

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

NATASHA MARQUES CASSANI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MASTÓCITOS RENAIIS E
CARDÍACOS NA PROLE DE RATAS WISTAR DIABÉTICAS E OS
EFEITOS DO TRATAMENTO COM CROMOGLICATO**

UBERLÂNDIA - MG

2019

NATASHA MARQUES CASSANI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MASTÓCITOS RENAIIS E
CARDÍACOS NA PROLE DE RATAS WISTAR DIABÉTICAS E OS
EFEITOS DO TRATAMENTO COM CROMOGLICATO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Biomedicina, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

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

Uberlândia - MG

Julho/2019

NATASHA MARQUES CASSANI

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MASTÓCITOS RENAIIS E
CARDÍACOS NA PROLE DE RATAS WISTAR DIABÉTICAS E OS
EFEITOS DO TRATAMENTO COM CROMOGLICATO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Biomedicina, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Aprovada em __ / __ / __

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Coelho Balbi
Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM-UFU

Dr^a Simone Ramos Deconte
Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM-UFU

Prof. Dr. Roberto Bernardino Júnior
Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM-UFU

UBERLÂNDIA - MG

Julho/2019

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia, resultante da falta de insulina (tipo 1) ou da resistência periférica do organismo a este hormônio (tipo 2). Durante a gestação, além de complicações maternas, esta síndrome pode resultar em nefrogênese prejudicada, entre outros distúrbios, na prole. Os mastócitos são células envolvidas na modulação de reações de hipersensibilidade imediatas e sabe-se que estão aumentadas no córtex renal de filhotes de mães diabéticas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a expressão de mastócitos nos rins e coração da prole de mães diabéticas e verificar se o tratamento com cromoglicato altera esta expressão. Para isso, foram utilizados 15 ratos *Wistar* machos e 30 fêmeas para acasalamento. As ratas grávidas e seus filhotes fêmeas de 1 dia foram divididos nos seguintes grupos: 1) Controle+salina - filhotes tratados com salina; 2) Controle+cromoglicato - filhotes tratados com cromoglicato; 3) Diabético+salina - filhotes de mães diabéticas tratados com salina; 4) Diabético+cromoglicato - filhotes de mães diabéticas tratados com cromoglicato; 5) Não-diabético+salina - filhotes de mães induzidas, mas não-diabéticas, tratados com salina e 6) Não-diabético+cromoglicato - filhotes de mães induzidas, mas não-diabéticas tratados com cromoglicato. Os filhotes de 1 dia foram anestesiados com halotano para coleta dos rins e corações, que foram incluídos em parafina e submetidos à coloração com Azul de Toluidina para contagem de mastócitos. As mães dos grupos Diabéticos apresentaram níveis glicêmicos elevados pós-indução e mantiveram a hiperglicemia até o final da gestação. O diabetes materno não interferiu no número de filhotes nascidos por ninhada, mas resultou em mortalidade de 50% na prole dos grupos Diabéticos e 40% no grupo Não-diabéticos. O peso corporal dos filhotes dos grupos Diabéticos foi menor que o registrado nos demais grupos. Esses animais também apresentaram um aumento de mastócitos renais e cardíacos, em relação aos outros grupos, e o tratamento com cromoglicato reduziu o número dessas células, quando o grupo Diabético+cromoglicato foi comparado ao Diabético+salina, com nível de significância de $p < 0.05$. Pode-se concluir que o diabetes materno aumenta o número de mastócitos renais e cardíacos na prole de 1 dia de ratas *Wistar* e o tratamento com cromoglicato reduziu o número dessas células.

Palavras-chave: diabetes mellitus; desenvolvimento renal e cardíaco; mastócitos; ratas *Wistar*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
1.1	Diabetes Mellitus.....	5
1.2	Diabetes na gestação.....	6
1.3	Mastócitos.....	8
1.4	Mastócitos renais e cardíacos.....	10
2	JUSTIFICATIVA.....	12
3	OBJETIVOS.....	13
3.1	Gerais.....	13
3.2	Específicos.....	13
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	14
4.1	Animais.....	14
4.2	Análise morfológica e contagem de mastócitos.....	15
4.3	Análise estatística.....	15
5	RESULTADOS.....	16
6	DISCUSSÃO.....	20
7	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
	ANEXO 1.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) consiste em um distúrbio metabólico de carboidratos, proteínas e lipídeos, caracterizado por níveis elevados de glicose na circulação sanguínea (IDF, 2017). A origem do problema pode ser tanto a ausência de secreção de insulina quanto a diminuição da sensibilidade dos tecidos a este hormônio (SKYLER et al., 2017). De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), esta síndrome pode ser classificada em:

1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1): doença autoimune com destruição de células β -pancreáticas, que leva a uma insuficiência absoluta de insulina (CHIANG et al., 2014; SBD, 2018);
2. Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2): perda progressiva da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, devido a uma resistência frequente das células-alvo a este hormônio (SKYLER et al., 2017);
3. Diabetes Gestacional (DG): quando o distúrbio é diagnosticado na mulher no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, sem evidência aparente de diabetes antes da gestação;
4. Tipos específicos de diabetes devido a outras causas, como: síndromes monogênicas do diabetes (diabetes neonatal e diabetes de início da maturidade do jovem), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) ou diabetes induzido por drogas (como uso de glicocorticoides no tratamento de HIV/AIDS ou após transplante de órgãos) (SBD, 2018).

Os sintomas incluem poliúria, polidipsia, polifagia e em alguns casos um emagrecimento inexplicado (ADA, 2017). Em 2015, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), 8,8% da população mundial, de 20 a 79 anos, vivia com diabetes, um total de 415 milhões de pessoas (IDF, 2015). Em 2017, esse número subiu para 424,9 milhões com uma estimativa de que em 2045, 628 milhões de pessoas possuirão diabetes no mundo (IDF, 2017). Desses, estima-se que 49,7% não sejam diagnosticados (CHO et al., 2018) e que 83,8% dos não diagnosticados estejam em países em desenvolvimento (BEAGLEY et al., 2014). O Brasil é o quarto país no ranking mundial de pacientes diabéticos (COUTINHO; SILVA JÚNIOR, 2015) com 12,5 milhões de pessoas acometidas (IDF, 2017).

O número elevado da prevalência também eleva a carga de gastos necessários com a doença pelos sistemas de saúde (VOS et al., 2016), chegando a 1,3 trilhões de dólares em

2015 em todo o mundo (BOMMER et al., 2018). Isso se deve ao alto número de complicações que a síndrome traz, categorizadas em microvasculares como neuropatia, retinopatia, nefropatia (BARRETT et al., 2017) e macrovasculares como doença coronariana, doença arterial periférica e doenças cerebrovasculares (IDF, 2016). Os quadros de diabetes também foram relacionados a um aumento nos casos de câncer (CARSTENSEN; JØRGENSEN; FRIIS, 2014), incapacidade cognitiva e física (LU; LIN; KUO, 2009; WONG et al., 2013), tuberculose (JEON; MURRAY, 2008) e depressão (ROY; LLOYD, 2012).

1.2 Diabetes na gestação

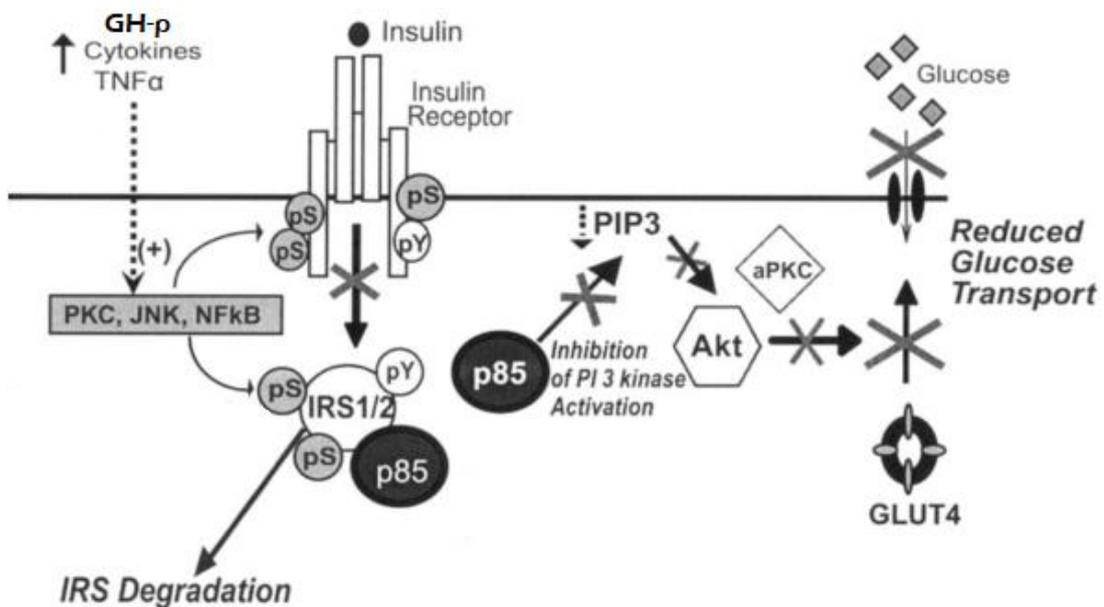
O Diabetes Mellitus na gestação configura-se como uma das complicações mais comuns durante a gravidez (OPAS, 2017). Isso se deve à liberação de hormônios e enzimas hiperglicemiantes pela placenta, necessários para o crescimento fetal, levando a uma resistência à insulina e consequente aumento compensatório na sua produção, o que pode levar a uma disfunção das células β -pancreáticas (NEGRATO, ZAJDENVERG, 2016) e consequente quadro de hiperglicemia sintomática para a mulher, comum do diabetes (ADA, 2016). O diagnóstico é feito entre a 24^a a 28^a semanas de gestação pelo teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (WHO, 2013). Alguns dos fatores de risco associados incluem idade avançada da mulher, sobrepeso ou obesidade, histórico familiar, crescimento fetal excessivo e hipertensão, além da pré-disposição genética (SOLOMON, 2003; SBD, 2015).

A prevalência do diabetes na gestação varia de 1-20% com aumento crescente (ADA, 2016) de acordo com os novos critérios de diagnóstico adotados pela *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group* (IADPSG) e pela Organização Mundial de Saúde (IADPSG, 2010; WHO, 2013) desde que o estudo *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes* (HAPO) mostrou que há um aumento contínuo e progressivo do risco de complicações materno-fetais conforme os níveis de glicemia materna se elevam (HAPO, 2008; MOSES, 2012). A IDF estima que, em 2017, 21,3 milhões de nascidos vivos passaram por algum tipo de hiperglicemia na gravidez, e que, 86,4% desses casos, foram devido ao diabetes na gestação (IDF, 2017). No Brasil, as estimativas alcançam 18% de mulheres grávidas, de acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2017).

Durante o período gestacional, a mulher desenvolve certa intolerância à insulina, principalmente até o terceiro trimestre de gravidez (CATALANO et al., 1991). O que ocorre é a liberação de hormônios e adipocinas pela placenta que podem levar a mulher a desenvolver uma resistência periférica à insulina, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), lactogênio

placentário humano (LP) e o hormônio de crescimento placentário humano (*growth hormone* GH-p). Na 2ª semana de gestação, com o surgimento do sincitiotrofoblasto e consequentemente da placenta, a produção desses hormônios se inicia (TOBERGTE; CURTIS, 2013). A secreção de GH-p é regulada pela placenta e pela glicose materna e funciona como um antagonista da insulina. É a principal fonte de crescimento na mulher durante a gestação, porque suprime o hormônio de crescimento produzido pela hipófise (GH), sendo o responsável pelo crescimento fetal (BAUMANN, 2009). Entretanto, sua ação promove um aumento nos níveis de p85 α , a subunidade reguladora da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) presente no receptor de insulina-1 (IRS-1), levando a uma inibição competitiva do receptor, o que diminui a translocação de GLUT-4 na membrana plasmática das células, principalmente do músculo esquelético, diminuindo a captação de glicose materna (BARBOUR et al., 2005).

Figura 1 – Resumo do mecanismo para resistência à insulina durante a gravidez. GH-p (GH placentário) e TNF- α atuam aumentando os níveis de p85 α , promovendo a inibição competitiva do receptor de insulina-1 (IRS-1). A p85 α é a subunidade reguladora da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) presente no IRS-1. Seu efeito na inibição do receptor, acarreta uma diminuição na translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática das células.



Fonte: Modificado de BARBOUR et al., 2007.

Com isso, há uma compensação do pâncreas na produção de insulina com um aumento na massa de células β pancreáticas (VAN ASSCHE; AERTS; DE PRINS, 1978). Esse aumento na proliferação de células β correlaciona-se com o aparecimento e o aumento do lactogênio placentário (LP), importante nas funções de crescimento, lactação e produção de esteroides lúteos. Seu aumento, à partir da quarta semana de gestação, contribui para a hiperplasia das células β e conseqüentemente para o aumento na secreção de insulina (CLARK; PARSONS; SORENSON, 1992).

Após a sexta semana de gestação, o aumento na produção de estrogênio e progesterona pela placenta aumenta (NEWBERN; FREEMARK, 2011). O estrogênio aumenta o fluxo sanguíneo e a síntese de prostaglandinas endometriais, o que facilita o transporte de nutrientes fetoplacentários e prepara o corpo para a lactação, aumentando a síntese e a secreção de prolactina pela hipófise (DAS et al., 2009). A progesterona contribui para o aumento da ingestão alimentar (AUGUSTINE; GRATTAN, 2008) e suprime a imunidade materna, para evitar a rejeição do feto pelo organismo feminino (DRUCKMANN, 2005). Com o aumento da ingestão alimentar, a progesterona contribui, indiretamente, para o aumento da produção de leptina, devido ao aumento da lipogênese materna, gerado pelo aumento da ingestão. A leptina, sendo um hormônio produzido pelos adipócitos, terá sua síntese aumentada, pelo aumento da deposição de gordura, o que leva à resistência à leptina durante a gestação (GRATTAN; LADYMAN; AUGUSTINE, 2007). A leptina elevada, em condições fisiológicas normais, reduziria a ingestão alimentar, mas a progesterona inibe sua ação no sistema nervoso central, assim seus níveis elevados geram resistência e a energia necessária será armazenada para a lactação e crescimento fetal (AUGUSTINE; GRATTAN, 2008). O quadro de progesterona elevada atenua os efeitos da hiperinsulinemia gerada pelo pâncreas, principalmente no tecido adiposo e no músculo esquelético, contribuindo para a diminuição da sensibilidade periférica à insulina (ENNS, 1988).

O aumento na deposição de gordura está correlacionado com o aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo (NEWBERN; FREEMARK, 2011). As “adipocinas”, como são conhecidas, incluem leptina, adiponectina, TNF- α , interleucina-6 (IL-6), resistina e outros (BARBOUR et al., 2007). TNF- α é uma citocina produzida não apenas nos adipócitos, mas também nos monócitos, macrófagos, células T, neutrófilos e fibroblastos e apresenta uma relação entre seus níveis e os de resistência à insulina (SPIEGELMAN; HOTAMISLIGIL, 1994).

Com isso, a gestação pode ser caracterizada como um quadro de resistência à insulina e conseqüente hiperglicemia. O diabetes se desenvolve quando a mulher, além de apresentar

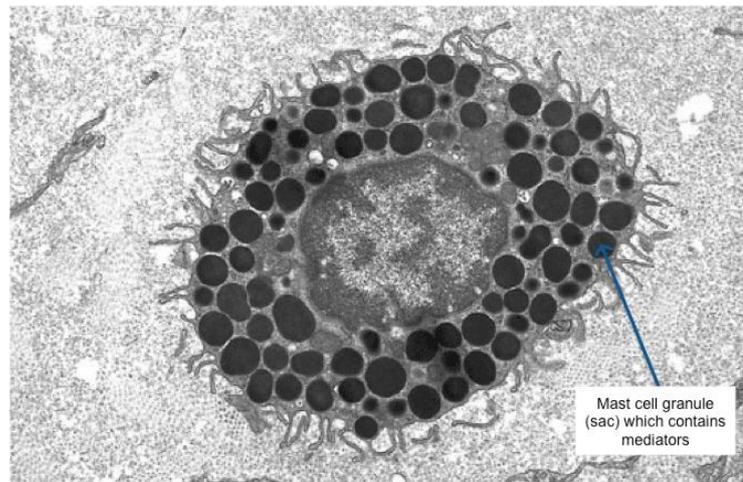
tal quadro clínico, ainda se encaixa nos fatores de risco, como sobrepeso ou obesidade, histórico familiar de diabetes, idade avançada e síndrome de ovários policísticos (ALFADHLI, 2015; SBD, 2018). Conseqüentemente, há uma elevação dos níveis de mortalidade fetal, malformações congênitas, abortos espontâneos e aumento da ocorrência de macrosomia (BIDER-CANFIELD et al., 2017). Alterações como estas podem levar os filhos de mães diabéticas a terem sobrepeso, obesidade e DM na vida adulta (ROCHA et al., 2005; AL-FAR, TJESSEM, LAUSZUS, 2017), além de alterações em sua estrutura vascular (DIB et al., 2018).

Em modelos experimentais que mimetizam o DM1 em ratas no período gestacional verificou-se que a prole apresenta nefrogênese prejudicada, com nefros deficientes por uma alta taxa de apoptose e com os rins menores, o que caracteriza malformação renal, levando a uma menor taxa de filtração glomerular (LUYCKX et al., 2013; DAEHN et al., 2017). Além disso, estudos apontaram aumento da expressão de canais de sódio epiteliais e bombas de sódio/potássio nos túbulos renais de filhotes de mães diabéticas (MARTINS et al., 2014; TAIN, HSU, 2017) e filhotes que apresentaram uma disfunção renal por estar associada a um sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona anormal (PATEL et al., 2017).

1.3 Mastócitos

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea, com o precursor AA4⁻/BGD6⁺ (JAMUR et al., 2005), sob influência do fator de célula-tronco (SCF – *stem cell factor*). Eles amadurecem no tecido-alvo e são encontrados com maior relevância nos tecidos subcutâneos e nas mucosas localizadas no ambiente de defesa do organismo (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997). Foram descritos inicialmente por Paul Ehrlich, em 1877, com base em seu perfil metacromático (EHRlich, 1877). Em sua forma madura, presentes nos tecidos, são morfologicamente alongados, e quando isolados na cavidade peritoneal, apresentam-se de forma arredondada. Desempenham um papel central nas reações alérgicas por meio de respostas mediadas por receptores de IgE de alta afinidade (FcεRI) (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997), devido à sua alta concentração de grânulos citoplasmáticos, principalmente a histamina, uma amina biogênica vasodilatadora, responsável pelo extravasamento de plasma, que acarreta o aparecimento de edemas, vermelhidão e coceiras que ocorrem após a ativação imunológica por IgE (BEAVEN, 1976). Além disso, os mastócitos sintetizam muitos outros mediadores, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, proteases (triptase, quimase e carboxipeptidase A) e ainda leucotrienos (PEJLER et al., 2010).

Figura 2 – Imagem de microscopia eletrônica de um mastócito.



Fonte: The Mastocytosis Society (2011).

A metacromasia se deve aos grânulos metacromáticos, em função de sua alta concentração de radicais ácidos presentes na heparina, um polissacarídeo polianiônico sulfatado pertencente à família dos glicosaminoglicanos. Seu principal efeito se dá pela sua ação anticoagulante (HIRSH, 1991). Em modelos clássicos, a classificação dos mastócitos se dá de acordo com sua localização e o conteúdo de seus grânulos. Àqueles localizados em tecidos conjuntivos, dá-se o nome de mastócitos de tecido conjuntivo (que expressam quimase e triptase em seus grânulos); àqueles localizados na mucosa, dá-se o nome de mastócitos de mucosa (que expressam apenas triptase) (PEJLER et al., 2010). Entretanto, um mesmo sinal, que induz a desgranulação mastocitária, leva à liberação de diferentes proteases com especificidades de substratos distintas, dependendo do tecido em questão. Logo, um único estímulo pode induzir diferentes efeitos em vários tecidos. Consequentemente, é possível dizer também que há diferenças nos receptores de mastócitos específicos, como mostra o trabalho de Dwyer e colaboradores, onde foi realizada uma análise transcricional de 14 populações de células linfóides e mielóides e o mastócito se mostrou como uma das células transcionalmente mais variáveis do sistema imunológico (DWYER et al., 2016). Essas observações mostram a complexa heterogeneidade dessas células, sugerindo que sua classificação seja feita de acordo com o conteúdo de proteases de seus grânulos e não apenas de acordo com sua localização. Todavia, tal característica também deve ser ressaltada para a importância dessas células em inúmeros processos patológicos, como na formação de fibrose em diferentes tecidos (CLAMAN, 1985).

1.4 Mastócitos renais e cardíacos

Em condições fisiológicas, os mastócitos são encontrados em número reduzido em órgãos vascularizados, como os rins. Entretanto, em doenças renais crônicas progressivas, incluindo glomerulonefrite primária e secundária, nefropatia por IgA, nefropatia diabética e rejeição aguda e crônica de aloenxerto, sua infiltração torna-se significativa (HOLDSWORTH; SUMMERS, 2008), principalmente nos espaços intersticiais peritubulares com áreas de fibrose, o que sugere sua associação com o aumento dos níveis intersticiais de SCF, expressos pelas células tubulares e intersticiais renais (KITOH et al., 1998; EL-KORAIE et al., 2001). A diversidade do subtipo é ainda mais dependente da doença. Para os casos de fibrose renal, os mastócitos quimase-positivos são os identificados, principalmente em pacientes com doença renal crônica (WASSE et al., 2011). Essa protease, por sua vez, se mostra de grande importância, uma vez que pode apresentar ação na formação da fibrose renal, já que está estritamente ligada ao Sistema Renina-Angiotensina (SRA), que tem relação com a doença renal; diretamente, pelo efeito da Angiotensina II (Ang-II) na vasoconstrição eferente e, indiretamente, pela indução do fator de crescimento tumoral- β 1 (TGF- β 1 – *tumor growth factor*) que prejudicará a auto-regulação da arteríola aferente, aumentando a pressão de filtração capilar e contribuindo para uma possível proteinúria (RÜSTER; WOLF, 2006; YANG; XU, 2017). Ainda, a quimase pode aumentar a expressão de TGF- β da mesma forma que Ang-II; diretamente, ativando sua forma precursora, ou indiretamente, promovendo a formação de Ang-II (WASSE; NAQVI; HUSAIN, 2012). O TGF- β contribui na formação de fibrose através da estimulação da proliferação de fibroblastos, síntese de matriz extracelular (colágenos, proteoglicanos, fibronectina) e na transição epitelial-mesenquimal (LOBODA et al., 2016). Outro possível mecanismo de fibrogênese da quimase é a via de ativação de receptores ativados por proteases (PARs), especialmente os do subtipo 2 (PAR-2) que induzem a produção de citocinas fibrogênicas por células renais, por meio do aumento da permeabilidade glomerular (SHARMA et al., 2007).

À semelhança do descrito com a fibrose, é o que acontece em quadros de nefropatia diabética. Rüger e colaboradores já haviam descrito, em 1996, a relação direta entre mastócitos e fibrose nesse caso (RÜGER et al., 1996). Majoritariamente, mastócitos de tecido conjuntivo, atuam na formação fibrótica por meio de seus mediadores TGF- β , renina e TNF- α aliados à inflamação do tecido, via ação da quimase (ZHENG et al., 2012), além da capacidade dos mastócitos de produzirem renina (SILVER et al., 2004). Seus mediadores participam na regulação do volume extracelular, na vasoconstrição arterial e pressão arterial,

no caso da renina (HUANG et al., 2007) e no recrutamento e ativação de células inflamatórias, com o TNF- α (HOLTMANN; NEURATH, 2005).

Além do sistema renal, na literatura, há sugestões da participação dos mastócitos no desenvolvimento da fibrose do miocárdio e na falência cardíaca (PANIZO et al., 1995; HARA et al., 2002). Em 1995, Panizo e colaboradores já haviam descrito a participação dessas células na fibrose nos corações de animais hipertensos (PANIZO et al., 1995). Em 2003, Shiota e colaboradores confirmaram a ação das citocinas e fatores mastocitários na evolução da fibrose cardíaca (SHIOTA et al., 2003), mas foi só em 2009, que Levick e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, uma relação causal entre a ativação mastocitária e a fibrose em corações hipertensos. As proteases e citocinas liberadas agem nos fibroblastos cardíacos, induzindo a síntese e proliferação de colágeno, como a triptase, interferon- γ e interleucinas (IL-6 e IL-10) (LEVICK et al., 2009).

O estudo experimental da participação de mastócitos em processos como os de fibrose pode ser feito com drogas que inibam a desgranulação dessas células, como é o caso do cromoglicato de sódio (Oliveira-Silva et al, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do papel dos mastócitos na indução de vários tipos de lesões renais já estar bem estipulado, ainda não existem trabalhos na literatura que tenham avaliado a expressão de mastócitos nos rins e coração da prole de mães diabéticas e se o tratamento com cromoglicato alteraria esta expressão. Assim, estudos com este objetivo são de extrema importância, uma vez que podem fornecer informações que possibilitem prever os impactos das modificações dessas células no tecido renal, desde o nascimento até a vida adulta, além de poder auxiliar na compreensão e no tratamento de doenças pediátricas relacionadas ao assunto.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a presença de mastócitos renais e cardíacos na prole de ratas *Wistar* diabéticas e verificar se o tratamento com cromoglicato alteraria esta expressão.

3.2 Específicos

- a) Avaliar a glicemia e variação de peso corporal, além do número de filhotes nascidos por ninhada, de mães expostas ao DM1 durante a gestação;
- b) Analisar o peso corporal e quantificar os mastócitos nos rins e corações dos filhotes fêmeas de 1 dia de ratas *Wistar* diabéticas;
- c) Avaliar se a inibição da desgranulação mastocitária, feita com o cromoglicato de sódio, pode alterar o número de mastócitos renais e cardíacos nos filhotes fêmeas de 1 dia de ratas *Wistar* diabéticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Após submissão e aprovação do projeto pela Comissão de Ética para Utilização de Animais (CEUA/UFU 050/18 – ANEXO I), foram utilizados para acasalamento 15 ratos Wistar machos de 300g e 30 fêmeas de 180g, separados em caixas por sexo, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos no Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). 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 do próximo dia 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 seus filhotes divididos nos seguintes grupos:

Grupo Controle+Salina: filhotes de 1 e 7 dias que receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% no dia 0 e do dia 0 ao 7º dia de vida, respectivamente, de mães que também receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação;

Grupo Controle+cromoglicato: filhotes de 1 e 7 dias que receberam injeção intraperitoneal de cromoglicato de sódio (50mg/Kg) no dia 0 e do dia 0 ao 7º dia de vida, respectivamente, de mães que receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação;

Grupo Diabético+salina: filhotes de 1 e 7 dias que receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% no dia 0 e do dia 0 ao 7º dia de vida, respectivamente, de mães que receberam injeção intraperitoneal de aloxana (100 mg/kg) diluída em solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação;

Grupo Diabético+cromoglicato: filhotes de 1 e 7 dias que receberam injeção intraperitoneal de cromoglicato de sódio (50mg/Kg) no dia 0 e do dia 0 ao 7º dia de vida, respectivamente, de mães que receberam injeção intraperitoneal de aloxana (100 mg/kg) diluída em solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação;

Grupo Não-diabético+salina: filhotes de 1 e 7 dias que receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% no dia 0 e do dia 0 ao 7º dia de vida, respectivamente, de mães que receberam injeção intraperitoneal de aloxana (100 mg/kg) diluída em solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação e não ficaram hiperglicêmicas;

Grupo Não-diabético+cromoglicato: filhotes de 1 e 7 dias que receberam injeção intraperitoneal de cromoglicato de sódio (50mg/Kg) no dia 0 e do dia 0 ao 7º dia de vida, respectivamente, de mães que receberam injeção intraperitoneal de aloxana (100 mg/kg) diluída em solução salina 0,9% no primeiro dia da gestação e não ficaram hiperglicêmicas.

As ratas grávidas dos grupos Diabéticos e Não-diabéticos ficaram de jejum por cerca de 24 horas para a indução do diabetes com aloxana, droga que promove destruição de células beta pancreáticas, resultando em modelo de DM1. Após 2 dias da indução foi coletada uma gota de sangue da cauda das ratas grávidas para verificação da glicemia, realizada com o auxílio de um glicosímetro. Foram consideradas diabéticas as que apresentaram glicemia maior ou igual a 150 mg/dL, as que apresentaram glicemia menor que 150 mg/dL foram destinadas aos grupos de Não-diabéticas.

4.2 Análise morfológica e contagem de mastócitos

Após o nascimento, os filhotes fêmeas de 1 e 7 dias foram anestesiados com halotano (Cristália) e tiveram seus rins e corações coletados para a quantificação de mastócitos. Depois de retirados, os rins foram fixados em *methacarn* por 24 horas e em seguida lavados em álcool 70%.

Em seguida, os rins e corações foram processados e incluídos em parafina para análise histológica e, posteriormente, realizadas as secções de tecido renal e cardíaco com 4µm de espessura em um micrótomo. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração com Azul de Toluidina, que permitirá a contagem de mastócitos, que foi realizada em um microscópio *Leica* na objetiva de 10x para a visualização de todo o campo e na objetiva de 40x, para a contagem.

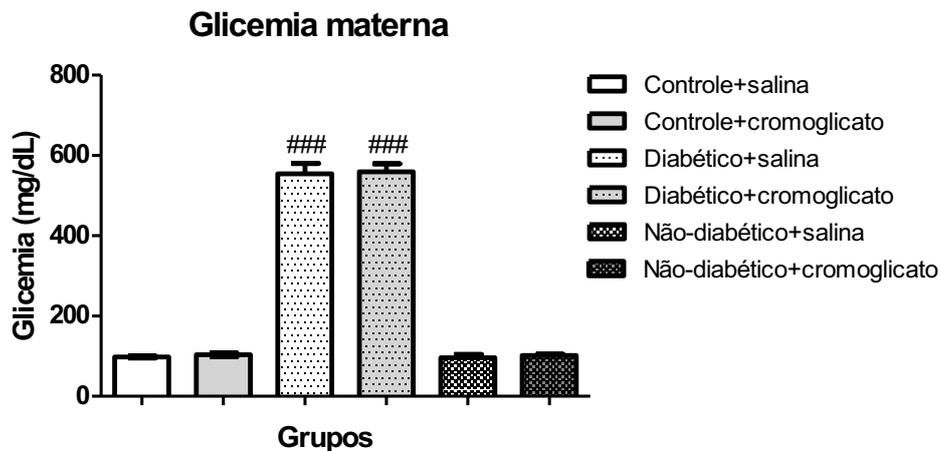
4.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism Version 5.00 (Trial)*. Primeiramente, verificou-se se os dados apresentam ou não distribuição normal utilizando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Quando apresentaram distribuição normal, foi utilizado um teste paramétrico para análise dos dados, senão foi utilizado um teste não-paramétrico. O nível de significância adotado é de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

O quadro de DM1 foi induzido pela administração de aloxana (100mg/Kg) diluída em solução salina 0,9% por via intraperitoneal. As mães dos grupos Diabético+salina e Diabético+cromoglicato apresentaram níveis glicêmicos elevados pós-indução e mantiveram a hiperglicemia até o final da gestação (**Figura 1**), quando comparadas às mães dos demais grupos. Embora não tenham sido quantificados, essas ratas apresentaram ainda sinais clássicos da doença como poliúria e polidipsia, enquanto o ganho de peso durante a gestação não tenha sido diferente entre os grupos (**Figura 2**).

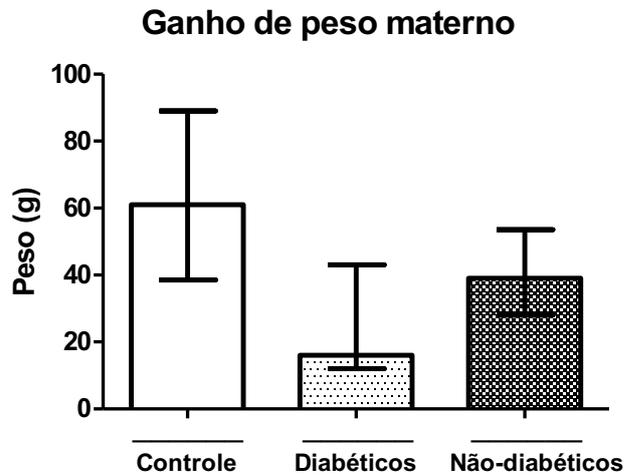
Figura 1 - Glicemia materna ao final da gestação dos grupos Controle+salina, Controle+cromoglicato, Diabético+salina, Diabético+cromoglicato, Não-diabético+salina e Não-diabético+cromoglicato.



Fonte: A autora.

Glicemia materna durante a gestação dos grupos Controle+salina (n=5), Controle+cromoglicato (n=5), Diabético+salina (n=5), Diabético+cromoglicato (n=5), Não-diabético+salina (n=5) e Não-diabético+cromoglicato (n=5). Teste de Tukey com correção de Welch. Os dados são apresentados como Média±EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. ### $p < 0,001$ versus os grupos Controle e Não-diabéticos.

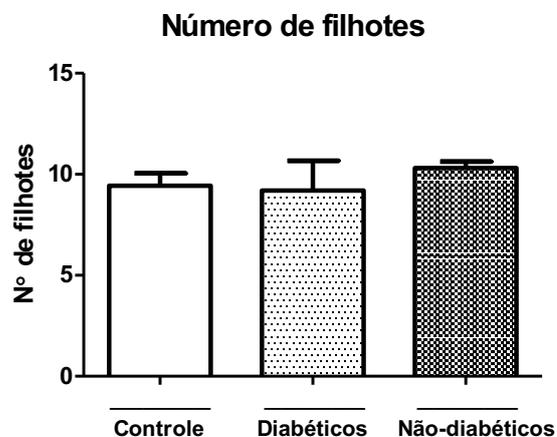
Figura 2 - Peso corporal materno dos grupos Controle, Diabético e Não-diabético.



Ganho de peso materno durante a gestação dos grupos Controle (n=5), Diabético (n=5) e Não-diabético (n=10). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

O DM1 durante a gestação também não interferiu no número de filhotes nascidos por ninhada (**Figura 3**), mas resultou em maior mortalidade, cerca de 50% dos filhotes fêmeas de mães Diabéticas morreram após o nascimento, enquanto que a taxa de mortalidade no grupo Não-diabéticos foi de 40%, no mesmo período. No grupo controle não houve registro de mortes.

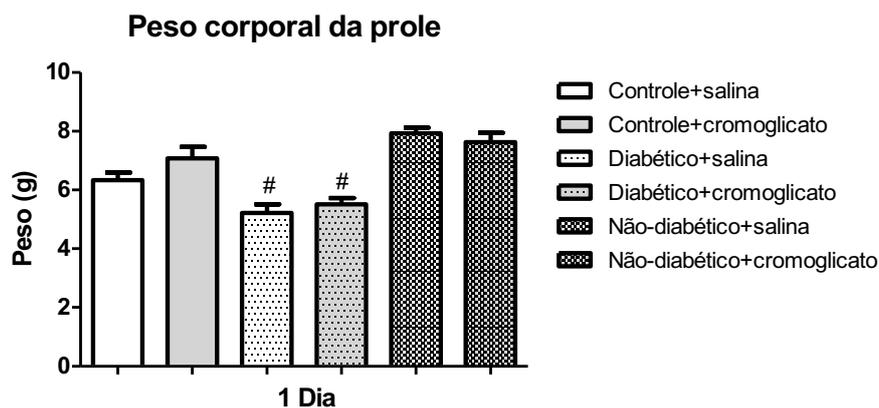
Figura 3 - Número de filhotes por ninhada dos grupos Controle, Diabéticos e Não-diabéticos.



Número de filhotes por ninhada dos grupos Controle (n=5), Diabético (n=5) e Não-diabético (n=10). Teste de Tukey com correção de Welch. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

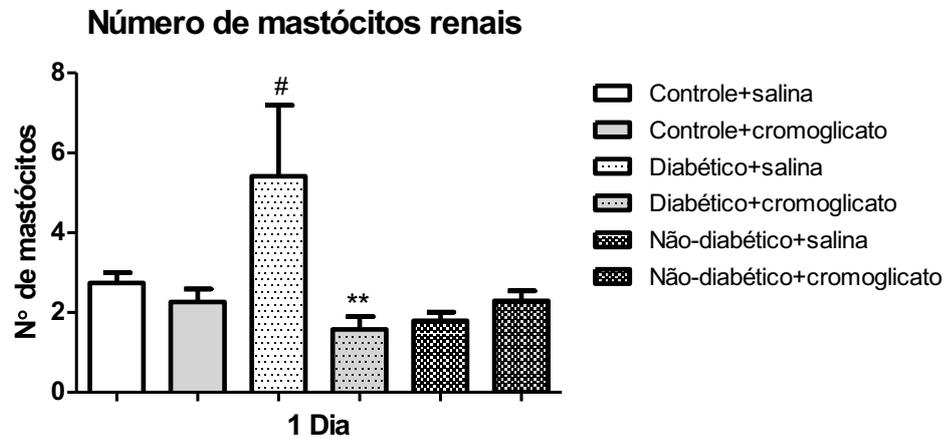
Com relação aos dados obtidos nos filhotes fêmeas de 1 dia, o peso corporal dos grupos Diabético+salina e Diabético+cromoglicato foi menor em comparação aos demais grupos (**Figura 4**), mostrando que o DM pode interferir no desenvolvimento corporal da prole. Além disso, o diabetes resultou em aumento no número de mastócitos renais (**Figura 5**) e cardíacos (**Figura 6**) em relação aos outros grupos e o tratamento com cromoglicato reduziu o número dessas células, quando o grupo Diabético+cromoglicato foi comparado ao Diabético+salina.

Figura 4 - Peso corporal dos filhotes fêmeas dos grupos Controle+salina, Controle+cromoglicato, Diabético+salina, Diabético+cromoglicato, Não-diabético+salina e Não-diabético+cromoglicato.



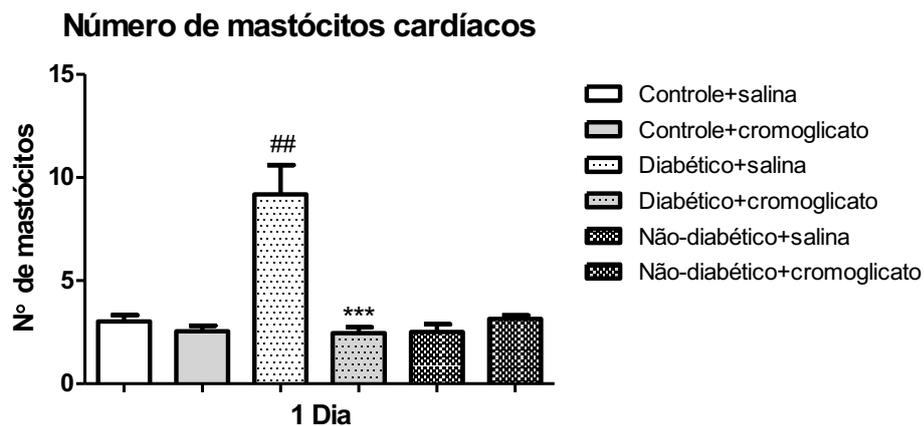
Peso corporal dos filhotes fêmeas de 1 dia dos grupos Controle+salina (n=4), Controle+cromoglicato (n=5), Diabético+salina (n=2), Diabético+cromoglicato (n=5), Não-diabético+salina (n=7) e Não-diabético+cromoglicato (n=7). Teste de Tukey com correção de Welch. Os dados são apresentados como Média±EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. # $p < 0,05$ versus os grupos Controle e Não-diabéticos.

Figura 5 – Número de mastócitos renais dos filhotes fêmeas de 1 dia dos grupos Controle+salina, Controle+cromoglicato, Diabético+salina, Diabético+cromoglicato, Não-diabético+salina e Não-diabético+cromoglicato.



Número de mastócitos renais nos filhotes fêmeas de 1 dia dos grupos Controle+salina (n=4), Controle+cromoglicato (n=5), Diabético+salina (n=2), Diabético+cromoglicato (n=5), Não-diabético+salina (n=7) e Não-diabético+cromoglicato (n=7). Teste de Tukey com correção de Welch. Os dados são apresentados como Média±EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. # $p < 0,05$ versus os grupos Controle e Não-diabéticos; ** $p < 0,01$ versus Diabético+salina.

Figura 6 – Número de mastócitos cardíacos dos filhotes fêmeas de 1 dia dos grupos Controle+salina, Controle+cromoglicato, Diabético+salina, Diabético+cromoglicato, Não-diabético+salina e Não-diabético+cromoglicato.



Número de mastócitos cardíacos nos filhotes fêmeas de 1 dia dos grupos Controle+salina (n=4), Controle+cromoglicato (n=5), Diabético+salina (n=2), Diabético+cromoglicato (n=5), Não-diabético+salina (n=7) e Não-diabético+cromoglicato (n=7). Teste de Tukey com correção de Welch. Os dados são apresentados como Média±EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. ## $p < 0,01$ versus os grupos Controle e Não-diabéticos; *** $p < 0,001$ versus Diabético+salina.

Embora a coleta dos rins e corações dos animais de 7 dias tenha sido realizada, bem como o processamento desse material para inclusão e coloração das lâminas com Azul de Toluidina, não foi possível finalizar as análises devido ao n incompleto de alguns grupos.

6. DISCUSSÃO

A aloxana é um derivado do ácido úrico e assim como a estreptozotocina (STZ), outra droga utilizada para indução de DM1, em doses apropriadas, agem seletivamente destruindo células β -pancreáticas, embora a STZ seja mais seletiva (JUNOD et al., 1967; JUNOD et al., 1969; LENZEN; PANTEN, 1988; RAMSAY; WOLVERTON; STEELE, 1994; DICKINSON et al., 1991). A aloxana depleta os estoques celulares de insulina por promover liberação súbita desse hormônio, seguida por supressão da resposta celular à glicose plasmática (SZKUDELSKI, 2001). No presente trabalho, utilizou-se a aloxana, como droga indutora de DM1 em ratas grávidas, e a dose de 100mg/Kg por via intraperitoneal se mostrou efetiva, uma vez que a hiperglicemia foi mantida até o final da gestação, mas o sucesso de indução por esta via ainda é baixo, cerca de 40%, como constatado em outros estudos no laboratório. Vários trabalhos trazem dados acerca da efetividade da aloxana, um estudo feito em 2004 por Federiuk e colaboradores, também utilizando animais que receberam uma dose de 100mg/Kg de aloxana por via intraperitoneal, tiveram uma taxa de 80% de conversão para o DM1 (FEDERIUK et al., 2004). No entanto, Szkudelski (2001) relata que doses intraperitoneais de aloxana abaixo de 150mg/Kg podem ser insuficientes para indução de diabetes em ratos, necessitando-se assim de uma segunda dose (SZKUDELSKI, 2001). Já Silva (2011) mostrou em seus estudos, a eficácia da dose de 120mg/Kg pela via intraperitoneal em ratas com o desenvolvimento de DM1 (DA SILVA; NOGUEIRA, 2015). Embora não tenham sido avaliados quantitativamente, as ratas diabéticas apresentaram poliúria e polidipsia, que são outros sinais clássicos da doença, como consequências da hiperglicemia.

As complicações derivadas do diabetes durante a gestação, como mortalidade fetal, macrossomia, elevação da pressão arterial e redução do ritmo de filtração glomerular já estão bem estabelecidas (MARTINS et al., 2014). Até mesmo a alta mortalidade observada nos filhotes de mães Diabéticas e Não-diabéticas nesse trabalho está de acordo com dados da literatura. Desde 1960, Nam Kim e colaboradores, já relataram uma mortalidade de quase 50% em filhotes de ratas, tanto diabéticas descompensadas quanto de diabéticas tratadas com insulina (KIM et al., 1960). A hiperglicemia resulta em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que causa um estresse oxidativo no ambiente intrauterino (FORBES; COOPER, 2013). A produção de vários mediadores que afetam os sistemas cardiovascular e renal, como fatores inflamatórios (TNF- α e IL-6), a ativação do receptor de Angiotensina II do tipo 1 (AT1R – *Angiotensin II type 1 receptor*) e EROs, perturba a homeostase vascular e é capaz de mediar disfunção endotelial em mulheres grávidas (YU et

al., 2018). Além disso, há o estresse nitrosativo induzido por espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que aumenta a nitração de proteínas em gestantes, levando à disfunção vascular nos vasos placentários e na vasculatura umbilical (TOLJIC et al., 2017). Essas alterações, juntamente com as alterações metabólicas maternas nos mecanismos de transporte de glicose, ácidos graxos e aminoácidos (ALFADHLI, 2015), contribuem para aumentar a hipóxia e acidose fetal e podem levar o feto a consequências pós-natais danosas, como baixo peso, natimortos, além de provocar falhas no desenvolvimento, fatores estes que podem explicar a alta taxa de mortalidade e o baixo peso encontrado nos filhotes de 1 dia das mães Diabéticas e a mortalidade no grupo Não-diabéticos.

Embora o DM materno tenha resultado em alta mortalidade pós-natal, no presente trabalho não houve alteração do número de filhotes nascidos por ninhada, o que poderia ser esperado, uma vez que muitos estudos mostraram que o diabetes materno altera o ambiente intrauterino, causando malformações fetais, ou ainda, falhas no desenvolvimento do feto ainda no útero (FETITA et al., 2006), o estresse oxidativo causado explicaria a embriopatia gerada nessas condições (LOEKEN, 2006). No entanto, resultados diferentes dos relatados nesse trabalho foram encontrados por Gill-Randall e colaboradores (2004). Eles observaram que ratas controle obtiveram quase o dobro de descendentes viáveis, quando comparadas às mães diabéticas, mostrando que, em alguns modelos, o diabetes pode interferir no tamanho da ninhada (GILL-RANDALL et al., 2004).

A literatura mostra que o número de mastócitos aumenta no tecido adiposo branco, processos inflamatórios e cicatrização de feridas (WANG; SHI, 2011; ZHOU et al., 2015; TELLECHEA et al., 2016). Nos tecidos cardíaco e renal, essa célula atua no processo inflamatório contribuindo para a formação de fibrose via ativação de suas citocinas e proteases, principalmente quimase e triptase (LEVICK et al., 2009; WASSE et al., 2011). No caso do diabetes, o aumento na expressão de mastócitos renais resulta no aumento acentuado da expressão de quimase, principalmente na fase de glomeruloesclerose, fibrose e esclerose vascular, com forte deposição na matriz extracelular rica em colágeno, sobretudo nos glomérulos, túbulos renais e endotélio (HUANG et al., 2003). No tecido cardíaco, os mastócitos produzem fatores de crescimento fibrogênicos, proteases e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , que modulam o fenótipo dos fibroblastos, induzindo a proliferação dessas células e aumentando a síntese de colágeno no miocárdio (VENKATACHALAM et al., 2009). Além disso, outras quimiocinas têm o poder de recrutar monócitos fibrogênicos e atuarem diretamente nos fibroblastos, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento da fibrose cardíaca (DOBACZEWSKI; FRANGOIANNIS, 2009).

No entanto, a presença dessas células durante o desenvolvimento cardíaco e renal, ou até mesmo uma possível participação de mastócitos nesse processo, ainda são pouco exploradas na literatura. No trabalho de Alvarez (2014), constatou-se que a densidade mastocitária diminuiu ao longo do desenvolvimento renal, mas aumentou durante o desenvolvimento cardíaco e o tratamento pós-natal com cromoglicato na dose de 25mg/Kg não modificou esse perfil. Os mastócitos foram encontrados no parênquima do córtex renal, na medula renal, bem como no interior dos tufos glomerulares e o cromoglicato também não interferiu nesse padrão de distribuição. No tecido cardíaco, os mastócitos foram encontrados na parede livre do ventrículo esquerdo, na parede livre do ventrículo direito, no septo e no ápice, mas o tratamento com cromoglicato também não alterou a distribuição dos mastócitos no tecido cardíaco, em nenhum dos períodos avaliados (ALVAREZ, 2014). Esses resultados sugerem que mastócitos possam ter alguma participação apenas no desenvolvimento cardíaco ou mesmo somático, pois os animais de 30 dias tratados com cromoglicato apresentaram redução de peso corporal, embora os pesos relativo renal e cardíaco não tenham sido diferentes. É importante destacar a necessidade de estudos com doses diferentes de cromoglicato para efeitos de confirmação ou descarte de sua participação no desenvolvimento de determinados órgãos.

Considerando o estudo de Alvarez (2014) e os trabalhos que relacionavam mastócitos a alguns tipos de danos renais, já citados anteriormente, dados anteriores do laboratório, ainda não publicados, mostraram um aumento de mastócitos renais nos filhotes de 7 dias de mães diabéticas não-tratadas com insulina, quando comparados aos filhotes de mães controles e de mães diabéticas tratadas com insulina, de mesma idade. Quando esses animais atingiram os 30 dias de vida, alterações como redução do tamanho dos corpúsculos renais foram identificadas, assim como reduzida função renal (VIEIRA-SILVA, 2014). Nesse contexto, há indícios da participação dos mastócitos no prejuízo renal apresentado pela prole de mães diabéticas, que precisavam ser confirmados.

Sendo assim, neste trabalho observou-se que o diabetes resultou em aumento no número de mastócitos renais e cardíacos nos filhotes fêmeas de 1 dia de idade e que o tratamento com cromoglicato de sódio, diminuiu esse número. A redução no número de mastócitos no grupo Diabético+cromoglicato, quando comparado ao Diabético+salina, mostra o efeito da inibição da desgranulação mastocitária nesses animais. Embora seu mecanismo de ação permaneça incerto, acredita-se que sua ação principal seja inibir a liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios dos mastócitos sensibilizados, inibindo a desgranulação mastocitária (KAY et al., 1987; PALANIYANDI SELVARAJ et al., 2005).

Por último, seria importante avaliar o número de mastócitos renais e cardíacos em filhotes de mães diabéticas tratadas com cromoglicato em idades mais avançadas (7, 30 e 90 dias, por exemplo), além de se estudar a função renal e cardíaca nesses animais na vida adulta para, de fato, avaliar se há uma relação entre mastócitos e o dano tecidual apresentado pela prole de mães diabéticas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados sugerem que o diabetes materno, induzido por aloxana, aumenta o número de mastócitos nos rins e coração da prole de 1 dia de ratas *Wistar* e que o tratamento com cromoglicato reduziu o número dessas células.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA, American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 39, n. 1, p. S13–S22, 2016.

ADA, American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 9, n. 4, p. 320–324, 2017.

AL-FAR, H. F. M.; TJESSEM, I. H.; LAUSZUS, F. F. Macrosomia and the IGF System: A Short Review. **Focus on Sciences**, v. 3, n. 2, 2017.

ALFADHLI, E. M. Gestational diabetes mellitus. **Saudi Med J**, v. 36, n. 4, p. 399–406, 2015.

AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1049–1055, 2008.

BARBOUR, L. A. et al. Increased P85 α is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 45, p. 37489–37494, 2005.

BARBOUR, L. A. et al. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, 2007.

BARRETT, E. J. et al. Diabetic microvascular disease: An endocrine society scientific statement. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 12, p. 4343–4410, 2017.

BAUMANN, G. P. Growth hormone isoforms. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 19, n. 4, p. 333–340, 2009.

BEAGLEY, J. et al. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 150–160, 2014.

BEAVEN, M. A. Histamine. **The New England Journal of Medicine**, v. 294, n. 1, p. 1165–1170, 1976.

BIDER-CANFIELD, Z. et al. Maternal obesity, gestational diabetes, breastfeeding and childhood overweight at age 2 years. **Pediatric Obesity**, v. 12, n. 2, p. 171–178, 2017.

BOMMER, C. et al. Global economic burden of diabetes in adults: Projections from 2015 to 2030. **Diabetes Care**, v. 41, n. 5, p. 963–970, 2018.

CARSTENSEN, B.; JØRGENSEN, M. E.; FRIIS, S. The Epidemiology of Diabetes and Cancer. **Current Diabetes Reports**, v. 14, n. 10, 2014.

CATALANO, P. M. et al. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, n. 6 PART 1, p. 1667–1672, 1991.

CHIANG, J. L. et al. Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 37, n. 7, p. 2034–2054, 2014.

CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 2018.

CLAMAN, H. N. Mast cells, T cells and abnormal fibrosis. **Immunology Today**, v. 6, n. 6, p. 192–195, 1985.

CLARK, T.; PARSONS, A.; SORENSON, L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. **Endocrinology**, v. 130, n. 14, 1992.

COUTINHO, W. F.; SILVA JÚNIOR, W. S. Diabetes Care in Brazil. **Annals of Global Health**, v. 81, n. 6, p. 735–741, 2015.

DA SILVA, V. D.; NOGUEIRA, R. M. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 1,

p. 9–15, 2015.

DAS, A. et al. De novo synthesis of estrogen in pregnant uterus is critical for stromal decidualization and angiogenesis. v. 106, n. 37, 2009.

DOBACZEWSKI, M.; FRANGOIANNIS, N. G. Chemokines and cardiac fibrosis. **Frontiers in Bioscience**, v. S1, n. 2, p. s33, 2009.

DRUCKMANN, R. Progesterone and the immunology of pregnancy &. v. 97, p. 389–396, 2005.

DWYER, D. F. et al. Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. **Nature Immunology**, v. 17, n. 7, p. 878–887, 2016.

EHRlich, P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. **Arch. mikr. Anat.**, v. 13, p. 263–277, 1877.

EL-KORAIE, A. F. et al. Role of stem cell factor and mast cells in the progression of chronic glomerulonephritides. **Kidney International**, v. 60, n. 1, p. 167–172, 2001.

ENNS, L. Role of Gestational Hormones in the Induction of Insulin Resistance. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, n. 2, p. 341–347, 1988.

FEDERIUK, I. F. et al. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 3, p. 252–257, 2004.

FETITA, L. S. et al. Review: Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 3718–3724, 2006.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137–188, 2013.

GILL-RANDALL, R. J. et al. Is human Type 2 diabetes maternally inherited? Insights from an animal model. **Diabetic Medicine**, v. 21, n. 7, p. 759–762, 2004.

GRATTAN, D. R.; LADYMAN, S. R.; AUGUSTINE, R. A. Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. v. 91, p. 366–374, 2007.

HAPO, Hyperglycemia Adverse and Pregnancy Outcomes Study Group. **N Engl J Med**, v. 358, n. 1991–2002, 2008.

HARA, M. et al. Evidence for a Role of Mast Cells in the Evolution to Congestive Heart Failure. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 3, p. 375–381, 2002.

HARTLING, L. et al. Screening and diagnosing gestational diabetes mellitus. **Evidence report/technology assessment**, n. 210, p. 1–327, 2012.

HIRSH, J. Heparin. **The New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 22, p. 669–77, 1991.

HOLDSWORTH, S. R.; SUMMERS, S. A. Role of Mast Cells in Progressive Renal Diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 12, p. 2254–2261, 2008.

HOLTMANN, M.; NEURATH, M. Differential TNF-Signaling in Chronic Inflammatory Disorders. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 4, p. 439–444, 2005.

HUANG, X. R. et al. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: Implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 1738–1747, 2003.

HUANG, Y. et al. Renin-stimulated TGF- β 1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells. **Kidney International**, v. 72, n. 1, p. 45–52, 2007.

IADPSG, International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. Recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care**, v. 33, n. 3, p. 676–682, 2010.

IDF, International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas 7th ed.**, 2015.

IDF, International Diabetes Federation. Diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, n. 4, p. 1–4, 2016.

IDF, International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas 8th ed.**, 2017.

ILSE DAEHN, H. Q. et al. Glomerular endothelial mitochondrial dysfunction is essential and characteristic of diabetic kidney disease susceptibility. **Diabetes**, v. 66, n. 502, p. 1–55, 2017.

JAMUR, M. C. et al. Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. **Blood**, v. 105, n. 11, p. 4282–4289, 2005.

JEON, C. Y.; MURRAY, M. B. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 7, p. 1091–1101, 2008.

KAY, A. B. et al. Disodium cromoglycate inhibits activation of human inflammatory cells in vitro. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 80, n. 1, p. 1–8, 1987.

KIM, J. N. et al. Effects of Experimental Diabetes on the Offspring of the Rat: Fetal Growth, Birth Weight, Gestation Period and Fetal Mortality. **Diabetes**, v. 9, n. 5, p. 396–404, 1960.

KITOH, T. et al. Elevated SCF levels in the serum of patients with chronic renal failure. **British Journal of Haematology**, v. 102, n. 5, p. 1151–1156, 1998.

LEVICK, S. P. et al. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. **Hypertension**, v. 53, n. 6, p. 1041–1047, 2009.

LOBODA, A. et al. TGF- β 1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

LOEKEN, M. R. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, 2006.

LU, F. P.; LIN, K. P.; KUO, H. K. Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, 2009.

LUYCKX, V. A. et al. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 273–283, 2013.

MARTINS, J. D. O. et al. Effect of maternal diabetes on female offspring. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, n. 4, p. 413–419, 2014.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast Cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, 1997.

MOSES, R. G. Gestational diabetes mellitus: Implications of an increased frequency with IADPSG criteria. **Diabetes Care**, v. 35, n. 3, p. 461–462, 2012.

NEGRATO CA, ZAJDENVERG L, M. J. R. **Endocrinologia Clínica**. [s.l: s.n.].

NEWBERN, D.; FREEMARK, M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 18, n. 6, p. 409–416, 2011.

Oliveira-Silva GL, Morais IBM, Fortunato-Silva J, Alvarez MMP, França-Silva N, Galo JA, Hiraki KRN, Balbi APC, Bispo-da-Silva LB. Testosterone and Mast Cell Interactions in the Development of Kidney Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction in Rats. **Biol Pharm Bull**. 41(8):1164-1169, 2018.

OPAS, Organização Pan-Americana de Saúde. Rastreamento e diagnóstico de diabetes mellitus gestacional no Brasil., 2017.

PALANIYANDI SELVARAJ, S. et al. Involvement of Mast Cells in the Development of Fibrosis in Rats with Postmyocarditis Dilated Cardiomyopathy. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2128–2132, 2005.

PANIZO, A. et al. Are mast cells involved in hypertensive heart disease? **Journal of**

Hypertension, 1995.

PATEL, S. et al. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 317–325, 2017.

PEJLER, G. et al. Mast cell proteases: Multifaceted regulators of inflammatory disease. **Blood**, v. 115, n. 24, p. 4981–4990, 2010.

ROCHA, S. O. et al. Long-term effects of maternal diabetes on vascular reactivity and renal function in rat male offspring. **Pediatric Research**, v. 58, n. 6, p. 1274–1279, 2005.

ROY, T.; LLOYD, C. E. Epidemiology of depression and diabetes: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 142, p. S8–S21, 2012.

RÜGER, B. M. et al. Mast cells and type VIII collagen in human diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v. 39, n. 10, p. 1215–1222, 1996.

RÜSTER, C.; WOLF, G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 2985–2991, 2006.

SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**, v. 5, 2015.

SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2017.

SHARMA, R. et al. Chymase increases glomerular albumin permeability via protease-activated receptor-2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 297, n. 1–2, p. 161–169, 2007.

SHIOTA, N. et al. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. **Journal of Hypertension**, p. 1935–1944, 2003.

SILVER, R. B. et al. Mast cells: A unique source of renin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 37, p. 13607–13612, 2004.

SKYLER, J. S. et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 241–255, 2017.

SOLOMON, C. G. A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 278, n. 13, p. 1078–1083, 2003.

SPIEGELMAN, B. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Tumor necrosis factor alpha: A key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, v. 43, n. November, p. 1271–1278, 1994.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, 2001.

TAIN, Y.-L.; HSU, C.-N. Developmental Origins of Chronic Kidney Disease: Should We Focus on Early Life? **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, 2017.

TELLECHEA, A. et al. Mast cells regulate wound healing in diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 7, p. 2006–2019, 2016.

TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. **Medical Embryology**, v. 53, 2015.

TOLJIC, M. et al. Increased oxidative stress and cytokines-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension. **Reproductive Toxicology**, v. 71, p. 55–62, 2017.

VAN ASSCHE, F. A.; AERTS, L.; DE PRINS, F. A Morphological Study of the Endocrine Pancreas. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 85, p. 818–820, 1978.

VENKATACHALAM, K. et al. **WISP1, a pro-mitogenic, pro-survival factor, mediates tumor necrosis factor- α (TNF- α)-stimulated cardiac fibroblast proliferation but inhibits TNF- α -induced cardiomyocyte death.** [s.l: s.n.]. v. 284

VOS, T. et al. Global, regional and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global

Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1545–1602, 2016.

WANG, J.; SHI, G. P. **Mast cell stabilization: Novel medication for obesity and diabetes** *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2011.

WASSE, H. et al. Increased Plasma Chymase Concentration and Mast Cell Chymase Expression in Venous Neointimal Lesions of Patients with CKD and ESRD. **Seminars in Dialysis**, 2011.

WASSE, H.; NAQVI, N.; HUSAIN, A. Impact of Mast Cell Chymase on Renal Disease Progression. **Current Hypertension Reviews**, v. 8, n. 1, p. 15–23, 2012.

WHO, W. H. O. Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. **World Health Organization**, p. 1–63, 2013.

WONG, E. et al. Diabetes and risk of physical disability in adults: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 1, n. 2, p. 106–114, 2013.

YANG, T.; XU, C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 1040–1049, 2017.

YU, W. et al. Molecular determinants of microvascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. **Microcirculation**, v. 26, n. 4, p. 0–2, 2018.

ZHENG, J. M. et al. Pathogenic role of mast cells in the development of diabetic nephropathy: A study of patients at different stages of the disease. **Diabetologia**, v. 55, n. 3, p. 801–811, 2012.

ZHOU, Y. et al. Leptin Deficiency Shifts Mast Cells toward Anti-Inflammatory Actions and Protects Mice from Obesity and Diabetes by Polarizing M2 Macrophages. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 1045–1058, 2015.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 - Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) -
 Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 - CEP 38405-315
 Campus Umuarama - Uberlândia/MG - Ramal (VoIP) 3423
 e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br



ANÁLISE FINAL Nº 127/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 050/18

Projeto Pesquisa: "ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE O ENVOLVIMENTO DE MASTÓCITOS NO DANO RENAL APRESENTADO PELA PROLE DE MÃES DIABÉTICAS."

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

Uberlândia, 20 de agosto de 2018

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
 Coordenador da CEUA/UFU