n. 21–29, 1990.

DE BORST, M. H. et al. Glomerular and tubular induction of the transcription factor c-Jun in human renal disease. **J.Pathol.**, London, v. 213, n. 2, p. 219-228, 2007.

DENG, A.; ENGELS, K.; BAYLIS, C. Impact of nitric oxide deficiency on blood pressure and glomerular hemodynamic adaptations to pregnancy in the rat. **Kidney Int.**, New York, n. 50, v. 4, p. 1132–1138, 1996.

DICKINSON, J. E. et al. Streptozocin-induced diabetes mellitus in the pregnant ewe. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, n. 165, p. 1673–1677, 1991.

EDDY, A.A. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v.7, p. 2495-2508, 1996.

EHRENTHAL, D. B. et al. Postpartum healthcare after gestational diabetes and hypertension. **J. Womens Health (Larchmt)**, Larchmont, v. 23, n. 9, p. 760-764, 2014.

EPSTEIN, F. H. Pregnancy and renal disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 335, p. 277–278, 1996.

ERMAN, A. et al. Angiotensin converting enzyme activity in the serum, lung and kidney of diabetic rats. **Eur. J. Clin. Investig.**, Oxford, v. 23, p.615-620, 1993.

ESSAWY, M. et al. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 43-50, 1997.

FISCHER, M. J. et al. Kidney disease is an independent risk factor for adverse fetal and maternal outcomes in pregnancy. **Am. J. Kidney Dis.**, New York, v. 43, p. 415–423, 2004.

FLANC, R. S. et al. A pathogenic role for JNK signaling in experimental anti-GBM glomerulonephritis. **Kidney Int.**, New York, v. 72, n. 6, p. 698-708, 2007.

FRANÇA-SILVA, N.; OLIVEIRA, N. D. G.; BALBI, A. P. C. Morphofunctional renal alterations in rats induced by intrauterine hyperglycemic environment. **Arch. Med. Sci.**, Poznań, 2014 (artigo aceito para publicação). doi: 10.5114/aoms.2015.48220

GABBIANI, G. The biology of the myofibroblast. **Kidney Int.**, New York, v. 41, n. 3, p. 530–532, 1992.

GALINDO, A. et al. Outcome of fetuses in women with pregestational diabetes mellitus. **J. Perinat Med.**, Berlin, v. 34, p. 323-331, 2006.

GALLERY, E. D.; BROWN, M. A. Volume homeostasis in normal and hypertensive human pregnancy. **Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.**, London, v.1, p. 835-851, 1987.

GELEILETE, T. J. M. et al. α -Smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen expression in focal segmental glomerulosclerosis: functional and structural parameters of renal disease progression. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 985-991, 2001.

GOLBERT, A.; CAMPOS, M. A. A. Diabetes melito tipo 1 e gestação. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 307-314, 2008.

GORDON, M. et al. Perinatal outcome and long-term follow-up associated with modern management of diabetic nephropathy. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 87, p. 401-409, 1996.

GOTO, M. et al. Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. **Hypertension**, Dallas, v. 30, p. 358–362, 1997.

GRACIANO, M.L.; NORONHA, I.L. Peptídeos vasoativos e o rim. In: RIELLA, M.C. (ORG.). **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010. p. 70-95.

GRAF, H.; CLAPAUCH, R.; LYRA, R. **Programa de Atualização em Endocrinologia e Metabologia**. Porto Alegre: Artmed/Panamericana Editora, 2009.

GROSS, M. L. et al. Renal damage in the SHR/N-cp type 2 diabetes model: Comparision of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and endothelin receptor blocker. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 83, n. 9, p. 1267-1277, 2003.

Grupo Español de Diabetes y Embarazo (GEDE). Guía Asistencia “Diabetes Mellitus y Embarazo”. **Av Diabetol.**, [S.l.], v. 22, p. 73-87, 2006.

HALL, P. A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: the index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **J. Pathol.**, London v. 162, p. 285-294, 1990.

HAN, L. et al. Antepartum or immediate postpartum renal biopsies in preeclampsia/eclampsia of pregnancy; new morphologic and clinical findings. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, Madison, v. 7, n. 8, p. 5129-5143, 2014.

HNAT, M. D. Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparas. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 186, p. 422–426, 2008.

HOOGWERF, B. J. Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 105, n. 1, p. 30A-35A, 2010.

HOU, S. Pregnancy in chronic renal insufficiency and end-stage renal disease. **Am. J. Kidney Dis.**, New York, v. 33, p. 235–252, 1999.

HOWARTH, F. C. et al. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. **Exp. Physiol.**, New York, v. 90, n. 6, p. 827-835, 2005.

HOWIE, A. J. et al. Measurement of proliferation in renal biopsy specimens: Evidence of subclinical tubular damage in the nephrotic syndrome. **Nephrol. Dial. Transplant.**, New York, v. 10, p. 2212-2218, 1995.

HYTTEN, F. E.; PAINTIN, D.B. Increase in plasma volume during normal pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynaecol.**, St. Louis, v. 70, p. 402-407, 1963.

IRFAN, S. et al. Effect of pregnancy on diabetic nephropathy and retinopathy. **J Coll. Physicians Surg. Pak.**, Karachi, v. 14, n. 2, p. 75-78, 2004.

IWATA, Y. et al. p38 mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Faslpr mice. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2003.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, New York, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.

JOHNSON, R.J. et al. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 87, p. 847-858, 1991.

JONES, D. C. et al. Outcome of pregnancy in women with moderate or severe renal insufficiency. **N. Eng. J. Med.**, Boston, v. 335, n. 4, p. 226-232, 1996.

JUNOD, A. et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J. Clin. Invest.**, New York, n. 48, p. 2129–2139, 1969.

JUNOD, A. et al. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, n. 126, p. 201–205, 1967.

KAGAMI, S. Involvement of glomerular renin-angiotensin system (RAS) activation in the development and progression of glomerular injury. **Clin. Exp. Nephrol.**, Tokyo, v. 16, p. 214-220, 2012.

KALENDER, B. et al. Renoprotective effects of valsartan and enalapril in STZ-induced diabetes in rats. **Acta Histochem.**, Germany, v. 104, n. 2, p. 123-130, 2002.

KANELIS, J. et al. JNK signaling in human and experimental renal ischaemia/reperfusion injury. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 2898-2908, 2010.

KIM, S. et al. Angiotensin blockade inhibits activation of mitogen-activated protein kinases in rat balloon-injured artery. **Circulation**, Dallas, v. 97, p. 1731-1737, 1998.

KIRSZTAJN, G. M. **Diagnóstico laboratorial em nefrologia**. São Paulo: Sarvier, 2010.

KITZMILLER, J.L.; COMBS, C.A. Diabetic nephropathy and pregnancy. **Obst. Gynecol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 23, p. 173-203, 1996.

KLIEM, V. et al. Mechanism involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney Int.**, Malden, v. 49, p. 666-678, 1996.

KOMERS, R. et al. Renal p-38 MAP kinase activity in experimental diabetes. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 87, n. 6, p. 548-58, 2007.

KUBO, T. et al. Mitogen protein kinase activity regulation role of angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. **Europ. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 411, p. 27-34, 2001.

LEEHY, D. J. et al. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, Malden, v. 58, n. 77, p. S93-S98, 2000.

LENZEN, S., PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, New York, n. 31, p. 337-342, 1988.

LEWIS, E. J. et al. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy: the Collaborative Study Group. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 329, p. 1456-1462, 1993.

LI, J.; QU, X.; BERTRAM, J.F. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 175, n. 4, p. 1380-1388, 2009.

LIM, A. K. H.; TESCH, G. H. Inflammation in diabetic nephropathy. **Mediators Inflamm.**, Oxford, p. 1-12, 2012.

LINDHEIMER, M. D.; DAVISON, J. M.; KATZ, A. I. The kidney and hypertension in pregnancy: Twenty exciting years. **Semin. Nephrol.**, New York, v. 21, p. 173-189, 2001.

LIU, F. et al. Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 19, p. 269-280, 2008.

LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, [S.I.], v. 28, n. 3, p. 304-30, 1948.

LYRA, R.; CAVALCANTI, N. **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Sanofi Aventis, 2005.

MA, F. Y. et al. A pathogenic role for c-Jun amino-terminal kinase signaling in renal fibrosis and tubular cell apoptosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 18, n. 2, p. 472-484, 2007.

MA, F. Y.; LIU, J.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 29-37, 2009.

MACKIE, A. D. R. et al. Outcome of pregnancy in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and nephropathy with moderate renal impairment. **Diabet. Med.**, Oxford, v. 13, p. 90-96, 1996.

MAEDA, M. et al. Renal lesions in spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus in the nonobese diabetic mouse: acute phase of diabetes. **Vet. Pathol.**, New York, v. 40, n. 2, p. 187-195, 2003.

MAKINO, H. et al. Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. **Diabetes**, New York, v. 45, n. 4, p. 488-495, 1996.

MÄNNISTÖ, T. et al. Elevated blood pressure in pregnancy and subsequent chronic disease risk. **Circulation**, Dallas, v. 127, p. 681-690, 2013.

MARQUEZ, M. G. et al. Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. **Anat. Embryol.**, Berlin, n. 205, v. 5-6, p. 431-40, 2002.

MATAVELLI, L.C.; HUANG, J.; SIRAGY, H.M. Combined aliskiren and amlodipine reduce albuminuria via reduction in renal inflammation in diabetic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 59, n. 3, p. 281-287, 2012.

MATHIESEN, E. R. et al. Randomised controlled trial of long term efficacy of captopril on preservation of kidney function in normotensive patients with insulin dependent diabetes and microalbuminuria. **BMJ**, London, v. 319, p. 24-25, 1999.

MAUER, S.M. et al. The effects of Goldblatt hypertension on development of the glomerular lesion of diabetes mellitus in the rat. **Diabetes**, New York, v. 27, p. 738-744, 1978.

MILNE J. E.; LINDHEIMER M. D.; DAVISON J. M. Glomerular heteroporous membrane modeling in third trimester and postpartum before and during amino acid infusion. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 282, p. F170-F175, 2002.

MIODOVNIK, M. et al. Does pregnancy increase the risk for development and progression of diabetic nephropathy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v. 174, p. 1180-1189, 1996.

MOGENSEN, C.E.; ANDERSEN, M.J.F. Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin treatment. **Diabetologia**, New York, v. 11, p. 221-224, 1975.

MOGENSEN, C. E.; CHRISTENSEN, C. K.; VITTINGHUS, E. The stages in diabetic renal disease: with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. **Diabetes**, New York, v. 32, n. Supplement 2, p. 64-78, 1983.

NARUSE, K. et al. Mesangial cell activation in the collagenofibrotic glomerulonephropathy: case report and review of the literature. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 433, p. 183-188, 1998.

NARUSE, K. et al. CD34 expression as a novel marker of transformed mesangial cells in biopsied glomerular diseases. **J. Pathol.**, Sussex, v. 189, p. 105-111, 1999.

NEVIS, I. F. et al. Pregnancy outcomes in women with chronic kidney disease: a systematic review. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, Washington, v. 6, p. 2587-2598, 2011.

NIELSEN, L. R.; DAMM, P.; MATHIESEN, E. R. Improved pregnancy outcome in type 1 diabetic women with microalbuminuria or diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, New York, n. 32, p.38–44, 2009.

O'DONNELL, M. P et al. Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. **FASEB J.**, Bethesda, v. 2, n. 8, p. 2339-2347, 1998.

OLIVEIRA, N. D. G. **Repercussões do diabetes materno sobre a expressão de MAPK no córtex renal de ratos Wistar**. 63f. 2014. Trabalho de conclusão de curso (Área de Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

OLUGBENGA, E. et al. Diabetic nephropathy: a review of the natural history, burden, risk factors and treatment. **J. Natl. Med. Assoc.**, Washington, v. 96, n. 11, p. 1445-1454, 2004.

ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway activation and function. **Cell. Signal.**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2000.

PASCOAL, I. F. Hipertensão e gravidez. **Revista brasileira de hipertensão**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 256-261, 2002.

PATIL, C. S.; KIRKWOOD, K. L. p38 MAPK signaling in oral-related diseases. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 86, n. 9, p. 812-825, 2007.

PEARSON, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 22, n. 2, p. 153, 183, 2001.

PEDAGOGOS, E. et al. Myofibroblasts and arteriolar sclerosis in human diabetic nephropathy. **Am. J. Kidney Dis.**, Philadelphia, v. 29, n. 6, p. 912-918, 1997.

POMBO, C. M. et al. The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 42, p. 26546-26551, 1994.

PURDY, L. P. et al. Effect of pregnancy on renal function in patients with moderate to severe diabetic renal insufficiency. **Diabetes Care**, New York, v. 19, n. 10, p. 1067-1074, 1996.

RAMSAY, T. G.; WOLVERTON, C. K.; STEELE, N. C. Alteration in IGF-I mRNA content of fetal swine tissues in response to maternal diabetes. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, n. 267, p. R1391–R1396, 1994.

RAPARIA, K; USMAN, I; KANWAR, Y. S. Renal morphologic lesions reminiscent of diabetic nephropathy. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northfield, v. 137, n. 3, p. 351-359, 2013.

REECE, E. A.; COUSTAN, E. R.; HAYSLETT, J. P. Diabetic nephropathy: pregnancy performance and fetomaternal outcome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v. 59, p. 56-66, 1988.

REMSBERG, K. et al. Diabetes in pregnancy and caesarean delivery. **Diabetes Care**, New York, v. 22, p. 1561-1567, 1999.

REMUZZI, A. et al. Short- and long-term effect of angiotensin II receptor blockade in rats with experimental diabetes. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Hagerstown, v. 4, n. 1, p. 40-49, 1993.

REUBI, F. C. Glomerular filtration rate, renal blood flow, and blood viscosity during and after diabetic coma. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 1, p. 410-413, 1953.

RIELLA, M. C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010, 1247p.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 68, n. 2, p. 320-344, 2004.

SACKS, D. B. The role of scaffold proteins in MEK/ERK signaling. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 34, n. 5, p. 833-836, 2006.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 19, n. 4, p. 2435-2444, 1999.

SHLIPAK, M. Diabetic nephropathy: preventing progression. **Clin. Evid.**, London, p. 1-18, 2010.

SHOTAN, A. et al. Risks of angiotensin-converting enzyme inhibition during pregnancy: experimental and clinical evidence, potential mechanisms, and recommendations for use. **Am. J. Med.**, New York, v. 96, p. 451-456, 1994.

SIBAI, B. M.; RAMADAN, M. K. Acute renal failure in pregnancies complicated by hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 168, n. 6 Pt 1, p. 1682-1690, 1993.

SILVEIRA, L. A. et al. The genetics of hypertension modifies the renal cell replication response induced by experimental diabetes. **Diabetes**, New York, v. 51, n. 5, p. 1529-1534, 2002.

SINGH, R. Pregnancy in women with diabetic nephropathy. **Clinical Queries: Nephrology**, India, v. 1, p. 168-171, 2012.

SINGH, R. et al. Mechanism of increased angiotensin II levels in glomerular mesangial cells cultured in high glucose. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 14, n. 4, p. 873-80, 2003.

SINGH, R. et al. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. **Diabetes**, New York, v. 48, n. 10, p. 2066-2073, 1999.

SKALLI, O. et al. A monoclonal antibody against α -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. **J. Cell Biol.**, New York, v. 103, n. 6 Pt 2, p. 2787-2796, 1986.

SKINNER, S. The renin system in fertility and normal human pregnancy. In: ROBERTSON, J. I. S.; NICOLLS, M. G. (Eds.): **The Renin-Angiotensin System**. London: Gower Medical Publishing, 1993, p. 1-16.

SPITZ B., et al. Prostacyclin in pregnancy. **Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, n. 18, v. 5-6, p. 303-308, 1984.

STAMBE, C. et al. Blockade of p38alpha MAPK ameliorates acute inflammatory renal injury in rat anti-GBM glomerulonephritis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 14, n. 2, p. 338-351, 2003.

STEFFES, M. W.; BROWN, D. M.; MAUER, S. M. Diabetic glomerulopathy following unilateral nephrectomy in the rat. **Diabetes**, New York, v. 27, p. 35-41, 1978.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, Praha, v. 50, p. 536-546, 2001.

TANG, W. W. et al. Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubule interstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v.148, p. 1169-1180, 1996.

TAYLOR, R.; DAVISON, J. M. Type 1 diabetes and pregnancy. **BMJ**, London, v. 334, p. 742-745, 2007.

TOBOSO, R. P. Q.; BENÍTEZ, G. A.; ROMERO, F. B. Protocolo de actuación en la diabetes Gestacional. **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, [S.l], v.11, p. 17-22, 2012.

TRAMONTI, G.; KANWAR, Y. S. Review and discussion of tubular biomarkers in the diagnosis and management of diabetic nephropathy. **Endocrine**, Houndsmills, 2012.

TSAI, M. Y. et al. Disturbance of pulmonary prostaglandin metabolism in fetuses of alloxan-diabetic rabbits. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, n. 712, p. 395-399, 1982.

VALENZUELA, F. J. Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. **J. Pregnancy**, Barcelona, v. 2012. p. 1-8, 2012.

van DIJK, D. J. et al. Increased serum angiotensin converting enzyme activity in type I insulin dependent diabetes mellitus: Its relation to metabolic control and diabetic complications. **Eur. J. Clin. Investig.**, Oxford, v. 24, p. 463-7, 1994.

van DIJK, D. J. et al. Increased serum angiotensin-converting enzyme activity and plasma angiotensin II levels during pregnancy and postpartum in the diabetic rat. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, England, v. 2, n. 3, p. 193-198, 2001.

VIDOTTI, D. B. et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **Am. J. Physiol. – Renal Physiol.**, Bethesda, v. 286, p. 1039-1045, 2004.

VOLPINI, R. A. et al. Effect of enalapril and losartan on the events that precede diabetic nephropathy in rats. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 43-51, 2003.

WEINER C. P. et al. Introduction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 91, p. 5212-5216, 1994.

WIDMANN, C. et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol. Rev.**, Washington, v. 79, n. 1, p. 143-180, 1999.

WOLF, G. et al. Angiotensin II induced proliferation of cultured murine mesangial cells: inhibitory role of atrial natriuretic peptide. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 3, p. 1270-1278, 1992.

XIA, Z. et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, New York, v. 270, n. 5240, p. 1326-1331, 1995.

YAN, J. et al. Long-term effects of maternal diabetes on blood pressure and renal function in rat male offspring. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e88269, 2014.

YONEMOTO, S. et al. Correlations of tissue macrophages and cytoskeletal protein expression with renal fibrosis in patients with diabetes mellitus. **Clin. Exp. Nephrol.**, Tokyo, v. 10, p. 186-192, 2006.

YOSYPYV, I.V. Renin-angiotensin system-growth factor cross-talk: a novel mechanism for ureteric bud morphogenesis. **Pediatr. Nephrol.**, Berlin, v. 24, n. 6, 2009.

YOUNG, B. A. et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, New York, v. 47, p. 935-944, 1995.

YOUNG, E. C. et al. Effects of pregnancy on the onset and progression of diabetic nephropathy and diabetic nephropathy on pregnancy outcomes. **Diabetes Metab. Syndr.**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 137-142, 2011.

ZATZ, R. et al. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 77, p. 1925-1930, 1986.

ZATZ, R. **Série fisiopatologia clínica: fisiologia renal**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

ZHANG, G.; MOORHEAD, P. J.; EL NAHAS, A. M. Myofibroblasts and progression of experimental glomerulonephritis. **Exp. Nephrol.**, Basel, v. 3, p. 308-318, 1995.

ZHANG, J.; SHEN, B.; LIN, A. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 286-295, 2007.

ANEXO A
Protocolo do CEUA/UFU: 056/14



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VolP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 151/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 056/14

Projeto Pesquisa: "Análise dos efeitos renais em longo prazo do diabetes em ratas Wistar no período pós-parto"

Pesquisador Responsável: Ana Paula Coelho Balbi.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 13 de outubro de 2014

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU