

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

MATEUS JACINTO DA LUZ

EFEITOS DO TRATAMENTO COM CROMOGLICATO DISSÓDICO NAS
ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS ASSOCIADAS AO INÍCIO DA
NEFROPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL

UBERLÂNDIA

2021

MATEUS JACINTO DA LUZ

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CROMOGLICATO DISSÓDICO NAS
ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS ASSOCIADAS AO INÍCIO DA
NEFROPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito parcial para
obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

UBERLÂNDIA

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L979 2021	<p>Luz, Mateus Jacinto da, 1994- Efeitos do tratamento com cromoglicato dissódico nas alterações morfofuncionais associadas ao início da nefropatia diabética experimental [recurso eletrônico] / Mateus Jacinto da Luz. - 2021.</p> <p>Orientador: Luiz Borges Bispo-da-Silva. Coorientadora: Ana Paula Coelho Balbi. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.105 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Citologia. I. Bispo-da-Silva, Luiz Borges,1978-, (Orient.). II. Balbi, Ana Paula Coelho,1976-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 576.3</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 001/2021, do PPGBC				
Data:	29/01/2021	Hora de início:	14h15	Hora de encerramento:	18h50
Matrícula do Discente:	11822BCE002				
Nome do Discente:	Mateus Jacinto da Luz				
Título do Trabalho:	"Participação dos mastócitos nas alterações morfofuncionais associadas ao início da nefropatia diabética experimental"				
Área de concentração:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Mecanismos de reparo e plasticidade tecidual				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Alterações renais ao longo do desenvolvimento da nefropatia diabética após o uso de alisquireno e cromoglicato de sódio em ratos Wistar				

Reuniu-se de forma Virtual, pela Plataforma Google Meet, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, assim composta: Professores Doutores: **Mara Rúbia Nunes Celes – UFU; Erica Carolina Campos – UFU e Luiz Borges Bispo da Silva – UFU**, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Dr. **Luiz Borges Bispo da Silva – UFU**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, às examinadoras, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Borges Bispo da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/01/2021, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erica Carolina Campos Pulici, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/01/2021, às 18:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mara Rúbia Nunes Celes, Usuário Externo**, em 29/01/2021, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2526092** e o código CRC **9CE8FB3B**.

MATEUS JACINTO DA LUZ

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CROMOGLICATO DISSÓDICO NAS
ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS ASSOCIADAS AO INÍCIO DA
NEFROPATIA DIABÉTICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito parcial para
obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva
(Orientador-UFU)

Prof.^a Dra. Erica Carolina Campus
(Examinadora- Faculdade de Fisioterapia-UFU)

Prof.^a Dra. Mara Rúbia Nunes Celes
(Examinadora- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-UFG)

UBERLÂNDIA

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, sem o qual não existiríamos. Muito obrigado por ser minha força e meu guia em todos os momentos da minha vida.

Gostaria de agradecer imensamente aos meus pais Lucelia e Marcelo, que sempre me incentivaram a estudar e batalhar pelos meus objetivos. Obrigado pelo apoio, força e amor incondicional, sem vocês a realização desse sonho não seria possível. Tenho a certeza de que são os melhores pais do mundo.

A minha família, em especial minha irmã Janaína e meus afilhados Diogo e Filipe, pelo apoio nos momentos difíceis e que compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

A minha amiga de infância Tairine, que sempre tornava meus momentos de solidão em alegria, me acolhendo em sua casa.

A todos os meus amigos que o Bloco 2A me proporcionou nessa caminhada do mestrado, Amanda, Rafaela, Táríka, Natália, Fernanda, Fer Bus, Maria Vitória e Ana Carolina, especialmente a Leia, o Bruno, e o Victor Augusto que durante esses anos foram minha segunda família, dividindo sonhos, sorrisos, lágrimas e lanches rsrs. Agradeço o Victor Augusto principalmente pela grande parceria e ajuda na realização desse projeto.

Aos meus colegas do laboratório de farmacologia pelo apoio demonstrado ao longo do mestrado.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular por todo conhecimento transmitido durante o curso, e pela convivência agradável no dia a dia. Em especial, ao meu orientador Luiz Bispo e minha co-orientadora Ana Paula, por exigir de mim muito mais do que eu imaginava ser capaz de fazer. Sou eternamente grato por terem compartilhado comigo a sabedoria e as experiências de vocês. Muito obrigado pelos verdadeiros ensinamentos nessa trajetória acadêmica. Vocês são exemplos de pesquisadores.

Ao corpo técnico, Simone, Daniele, Cris, Isabella e aos demais técnicos da instituição que sempre me auxiliaram nas atividades para o desenvolvimento desse projeto. Em especial a Taís por toda dedicação e paciência quando eu precisei.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro nesses anos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir”.

Augusto Cury

RESUMO

Os mastócitos apresentam ações antifibróticas e pró-fibróticas e parecem contribuir para o desenvolvimento da nefropatia diabética (ND). Apesar de existirem dados na literatura sobre o papel de alguns mediadores mastocitários na patogênese da ND, pouco é conhecido sobre os mecanismos celulares envolvidos no processo, em especial daqueles relativos à deposição renal de fibras de colágeno do tipo I e III. Assim, avaliamos o efeito do tratamento com cromoglicato dissódico (CR), droga que inibe a desgranulação mastocitária, sobre parâmetros morfofuncionais de rins de animais portadores de diabetes mellitus experimental, induzido pela administração de aloxana (50 mg/kg, i.v.). Animais controles ou diabéticos (glicemia >200 mg/dl) foram tratados ou não com CR (50 mg/kg/dia, i.p., do 7º dias após a indução até o 95º dia). No 90º dia, a excreção urinária de albumina (EUA) e a taxa de filtração glomerular (TFG) foram avaliadas. No 95º dia de experimento, após a aferição da pressão arterial sistólica (PAS), os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta e processamento dos rins. Secções do tecido renal foram submetidas a análises morfológicas (lâminas coradas com azul de toluidina ou vermelho de picrossírius) ou de imunohistoquímicas para detecção de α -actina de músculo liso (α -SMA) e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O DM aumentou a densidade e atividade mastocitária renal, a área do corpúsculo renal, a área do tufo glomerular, o peso relativo do rim, a deposição renal de fibras de colágeno do tipo III e a soma do colágeno do tipo I com o do tipo III, a EUA, e a expressão de PCNA túbulo-intersticial, mas diminuiu a TFG e não alterou a expressão renal de α -SMA, tão pouco a PAS. O tratamento com CR reverteu parcialmente às alterações observadas na densidade e atividade mastocitária, na área do corpúsculo renal, no peso relativo do rim, na deposição de fibras de colágeno no parênquima renal e na TFG. A área do tufo glomerular e a expressão de PCNA foram normalizadas pelo tratamento com CR, enquanto a EUA, a PAS e a expressão de α -SMA não foram modificadas. Esses dados sugerem que os aumentos na densidade e atividade mastocitárias renais contribuem para a deposição de colágeno túbulo-intersticial nos estágios iniciais da ND, mesmo na ausência de alterações na população renal de miofibroblastos. O tratamento com CR evidenciou efeitos renoprotetores que parecem estar relacionados à sua ação inibitória sobre a desgranulação mastocitária, bem como à sua capacidade de prevenir alterações morfofuncionais deletérias.

Palavras-chave: Miofibroblastos. α -actina de músculo liso. Taxa de filtração glomerular. Cromoglicato dissódico. Hipertrofia glomerular.

ABSTRACT

Mast cells have antifibrotic and pro-fibrotic actions and appear to contribute to the development of diabetic nephropathy (DN). Despite the role of some possible mast cell mediators in the pathogenesis of DN has been proposed, little is known about the cellular mechanisms involved in the process, mainly those concerning type I and III collagen deposition in the renal parenchyma. Therefore, we evaluated the effect of disodium cromoglycate (CG) treatment, a drug that inhibits mast cell degranulation, on the morphofunctional parameters of kidneys from rats with experimental diabetes mellitus (DM) induced by the administration of alloxan (50 mg/kg, i.v.). Control or diabetic animals (blood glucose > 200 mg/dl) were treated or not with CR (50 mg/kg/day, i.p., from the 7th day after DM induction until 95th day). Urinary albumin excretion (UAE) and glomerular filtration rate (GFR) were assessed on the 90th day. After systolic blood pressure (SBP) measurement, kidneys were collected from anesthetized animals on the 95th day. Kidney slides stained with toluidine blue or picosirius red were subjected to morphological analysis or immunohistochemistry to detect α -smooth muscle actin (α -SMA) or proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Renal mast cell density and activity, renal corpuscle and tuft glomerular area, kidney weight/body weight ratio, renal interstitial collagen deposition (type III, and the sum of type I with type III collagen), UAE, and tubulointerstitial PCNA expression were increased in diabetic animals. Despite DM decreased GFR, neither renal α -SMA expression nor SBP were altered by the disease. The alteration in renal mast cell density and activity, renal corpuscle area, kidney weight/body weight ratio, renal interstitial collagen deposition and GFR were partially reversed by CG treatment. Glomerular tuft area and tubulointerstitial PCNA expression were normalized by CG treatment, while UAE, SBP and renal α -SMA expression did not change. These data suggest that the increases in the density and activity of mast cells within the kidney in the early stages of DN contribute to tubulointerstitial collagen deposition even in the absence of alterations in the renal myofibroblast population. CG treatment showed renoprotective effects in diabetic rats which appears to be related to its mast cell stabilizing property and to its ability to prevent some detrimental morphofunctional alterations.

Keywords: Myofibroblast. α -smooth muscle actin. Disodium cromoglycate. Glomerular filtration rate. Glomerular hypertrophy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mediadores sintetizados e liberados pelos mastócitos.....	20
Figura 2- Mastócito em processo de desgranulação.....	21
Figura 3- Ações antifibróticas e pró-fibróticas dos mastócitos e os possíveis mediadores envolvidos.....	23
Figura 4- Resumo do Delineamento Experimental.....	33
Figura 5- Glicemia apresentada pelos animais dos diferentes grupos experimentais após a indução do DM ou sua simulação.....	34
Figura 6- Peso dos animais dos diferentes grupos experimentais antes e após a indução do DM.....	35
Figura 7- Volume urinário dos animais dos diferentes grupos experimentais antes e após a indução do DM.....	36
Figura 8- Presença de mastócitos no parênquima renal.....	37
Figura 9- Densidade de mastócitos no parênquima renal dos diferentes grupos experimentais	37
Figura 10- Peso relativo dos rins de animais dos diferentes grupos experimentais.....	38
Figura 11- Área do corpúsculo renal dos diferentes grupos experimentais.....	39
Figura 12- Área do tufo glomerular dos diferentes grupos experimentais.....	39
Figura 13- Área do espaço capsular dos diferentes grupos experimentais.....	40
Figura 14- Excreção urinária de albumina dos diferentes grupos experimentais.....	41
Figura 15- Taxa de filtração glomerular dos diferentes grupos experimentais.....	41
Figura 16- Pressão arterial sistólica dos diferentes grupos experimentais.....	42
Figura 17- Colágeno do tipo I e do tipo III nos rins de animais dos diferentes grupos experimentais.....	43
Figura 18- Imagens representativas da deposição de fibras de colágeno no parênquima renal.....	44
Figura 19- Imagens representativas da deposição de fibras de colágeno no parênquima renal de ratos diabéticos.....	45
Figura 20- Expressão glomerular e túbulo-intersticial de α -SMA no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.....	46
Figura 21- Imagens representativas da expressão de α -SMA em rins dos diferentes grupos experimentais.....	47
Figura 22- Número de células PCNA ⁺ glomerulares e túbulo-intersticiais no tecido renal dos	

diferentes grupos experimentais.....	48
Figura 23- Imagens representativas da expressão de PCNA em rins dos diferentes grupos experimentais.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA- American Diabetes Association

C- Grupo controle

CBX- Carboximetilcelulose

CCR- Grupo controle/cromoglicato

CEUA/UFU- Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia

CTGF- Fator de crescimento do tecido conjuntivo

CR- Cromoglicato dissódico

D- Grupo diabético

DCR- Grupo diabético/cromoglicato

DM- Diabetes mellitus

ECA- Enzima conversora de angiotensina

EUA- Excreção urinária de albumina

FGF - Fibroblast Growth Factor (fator de crescimento de fibroblastos)

IgE- Imunoglobulina E

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-16 - Interleucina 16

MBG- Membrana basal glomerular

MEC- Matriz extracelular

MMPs- Metaloproteinases de matriz

ND- Nefropatia diabética

PAS- Pressão arterial sistólica

PBS – Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato-salino)

PCNA- Proliferation Cell Nuclear Antigen (antígeno nuclear de proliferação celular)

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

SCF- Stem cell fator (fator de célula-tronco)

SRAA- Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TBI – Túbulo-intersticial

TFG- Taxa de filtração glomerular

TGF- β – Transforming growth factor β (fator de transformador do crescimento beta)

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

UFU- Universidade Federal de Uberlândia

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

α -SMA- α -Smooth Muscle Actin (alfa actina do músculo liso)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Diabetes mellitus	15
1.2 Nefropatia Diabética	16
1.3 Mastócitos	19
<i>1.3.1 Participação dos mastócitos no desenvolvimento da fibrose renal</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2 Participação dos mastócitos no desenvolvimento da nefropatia diabética</i>	<i>23</i>
1.4 Cromoglicato dissódico	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Considerações éticas	28
4.2 Animais	28
4.3 Indução de DM	28
4.4 Grupos experimentais	29
4.5 Análise Histoquímica	29
<i>4.5.1 Azul de Toluidina</i>	<i>30</i>
<i>4.5.2 Vermelho de picrossírius (Picrossirius Red)</i>	<i>30</i>
4.6 Análise imuno-histoquímica	30
<i>4.6.1 Avaliação dos resultados dos experimentos de imuno-histoquímica</i>	<i>31</i>
4.7 Análise morfolométrica	31
4.8 Determinação da Taxa de Filtração Glomerular (TFG)	32
4.9 Determinação da Excreção Urinária de Albumina (EUA)	32
4.10 Determinação da Pressão Arterial Sistólica (PAS)	32
4.11 Análise Estatística	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Glicemia	34
5.2 Caracterização do modelo de DM1	34
5.3 População Mastocitária Renal	36
5.4 Peso Relativo do Rim	38
5.5 Morfometria	38
5.6 Excreção Urinária de Albumina (EUA) e Taxa de Filtração Glomerular (TFG)	40

5.7 Pressão Arterial Sistólica (PAS)	42
5.8 Fibras de Colágeno	42
5.9 Expressão Renal de α-SMA	46
5.10 Expressão Renal de PCNA	48
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

O termo “diabetes mellitus” (DM) refere-se a um grupo de doenças metabólicas caracterizada por hiperglicemia (i.e., aumento da concentração de glicose sanguínea), resultante da deficiência na produção de insulina e/ou na sua ação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). Atualmente, 463 milhões de pessoas vivem com diabetes, o que representa 9,3% da população adulta com idade entre 20 e 79 anos; porém, se as tendências atuais persistirem, estima-se que haverá 578 milhões de adultos com diabetes até 2030 e 700 milhões em 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). No Brasil, cerca de 16,8 milhões de pessoas vivem com essa doença e nosso país ocupa o 5º lugar mundial em número de casos de diabetes, ficando atrás apenas da China, Índia, Estados Unidos e Paquistão (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

O aumento da prevalência do diabetes está associado a diversos fatores, tais como: rápida urbanização, maior frequência de estilo de vida sedentário, maior frequência de excesso de peso, crescimento e envelhecimento populacional e, também, à maior sobrevivência dos indivíduos com diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

Segundo a *American Diabetes Association* (ADA), o DM pode ser classificado em quatro categorias gerais, a saber: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e tipos específicos de diabetes devido a outras causas, por exemplo, diabetes monogênico, doenças do pâncreas exócrino e diabetes induzido por medicamentos ou produtos químicos (ADA, 2020). No entanto, os tipos de diabetes mais frequentes são o DM tipo 1, anteriormente conhecido como diabetes juvenil, que compreende cerca de 5 a 10% do total de casos, e o DM tipo 2, responsável por 90% do total de casos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

O DM tipo 1 pode ser classificado em tipo 1A e tipo 1B. No DM tipo 1A, a destruição das células β -pancreáticas é de etiologia autoimune e no DM tipo 1B a destruição das células β não tem causa conhecida (idiopático). A doença pode ser diagnosticada em crianças, adolescentes e, em alguns casos, adultos jovens, afetando igualmente homens e mulheres (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). Os sinais e sintomas incluem perda de peso, aumento da sede (polidipsia) e da micção (poliúria), fadiga, visão turva, aumento da fome (polifagia) e dificuldade na cicatrização de feridas (ADA, 2012).

Já o DM tipo 2 compreende uma deficiência relativa de insulina e resistência dos tecidos periféricos à sua ação (ADA, 2020). Em pelo menos 80 a 90% dos casos, associa-se

ao excesso de peso e a outros componentes da síndrome metabólica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

Ainda, sabe-se que o DM pode afetar diferentes órgãos/sistemas e, com o tempo, pode levar ao surgimento de complicações graves, as quais são amplamente divididas em microvasculares e macrovasculares (CHAWLA; CHAWLA; JAGGI, 2016). As complicações microvasculares incluem danos no sistema nervoso (neuropatia), no sistema renal (nefropatia) e no sistema ocular (retinopatia), enquanto as complicações macrovasculares consistem em insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (PAPATHEODOROU et al., 2018).

Desse modo, o DM é considerado uma doença de elevada prevalência, morbidade e mortalidade, constituindo-se em um dos maiores problemas de saúde em nível mundial. Assim, ressalta-se a necessidade de revisões das práticas dos serviços de saúde pública, bem como o desenvolvimento de novas estratégias eficazes para a prevenção, detecção e controle do DM e suas complicações (PAPATHEODOROU et al., 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

1.2 Nefropatia Diabética

Uma das complicações mais frequentes em pacientes com DM é a nefropatia diabética (ND), a qual afeta de 25 a 35% dos pacientes com DM tipo 1 ou tipo 2. (TSCHIEDEL, 2014; DONATE-CORREA et al., 2020; KHOURY; CHEN; ZIYADEH, 2020). A ND está associada a alterações patológicas estruturais e funcionais que afetam todo o rim (glomérulo, túbulos, vasculatura e interstício), caracteriza-se por hiperfiltração com níveis aumentados de excreção urinária de albumina (EUA), progressivamente de microalbuminúria a macroalbuminúria, que são seguidas por um declínio progressivo da função renal (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013; KHOURY; CHEN; ZIYADEH, 2020). Assim, a ND pode ser dividida em cinco estágios principais, a saber: (I) hiperfiltração, caracterizada por aumento na taxa de filtração glomerular (TFG) (elevação do *clearance* da creatinina) e normoalbuminúria; (II) estágio silencioso, com TFG normal associada a mudanças estruturais significativas, incluindo espessamento da membrana basal e expansão mesangial; (III) nefropatia incipiente ou microalbuminúria, com EUA entre 20-200 µg/min ou 30-300 mg/24 h e TFG reduzida, normal ou aumentada; (IV) macroalbuminúria, com EUA superior a 200 µg/min ou 300 mg/24 h, e aparecimento de hipertensão; (V) insuficiência renal, caso em que os pacientes necessitam de diálise ou transplante (PAPADOPOULOU-

MARKETOU; CHROUSOS; KANAKA-GANTENBEIN, 2017). A evolução progressiva desses estágios é causada por alterações estruturais, inicialmente evidenciadas por acúmulo gradual da matriz extracelular (MEC) na membrana basal e mesângio glomerular e, posteriormente, pela formação de nódulos mesangiais (Kimmestiel-Wilson), com extensas lesões túbulo-intersticiais adicionais (GROSS et al., 2005; TSCHIEDEL, 2014; KHOURY; CHEN; ZIYADEH, 2020). Aumento na expressão de marcadores de proliferação celular em diferentes compartimentos, como no diafragma podocitário e células túbulo-intersticiais, também já foram relatados em rins de animais diabéticos (GROSS et al., 2003).

A compreensão atual da patogênese da ND aponta o envolvimento de diversos fatores, tais como: alterações hemodinâmicas (que desencadeiam o aumento da pressão sistêmica e intraglomerular), alterações metabólicas, estresse oxidativo, fibrose e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (WOLF, 2004; DURVASULA; SHANKLAND, 2008).

O SRAA é fundamental para o controle dinâmico da volemia e da resistência vascular periférica, sendo regulado pelos níveis de renina. Em resposta à diminuição do volume sanguíneo renal, dentre outros fatores, a renina é liberada pelas células do aparelho justaglomerular na circulação e converte o angiotensinogênio, liberado pelo fígado, em angiotensina I, a qual é posteriormente convertida em angiotensina II por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA), encontrada principalmente no endotélio vascular e plasma. A hiperglicemia também causa a ativação do SRAA mediante a estimulação da produção e secreção de renina pelos rins. A ativação desse sistema em pacientes com DM aumenta os níveis de angiotensina II, peptídeo que atua como um importante mediador das alterações fisiopatológicas da ND (WOLF, 2004; DURVASULA; SHANKLAND, 2008). Nesse contexto, a angiotensina II promove contração vascular e estimula o sistema nervoso autônomo simpático, promovendo maior liberação de noradrenalina, o que determina vasoconstrição sistêmica e renal; como resultado da vasoconstrição da arteríola eferente há aumento na filtração glomerular. A angiotensina II atua sobre mecanismos de proliferação e reparo celulares, na expansão da MEC, gerando hipertrofia ou hiperplasia, inflamação e fibrose tecidual (FERREIRA; ZANELLA, 2000; KAGAMI, 2012; LAVOZ et al., 2012).

Uma alteração estrutural renal que guarda relação com a fibrose é o nível de expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) (FALKE et al., 2015). A actina é a principal proteína do sistema de microfilamentos de células eucarióticas e estudos demonstram que a presença de α -SMA em rins adultos, em condições de normalidade, está restrita a regiões peritubulares e à musculatura lisa dos vasos (onde desempenha função contrátil). Contudo, em condições

patológicas, várias células renais podem apresentar modificações significativas em seus fenótipos, passando a expressar α -SMA e tornando-se capazes de sintetizar mais colágeno; no contexto de doenças renais, um fenótipo de fibroblasto que expressa α -SMA merece destaque, o miofibroblasto (JOHNSON et al., 1991; GONLUSEN et al., 2001; FALKE et al., 2015). Nesse sentido, aumentos na expressão renal de α -SMA foram relatados em rins de animais diabéticos já no primeiro mês após a indução da doença, uma fase bastante precoce da ND, como sugere não só o tempo após indução, mas também a ausência de microalbuminúria nos animais avaliados (LI; QU; BERTRAM; 2009). O aumento precoce na expressão de α -SMA túbulo-intersticial se associou a aumentos na expressão de colágeno do tipo IV nessa região (LI; QU; BERTRAM; 2009). Por outro lado, a elevação na expressão de colágeno do tipo IV na matriz mesangial ocorreu na ausência de alterações na expressão glomerular de α -SMA (YOUNG et al., 1995). Cabe ressaltar que nem todos os estudos observaram aumentos na expressão glomerular de α -SMA um mês após a indução; alguns autores relatam alterações muito precoces (três dias após a indução), com normalização em um mês (YOUNG et al., 1995), e outros relatam alterações mais tardias (24 semanas) (MAKINO et al., 1996; LI; QU; BERTRAM; 2009). O aumento tardio na expressão de α -SMA é uma observação mais consistente com a qual os autores concordam. De qualquer forma, a avaliação da expressão de α -SMA em rins de portadores de DM certamente auxilia na compreensão da evolução dos eventos patológicos associados à ND e, associada à análise do colágeno tecidual, representa uma ferramenta importante para a elucidação dos mecanismos envolvidos nessa e em outras doenças.

Trabalhos sugerem que a inflamação, juntamente com o estresse oxidativo e a fibrose, são fundamentais no surgimento e curso da ND. Há relatos na literatura de que monócitos, macrófagos, linfócitos e mastócitos infiltram o tecido renal exposto ao ambiente hiperglicêmico (MORIYA et al., 2004; LIM; TESCH, 2012). Por conseguinte, existem várias pesquisas em desenvolvimento com o intuito de investigar novas estratégias terapêuticas para o tratamento da ND tendo como alvo células do sistema imunológico (DONATE-CORREA et al., 2020). Recentemente, nosso grupo de pesquisa (DE MORAIS et al., 2018) avaliou as repercussões do bloqueio farmacológico do SRAA (enalapril, losartan e alisquireno) sobre parâmetros estruturais e funcionais de rins de ratos Wistar com DM tipo 1 induzido pela administração de aloxana. Na dependência do tratamento empregado, observou-se, nos animais diabéticos, redução nas alterações estruturais glomerulares (enalapril, um inibidor da ECA), melhora da função renal (alisquireno, um inibidor de renina) e redução da EUA (enalapril). Uma observação intrigante, e que guarda relação com células do sistema

imunológico, foi o fato do DM se associar a um aumento significativo no número de mastócitos no parênquima renal, o qual foi normalizado pelo tratamento com alisquireno. Tal constatação sugere que possa haver alguma relação entre essas células e o SRAA na orquestração da fisiopatologia da ND (DE MORAIS et al., 2018), algo que permanece por ser elucidado.

1.3 Mastócitos

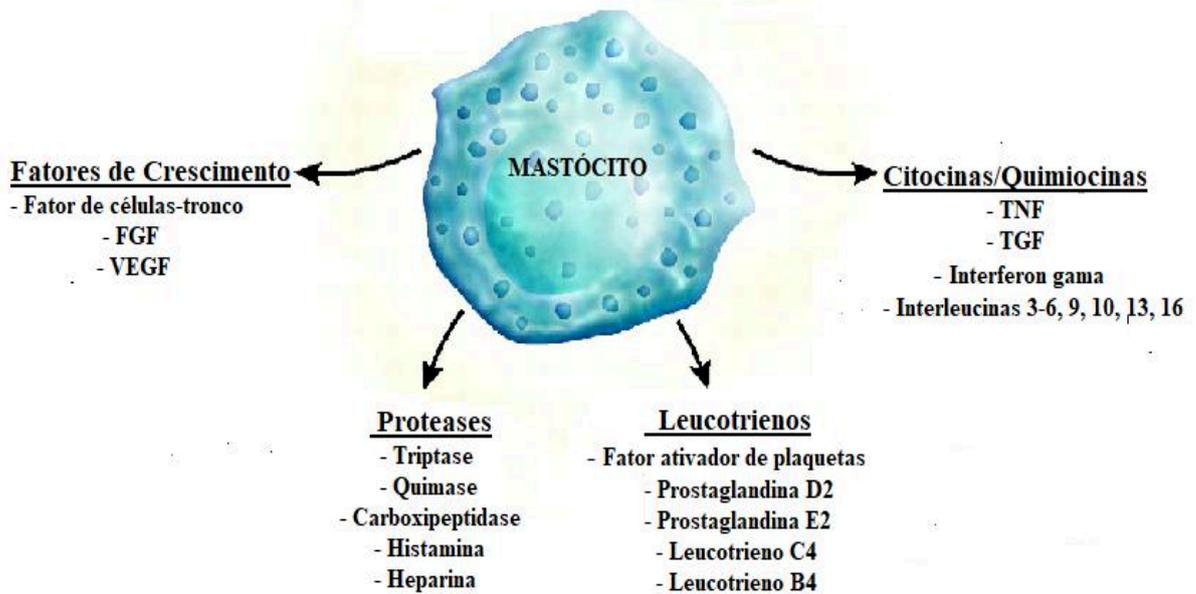
Os mastócitos são células multifuncionais importantes do sistema imunológico que se originam de progenitores pluripotentes da medula óssea (AMIN, 2012; KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016). Essas células circulam no sangue e migram para os tecidos periféricos onde amadurecem sob a influência do fator de células-tronco (SCF – *Stem Cell Factor*) e de várias citocinas do microambiente local, gerando o fenótipo de mastócito maturo. Ainda, desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro, na inflamação e no reparo tecidual (ZIZI et al., 2011; REDEGELD et al., 2018). Cabe ressaltar que estas células podem estar presentes em todo o corpo, incluindo rins e coração, e participam ativamente nos processos de reparo e remodelamento em todos os tecidos (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016).

Morfologicamente, os mastócitos são alongados quando presentes no tecido conjuntivo, e quando isolados da cavidade peritoneal apresentam-se arredondados. Possuem citoplasma repletos de grânulos metacromáticos (50 a 200 grânulos), os quais podem ser corados com corantes básicos, como o azul de toluidina (YONG, 1997).

Os mastócitos também possuem a capacidade de sintetizar e liberar diversos mediadores biologicamente ativos, que incluem fatores de crescimento, proteases, leucotrienos, citocinas e quimiocinas (YONG, 1997; GALLI; NAKAE; TSAI, 2005). Esses mediadores são agrupados em: **a) fatores pré-formados:** histamina, heparina, β -hexosaminidase, proteoglicanos, proteases (quimase, triptase, carboxipeptidase A), algumas interleucinas (IL-8 e IL-16), citocinas e fatores de crescimento, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*); **b) fatores neo-formados:** mediadores sintetizados logo após a ativação mastocitária, alguns são derivados do metabolismo do ácido araquidônico, como a prostaglandina D₂, leucotrienos (como por exemplo, leucotrieno C₄ e fator ativador de plaquetas) e tromboxano; **c) fatores neo-sintetizados:** destacam-se as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6, cuja síntese ocorre dentro de a 8-12 h após a

desgranulação (Figura 1) (YONG, 1997; GALLI; NAKAE; TSAI, 2005; DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014).

Figura 1- Mediadores sintetizados e liberados pelos mastócitos.

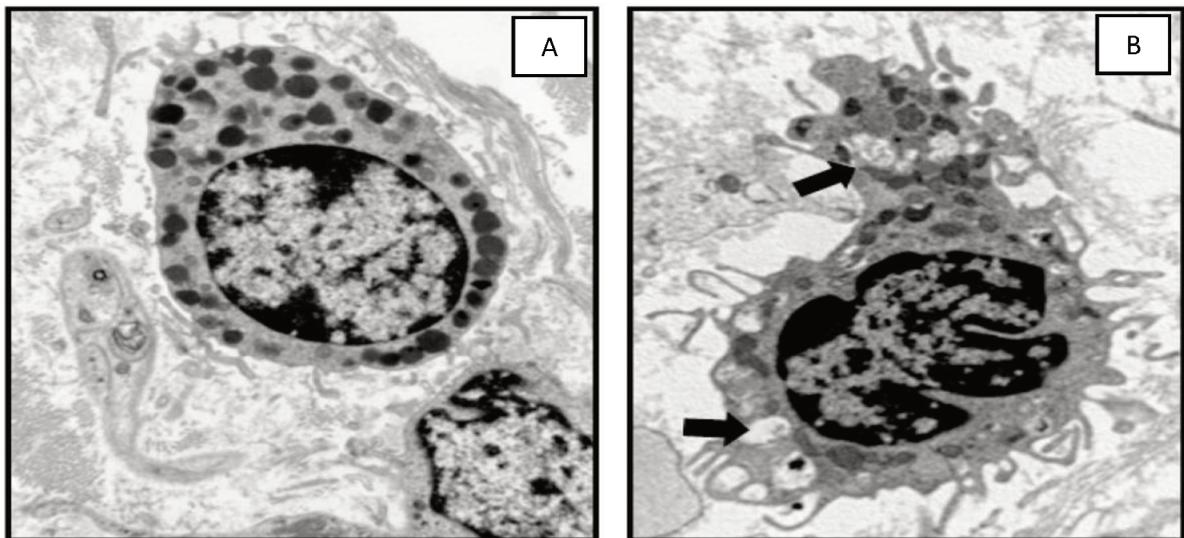


Fonte: Adaptado de HOLDSWORTH; SUMMERS, 2008.

Liberação de mediadores pré-formados, neo-formados e neo-sintetizados pelos mastócitos quando ativados (processo de desgranulação). Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF); Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF); Fator de Necrose Tumoral (TNF); Fator de Transformação do Crescimento (TGF).

A membrana dos mastócitos apresenta receptores de alta afinidade para as moléculas de imunoglobulina E (IgE) e são ativados quando há ligação cruzada de antígenos com essa imunoglobulina. Estímulos independentes dessa ligação também podem ocorrer, como é o caso da ativação por neuropeptídios ou agentes físicos (trauma mecânico, calor e frio), por exemplo. Dessa maneira, os mastócitos desgranulam quando ativados (Figura 2) e os fatores pré-formados são liberados no espaço extracelular, seguidos pela liberação dos mediadores neo-formados (BISPO-DA-SILVA et al., 2010; CRUVINEL et al., 2010).

Figura 2- Mastócito em processo de desgranulação.



Fonte: ALBERT-BAYO et al., 2019.

Micrografias eletrônicas representativas de mastócitos humanos de mucosa intestinal. Em (A), note um mastócito em repouso com grânulos citoplasmáticos intactos, exibindo membrana plasmática regular. Em (B), perceba um mastócito ativado apresentando desgranulação gradativa com perda de eletrodensidade intragranular (seta preta). Aumento 12.000x.

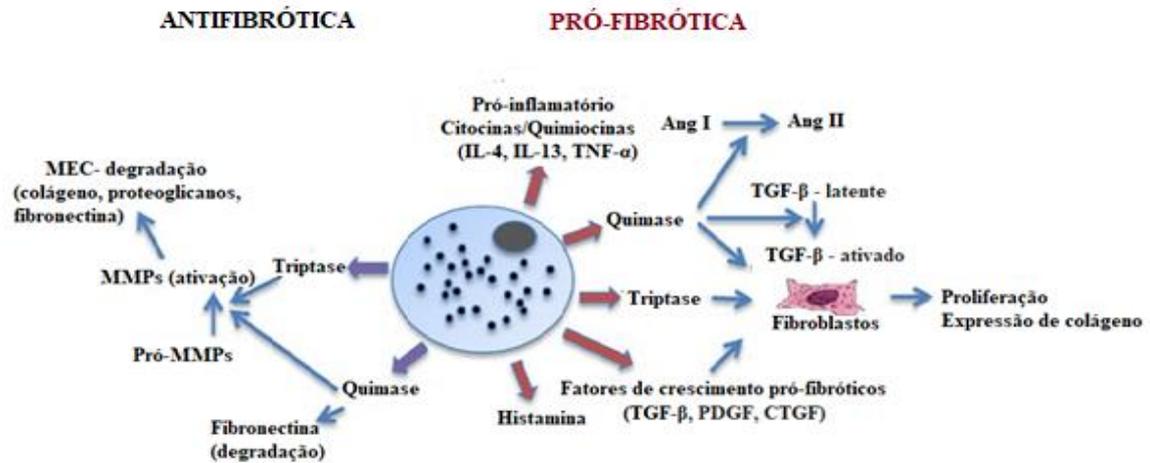
Logo, a ampla variedade de mediadores liberados pelos mastócitos altera o microambiente em que estão e lhes permite desenvolver e modular diversos processos fisiológicos e patológicos (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016). Com relação às funções fisiológicas normais, os mastócitos participam na regulação da vasodilatação, homeostase vascular, bem como nas respostas imunes inatas e adaptativas, porém, contribuem para a fisiopatologia de muitas doenças, incluindo alergia, asma, distúrbios gastrointestinais, doenças renais, doenças cardiovasculares e nas complicações do diabetes (SHI; SHI, 2012; DEBRUIN et al., 2015; KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016).

1.3.1 Participação dos mastócitos no desenvolvimento da fibrose renal

A fibrose renal é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular, principalmente de fibras de colágeno, que remodela a citoarquitetura do tecido e prejudica a função dos rins (DJUDJAJ; BOOR, 2019). Um evento característico visto em muitas condições fibróticas renais é o acúmulo de mastócitos, sugerindo que essas células possam contribuir para o desenvolvimento da fibrose renal (HOLDSWORTH; SUMMERS, 2008).

Nesse sentido, a triptase de mastócitos parece ter um papel importante, uma vez que o número de mastócitos triptase-positivos nos rins correlacionou-se com o grau da fibrose; ainda, a triptase mastocitária estimulou a proliferação de fibroblastos *in vitro*, bem como a síntese de colágeno e fibronectina por essas células (KONDO et al., 2001). Ainda, vários estudos sugerem que os mastócitos participam na instalação de fibrose renal observada após amarração ureteral, um modelo experimental de doença renal (VEERAPPAN et al., 2012; SUMMERS et al., 2012; DE OLIVEIRA-SILVA et al., 2018). Apesar dessas observações sugerirem fortemente que a liberação de mediadores pró-fibróticos pelos mastócitos permite a ativação e proliferação de fibroblastos e o desenvolvimento de fibrose em diversas patologias renais, o assunto ainda é controverso. Kanasaki, Taduri e Koya (2013), em uma revisão sobre o tema, ressaltaram que experimentos realizados com animais deficientes em mastócitos sugerem um papel renoprotetor para essas células. De fato, Miyazawa e colaboradores (2004) observaram, em animais deficientes em mastócitos, um aumento na fibrose renal após nefrectomia unilateral, associado a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-4 e TGF- β 1). Ainda, Bradding e Pejler (2018) ressaltam que os mastócitos possuem tanto ações pró-fibróticas como antifibróticas (Figura 3). Esses autores sugerem que a dualidade na atuação dos mastócitos na instalação da fibrose depende do tempo e/ou frequência da injúria tecidual: na vigência de estímulos breves, a ação antifibrótica prevaleceria, enquanto durante estímulos crônicos ou repetitivos, a ação pró-fibrótica se expressaria (BRADDING; PEJLER, 2018).

Figura 3- Ações antifibróticas e pró-fibróticas dos mastócitos e os possíveis mediadores envolvidos.



Fonte: Adaptado de BRADDING; PEJLER, 2018.

Matriz Extracelular (MEC); Metaloproteinases da Matriz (MMPs); Angiotensina I (Ang I); Angiotensina II (Ang II); Interleucina 4 (IL-4); Interleucina 3 (IL-13); Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α); Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β); Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF); Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (CTGF).

1.3.2 Participação dos mastócitos no desenvolvimento da nefropatia diabética

Em humanos saudáveis ou em portadores de ND, os mastócitos são encontrados no córtex e na medula renal. Essas células estão distribuídas difusamente no interstício, especialmente em regiões peritubulares, perivasculares e periglomerulares (ZHENG et al., 2012). Com a progressão da doença, observa-se um aumento no nível de desgranulação mastocitária em rins de pacientes com ND, o que sugere o envolvimento de mediadores mastocitários, como TNF- α , TGF- β 1, renina, quimase e triptase, no desenvolvimento dessa condição (ZHENG et al., 2012). De fato, foi demonstrado um aumento de TNF- α nos glomérulos de portadores de ND associado à hipertrofia renal e microalbuminúria (KALANTARINIA; AWAD; SIRAGY, 2003). O papel prejudicial dessa citocina foi sugerido pela observação de que a administração de infliximab, um anticorpo anti-TNF- α , diminuiu significativamente a EUA (KALANTARINIA; AWAD; SIRAGY, 2003). Além disso, o tratamento com um anticorpo anti-TGF- β reduziu a proteinúria, inibiu a fibrose renal e produziu efeitos renoprotetores em ratos com ND (BENIGNI et al., 2006). Foi demonstrado que a desgranulação mastocitária libera renina e que mastócitos de rins de pacientes com ND expressam essa protease (SILVER et al., 2004; ZHENG et al., 2012); essas observações

aliadas ao fato de que a renina regula positivamente a expressão gênica do TGF- β 1 em células mesangiais de rim de rato, independentemente da geração de angiotensina II, sugere que esse mediador mastocitário possa contribuir duplamente para a progressão da doença (i.e, via angiotensina II e TGF- β 1) (HUANG et al., 2007). Nesse sentido, o tratamento com alisquireno atenuou acentuadamente o desenvolvimento da glomerulosclerose em um modelo de ND avançada (KELLY et al., 2007). Zhang e colaboradores (2016) mostraram que a inibição da quimase reduziu a EUA e a deposição de componentes da MEC nos rins de ratos diabéticos, efeitos que foram atribuídos à redução da expressão de VEGF e TGF- β 1. Utilizando um modelo experimental de DM em ratos Wistar, após sete semanas de tratamento com estabilizador de membrana de mastócitos (cetotifeno), Khurana, Sharma e Budhiraja (2011) relataram que o tratamento não produziu efeitos significativos sobre a expressão de colágeno, mas que houve melhora significativa na função renal.

Cabe ressaltar que apesar da maioria dos estudos realizados até o momento apontarem os mastócitos como células importantes no desenvolvimento da ND, existem dados controversos sobre se isso requer ou não o aumento dessas células no parênquima renal. Assim, Wasse e colaboradores (2012) relatam que os mastócitos predominam no interstício de rins doentes e que sua quantidade se correlaciona com a gravidade de doenças túbulo-intersticiais, incluindo ND. Ressaltam que o acúmulo dessas células é inversamente proporcional ao declínio da TFG e à progressão da doença renal. Aumentos na quantidade de mastócitos nos rins de animais e pacientes com DM também foram relatados por outros autores (OKON; STACHURA, 2007; KHURANA; SHARMA; BUDHIRAJA, 2011; ZHENG et al., 2012; DE MORAIS et al., 2018). Por outro lado, Cristovan et al. (2012) e Zhang et al. (2016) não observaram alterações no número de mastócitos em rins de ratos com DM.

1.4 Cromoglicato dissódico

Constata-se que a desgranulação mastocitária contribui para a fisiopatologia de diversas doenças, assim como para as complicações decorrentes do diabetes. Por conseguinte, a estabilização da membrana celular dos mastócitos, e a conseqüente ausência ou redução da liberação de mediadores biologicamente ativos, pode levar à diminuição de efeitos prejudiciais dessas células no organismo. São exemplos de inibidores farmacológico da desgranulação mastocitária: nedocromil sódico, cetotifeno, pemirolaste de potássio, tranilaste,

olopatadina, cromoglicato dissódico (ou cromoglicato de sódio) (CR), entre outros (MOUNSEY; GRAY, 2016).

O CR é uma substância que atua inibindo a desgranulação mastocitária. Tal efeito ocorre pela capacidade que o CR possui de limitar o influxo de cálcio na célula e pelo bloqueio de canais de cloreto na membrana plasmática dos mastócitos (LAW et al., 2011). Além disso, em uma revisão sobre o tema, Sinniah, Yazid e Flower (2017) relataram que o CR possui várias outras ações farmacológicas não relacionadas com a atividade mastocitária, as quais podem ser classificadas como anti-inflamatórias, a saber: inibição da ativação e migração de leucócitos polimorfonucleares; ativação de macrófagos; ação sob a taquicinina; inibição da liberação de citocinas e eicosanoides, bem como redução na expressão de moléculas de adesão. Contudo, considerando seu efeito primário sobre a atividade mastocitária, o CR torna-se uma ferramenta importante em estudos que avaliam a participação dos mastócitos em diferentes condições patológicas.

2 JUSTIFICATIVA

A controvérsia sobre o papel protetor ou deletério dos mastócitos em doenças renais, bem como aquela que envolve o aumento da densidade mastocitária em rins de indivíduos com DM reforçam a necessidade da realização de mais estudos no sentido de possibilitar a construção de um modelo conceitual mais robusto sobre o assunto. Ainda, apesar da participação dos mastócitos para as alterações renais associadas ao DM já ter sido sugerida na literatura científica, a maioria dos estudos investigou os possíveis mediadores envolvidos. Contudo, pouco é conhecido sobre os mecanismos celulares subjacentes, em especial no que tange à deposição de fibras de colágeno do tipo I e III, cujas sínteses por fibroblastos renais estão aumentadas em ambiente hiperglicêmico (HAN et al., 1999; LAM et al., 2003). Além disso, apesar de alguns dados prévios sobre os efeitos do CR no tecido renal de ratos com DM1 terem sido relatados (MEDAPATI; PAPANANI; BUDHIRAJA, 2012), pouco se conhece sobre os efeitos dessa droga na deposição de colágeno renal e na população de miofibroblastos nesse órgão.

Assim, considerando que a fibrose renal representa um importante componente fisiopatológico da ND, e que os mastócitos são capazes de alterar a fibrose em inúmeras circunstâncias, testamos as hipóteses de que o tratamento de animais diabéticos com CR pudesse alterar a deposição renal de fibras de colágeno do tipo I e III associada ao início da ND, e que essa alteração teria relação com a diminuição de células produtoras de colágeno (inferidas pela expressão de α -SMA). Parâmetros morfofuncionais gerais também foram avaliados objetivando-se explorar de forma pormenorizada o potencial uso do CR no tratamento da ND.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com CR, sobre as alterações morfológicas e funcionais dos rins de ratos Wistar portadores de DM tipo I experimental induzido por aloxana.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar a densidade de mastócitos íntegros e desgranulando nos rins de animais controles e diabéticos, tratados ou não com CR;
- 2) Analisar as áreas dos corpúsculos renais, tufo glomerulares e espaços capsulares de animais controles e diabéticos, tratados ou não com CR;
- 3) Quantificar a porcentagem de fibras de colágeno do tipo I e III no tecido renal de animais controles e diabéticos, tratados ou não com CR;
- 4) Quantificar a expressão de PCNA e α -SMA no tecido renal de animais controles e diabéticos, tratados ou não com CR;
- 5) Avaliar a função renal por meio da TFG (*clearance* de creatinina) e EUA dos animais controles e diabéticos, tratados ou não com CR;
- 6) Avaliar a pressão arterial sistólica dos animais controles e diabéticos, tratados ou não com CR;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Todos os protocolos deste estudo foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU: 073/18; ANEXO).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) de 12 semanas de idade, pesando entre 200 e 300g. Os animais foram fornecidos pela Rede de Biotério de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) e mantidos nesse departamento. Os animais foram acondicionados em caixas com maravalha, em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, e tiveram livre acesso à água e ração.

4.3 Indução de DM

Antes da indução, os animais foram pesados e colocados em gaiolas metabólicas para a determinação do volume urinário. O DM foi induzido pela administração do análogo tóxico da glicose, aloxana (Sigma-Aldrich). Essa droga é captada pelas células beta pancreáticas, causa necrose celular e inibe a secreção endógena de insulina. Tais efeitos gera um quadro que mimetiza o DM tipo 1 (LENZEN, 2008).

Assim, após um período de jejum absoluto de 24 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (25 mg/kg, i.p.; Thiopentax®, Cristália) e receberam aloxana [50 mg/kg, i.v. (veia peniana), em salina 0,9%]. Decorridas 24 horas da indução, a glicemia capilar dos animais foi determinada por meio de um glicosímetro (Accu Check Active, Roche). Ratos com glicemia superior a 200 mg/dl foram considerados diabéticos e receberam insulina NPH (Humulin N®, Lilly; 1 UI/dias alternados, s.c.); esse procedimento objetivou manter os animais em condição hiperglicêmica, porém, minimizando a alta mortalidade associada ao modelo de DM empregado neste estudo (DE MORAIS et al., 2018).

4.4 Grupos experimentais

Após sete dias da indução, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo Controle (C):** animais submetidos à simulação da indução de DM (não diabéticos) e que receberam injeção intraperitoneal de carboximetilcelulose (CBX, 0,5%, 1ml/kg/dia).
- **Grupo C + CR:** animais submetidos à simulação da indução de DM (não diabéticos) e que receberam injeção intraperitoneal de CR (50 mg/ml/kg/dia) em CBX 0,5%.
- **Grupo Diabético (D):** animais com DM e que receberam injeção intraperitoneal de CBX 0,5% (1ml/kg/dia).
- **Grupo D + CR:** animais com DM e que receberam injeção intraperitoneal de CR (50 mg/ml/kg/dia) em CBX 0,5%.

Após 90 dias de tratamento, os animais foram pesados e colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta e determinação do volume de urina. Posteriormente, realizou-se a coleta de sangue (ordenha da cauda) para a verificação da glicemia, determinação da EUA e TFG pelo *clearance* de creatinina. No nonagésimo quinto dia, os ratos foram anestesiados com halotano (Cristália) e submetidos a um procedimento cirúrgico para remoção dos rins que, em seguida, foram pesados, fixados em methacarn por 24 horas e, posteriormente, lavados e mantidos em álcool 70%. Por fim, os rins foram incluídos em parafina.

4.5 Análise Histoquímica

A partir dos rins emblocados em parafina, foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura com o auxílio de um micrótomo (Lupetec). Os cortes foram submetidos às seguintes colorações:

4.5.1 Azul de Toluidina

A coloração com azul de toluidina em pH ácido permite a identificação dos mastócitos, cujos grânulos são metacromáticos e desenvolvem uma coloração púrpura. Assim, as secções histológicas foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com azul de toluidina. A quantificação dos mastócitos e a determinação da ativação dessas células (i.e., mastócitos desgranulando ou íntegros) foram realizadas por microscopia óptica (microscópio Olympus), utilizando-se lente objetiva de 40x. Para a determinação da densidade mastocitária, as lâminas foram escaneadas (HP scanjet 2400) e as áreas das secções teciduais foram determinadas utilizando-se o programa *Image J* (versão 1.53) devidamente calibrado.

4.5.2 Vermelho de picrossírius (*Picrosirius Red*)

A combinação da coloração com vermelho de picrossírius e a luz polarizada fornece uma ferramenta para a análise estrutural do colágeno (MONTES; JUNQUEIRA, 1991; RICH; WHITTAKER, 2005). Assim, essa coloração é um dos métodos mais utilizados para evidenciar a presença de fibras colágenas nos tecidos, especialmente as fibras de colágeno mais espessas (colágeno do tipo I) e as fibras de colágeno mais finas e dispersas (colágeno do tipo III). Para a quantificação do colágeno do tipo I e III, as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas, coradas com vermelho de picrossírius e observadas ao microscópio óptico (Nikon) equipado com filtro de polarização. Fotomicrografias de todo córtex renal foram então obtidas utilizando-se lente objetiva de 10x, e as imagens foram analisadas pelo programa *Image J* (versão 1.53). Os valores obtidos foram expressos como porcentagem de área marcada.

4.6 Análise imuno-histoquímica

Secções de tecido renal foram desparafinizadas para a realização de imuno-histoquímica. Assim, os cortes foram incubados com os anticorpos primários monoclonais anti- α SMA (*α -smooth muscle actin*; 1:1000, DAKO Corporation, Denmark) overnight, a 4°C e anti-PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*; 1:1000, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) durante 30 minutos em temperatura ambiente. Para as lâminas empregadas como controle negativo essa etapa não foi realizada. Secções de rins de ratos com um dia de vida foram empregadas como controle positivo, já que a expressão de α -SMA e PCNA

encontra-se bastante aumentada nessa fase da vida dos animais (FRANÇA-SILVA; OLIVEIRA; BALBI, 2016).

Em seguida, os cortes foram submetidos à incubação com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (1:200 – monoclonal, Vector Laboratories). 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. A contracoloração foi feita com metilgreen. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado através da incubação dos tecidos com albumina bovina (BSA - Bovine Serum Albumin, Sigma Chemical Company) 5% em PBS.

4.6.1 Avaliação dos resultados dos experimentos de imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica para o anticorpo anti- α -SMA foi avaliada analisando-se a porcentagem do glomérulo e/ou do compartimento túbulo-intersticial (TBI) marcada nas secções de tecido renal. Para isso, atribuíamos um escore de 0 a 4, onde o escore 0 (zero) equivale a 0-5% do campo marcado, o escore 1 (um) a 5-25%, o escore 2 (dois) a 25-50%, o escore 3 (três) a 50-75% e o escore 4 (quatro) a 75-100% (KLIEM et al, 1996). Já as reações de PCNA foram analisadas pela contagem de células positivas por glomérulo ou compartimento TBI renal nas secções de tecido. As avaliações foram realizadas por microscopia óptica e o avaliador não estava ciente dos tratamentos.

4.7 Análise morfométrica

Para a análise do tecido renal, as lâminas coradas com vermelho de picrossírius foram fotografadas com auxílio de uma videocâmera acoplada ao microscópio (Olympus), utilizando-se objetiva de 10x. As imagens capturadas foram transmitidas para um computador, onde avaliou-se a morfometria das áreas do corpúsculo renal, tufo glomerular e espaço capsular, utilizando um software HL Image ++ 97 (Western Vision, Salt Lake City, UT, USA). Foram analisados aleatoriamente 20 campos de cada lâmina e as áreas pretendidas foram medidas em micrômetros ao quadrado.

4.8 Determinação da Taxa de Filtração Glomerular (TFG)

A função renal dos animais foi avaliada através da dosagem de creatinina plasmática e urinária por colorimetria (Labtest Diagnostica). Para isso, os animais foram colocados 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 por ordenha da cauda. A creatinina das amostras reage com o ácido pícrico formando o picrato de creatinina, composto que desenvolve cor amarelada. A absorbância foi obtida pela leitura das amostras no espectrofotômetro (Even) no comprimento de onda de 510 nm. A TFG foi calculada a partir da fórmula descrita abaixo:

$$\text{Clearance de creatinina (TFG)} = \text{Ucr} \times \text{V} / \text{Pcr}$$

Onde: Ucr: creatinina urinária; V: Fluxo urinário (ml/min) e Pcr: creatinina plasmática

4.9 Determinação da Excreção Urinária de Albumina (EUA)

A EUA foi determinada utilizando-se as amostras de urina coletadas nas gaiolas metabólicas, por colorimetria, com o auxílio do vermelho de pirogalol (Labtest Diagnostica). Essa substância reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul. A absorbância foi obtida pela leitura das amostras no espectrofotômetro (Even) no comprimento de onda de 600 nm, a qual foi diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

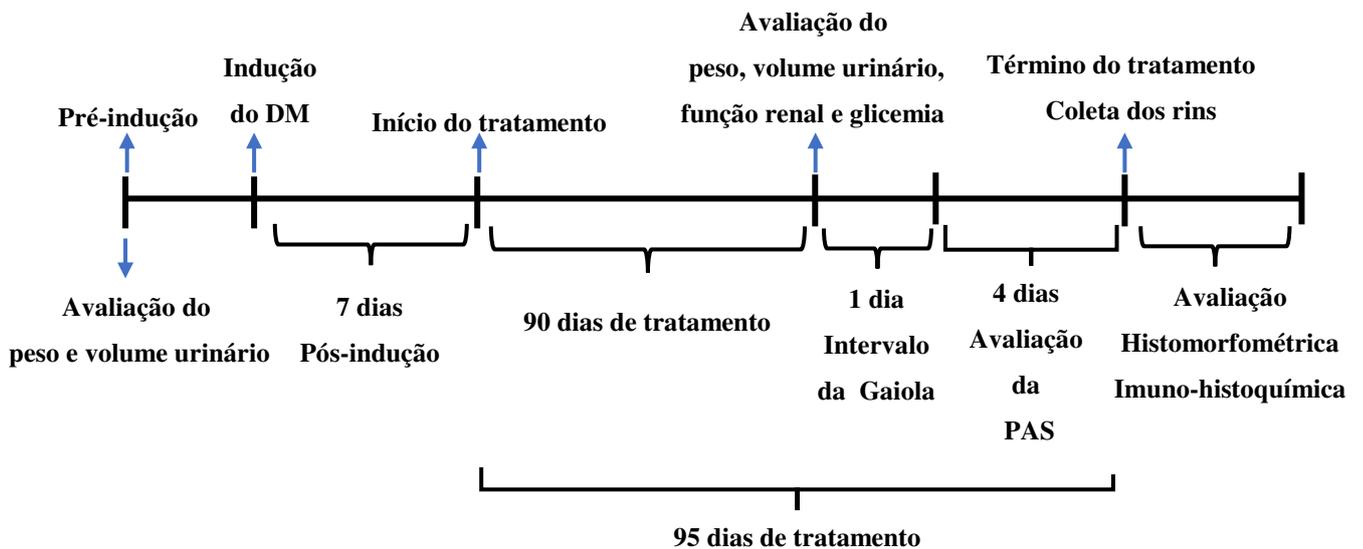
4.10 Determinação da Pressão Arterial Sistólica (PAS)

A PAS foi avaliada nos animais após 91 dias de tratamento de maneira indireta por pletismografia de cauda. 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 dos animais. Os sinais captados foram amplificados pelo software *PowerLab (ADInstruments)* e foram convertidos pelo *LabChart 7 Pro (ADInstruments)* em valores de PAS em mmHg. As medidas de PAS foram realizadas durante 4 dias consecutivos e, posteriormente, foi feita a média aritmética entre as medidas obtidas em cada dia.

4.11 Análise Estatística

Para os parâmetros analisados utilizamos o programa *GraphPad Prism* (versão 7.00-Trial), empregando-se o teste de Kolmogorov-Sminorv para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal (Gaussiana). Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por testes paramétricos, e os dados que não apresentaram distribuição normal foram avaliados por testes não paramétricos. Os testes usados para cada parâmetro estudado foram citados na seção dos resultados. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$).

Figura 4- Resumo do Delineamento Experimental.



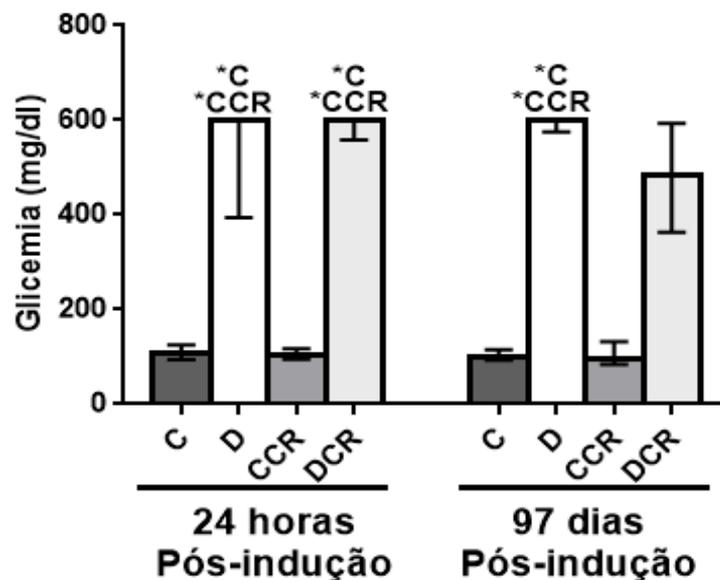
Fonte: O Autor, 2021.

5 RESULTADOS

5.1 Glicemia

A glicemia dos animais tratados com aloxana foi significativamente maior do que aquela de animais tratados com salina, 24 horas após a administração (Figura 5). Além disso, observou-se que os níveis glicêmicos dos animais diabéticos permaneceram aumentados após 90 dias de tratamento, e que o tratamento com CR reduziu discretamente a glicemia dos animais diabéticos (Figura 5).

Figura 5- Glicemia apresentada pelos animais dos diferentes grupos experimentais após a indução do DM ou sua simulação.



Fonte: O Autor, 2021.

Glicemia de ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR), 24 horas e 97 dias após a indução do DM. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Mediana com Intervalo Interquartil. *C $P < 0,05$ versus C; *CCR $P < 0,05$ versus CCR. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

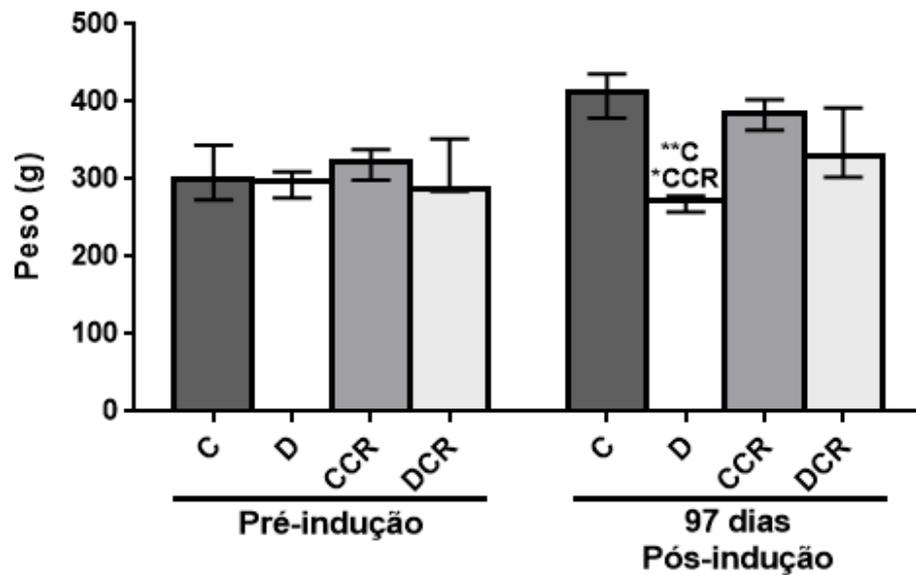
5.2 Caracterização do modelo de DM1

Os animais diabéticos apresentaram polidipsia, como sugerido pelo aumento da frequência de troca das garrafas de água desses animais quando comparados aos grupos controles ao longo dos 95 dias de tratamento (avaliação qualitativa).

Além disso, os animais do grupo D apresentaram diminuição significativa no peso quando comparados com os grupos controles. O tratamento com o CR se mostrou capaz de reverter parcialmente essa alteração produzida pelo DM (Figura 6).

Os animais diabéticos apresentaram maior volume urinário quando comparados com os grupos controles (Figura 7).

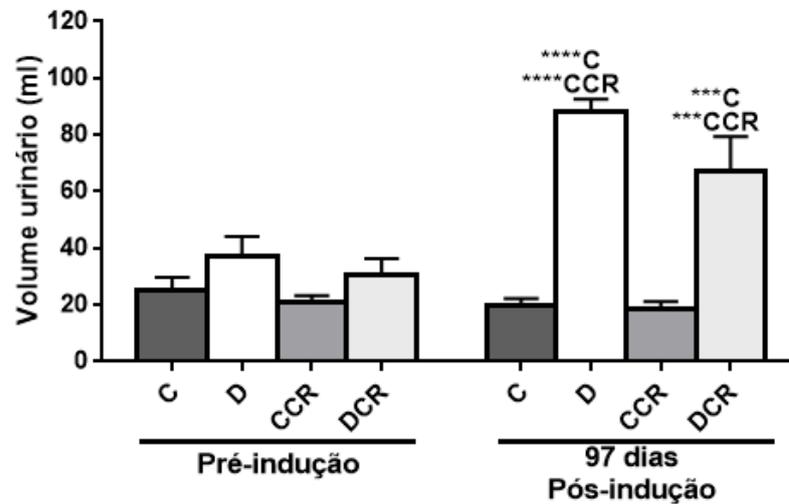
Figura 6- Peso dos animais dos diferentes grupos experimentais antes e após a indução do DM.



Fonte: O Autor, 2021.

Valores do peso de ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR), pré-indução e 97 dias após a indução. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Mediana e Intervalo Interquartil. **C P<0,01 versus C; *CCR P<0,05 versus CCR. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 7- Volume urinário dos animais dos diferentes grupos experimentais antes e após a indução do DM.



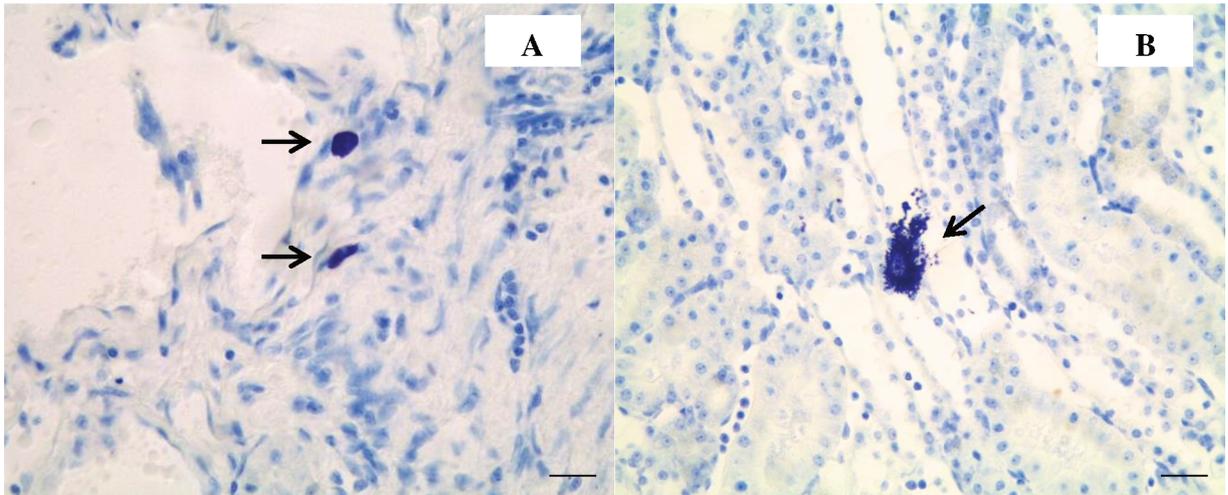
Fonte: O Autor, 2021.

Valores do volume urinário de ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR), pré-indução e 97 dias após a indução. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Média±EPM. ****C P<0,0001 versus C; ***C P<0,001 versus C; ****CCR P<0,0001 versus CCR; ***CCR P<0,001 versus CCR. ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.3 População Mastocitária Renal

A coloração das secções do tecido renal com azul de toluidina permitiu a quantificação de mastócitos íntegros e desgranulando no parênquima renal dos diferentes grupos experimentais (Figura 8). A densidade mastocitária mostrou-se significativamente aumentada no grupo D, e o tratamento dos animais com o CR reverteu parcialmente esse aumento (Figura 9). Com relação à densidade dessas células no seu estado ativado (estado de desgranulação), observou-se também um aumento no grupo D quando comparado com os grupos controles, e que o tratamento com CR diminui parcialmente a densidade de mastócitos desgranulando (Figura 9).

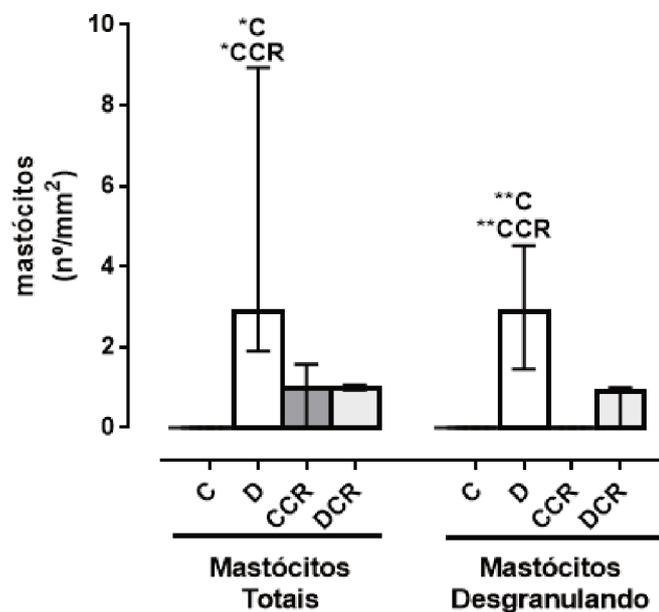
Figura 8- Presença de mastócitos no parênquima renal.



Fonte: O Autor, 2021.

Secções de rins de animais do grupo diabético coradas com azul de toluidina. Note a presença de mastócitos íntegros (seta) (A) e desgranulando (seta) (B) após 95 dias de tratamento com cromoglicato. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 40x. Escala = 50 μ m.

Figura 9- Densidade de mastócitos no parênquima renal dos diferentes grupos experimentais.



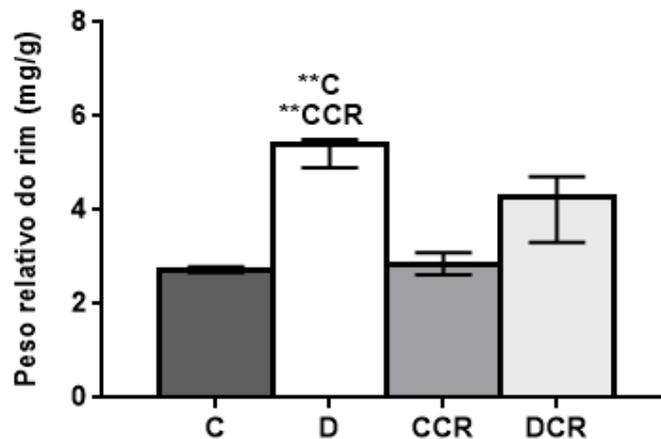
Fonte: O Autor, 2021.

Densidade de mastócitos totais (independentemente do estado de desgranulação) e densidade de mastócitos no estado de desgranulação no parênquima renal dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Mediana e Intervalo Interquartil. **C P<0,01 versus C; *C P<0,05 versus C; **CCR P<0,01 versus CCR; *CCR P<0,05 versus CCR. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

5.4 Peso Relativo do Rim

Ratos diabéticos apresentaram aumento significativo no peso relativo dos rins em comparação com os grupos controles. O tratamento com o CR impediu parcialmente a instalação dessa alteração induzida pelo DM (Figura 10).

Figura 10- Peso relativo dos rins de animais dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Peso relativo dos rins de ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Mediana com Intervalo Interquartil. **C P<0,01 versus C; **CCR P<0,01 versus CCR. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

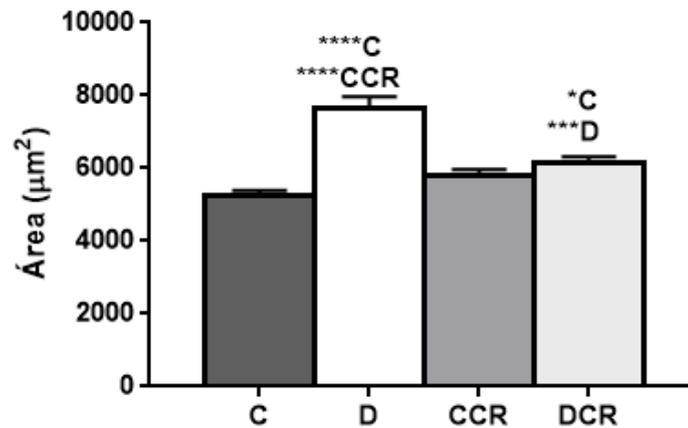
5.5 Morfometria

Quanto aos estudos morfométricos, notou-se que a área do corpúsculo renal foi maior nos animais do grupo D quando comparados com os grupos controles, e que o tratamento com o CR diminuiu parcialmente a área corpuscular (Figura 11).

Com relação à área do tufo glomerular, os animais do grupo D também apresentaram aumento significativo nesse parâmetro quando comparados com os grupos controles. Nesse caso, o tratamento com o CR se mostrou capaz de impedir o aumento do tufo glomerular produzido pelo DM (Figura 12).

Nenhuma alteração significativa na área do espaço capsular foi observada entre os grupos (Figura 13).

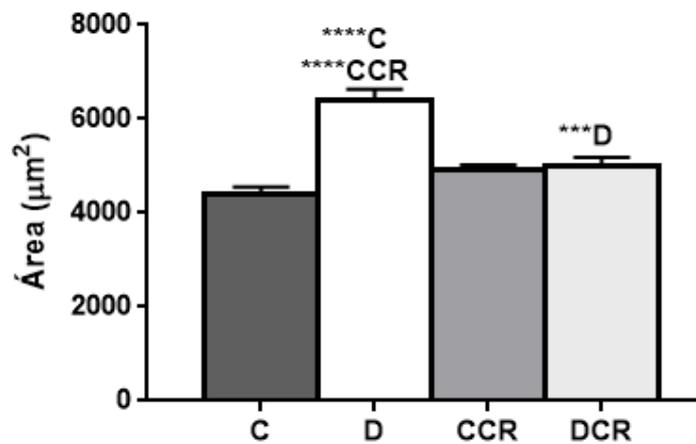
Figura 11- Área do corpúsculo renal dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Área do corpúsculo renal dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Média±EPM. ****C P<0,0001 versus C; *C P<0,05 versus C; ****CCR P<0,0001 versus CCR; ***D P<0,001 versus D. ANOVA com pós-teste de Tukey.

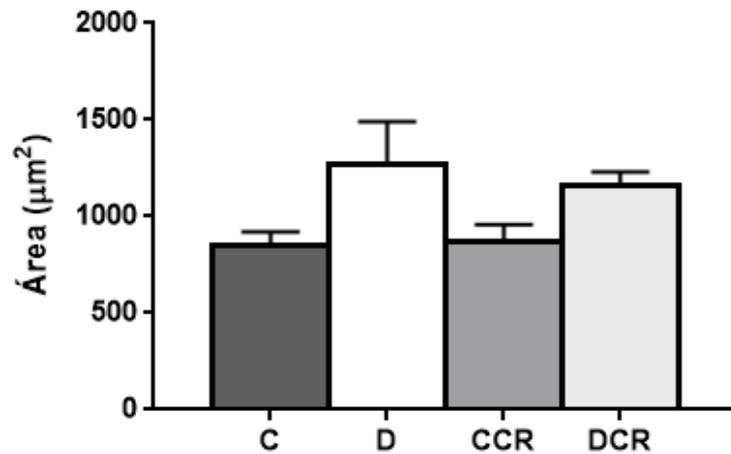
Figura 12- Área do tufo glomerular dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Área do tufo glomerular dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Média±EPM. ****C P<0,0001 versus C; ****CCR P<0,0001 versus CCR; ***D P<0,001 versus D. ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 13- Área do espaço capsular dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

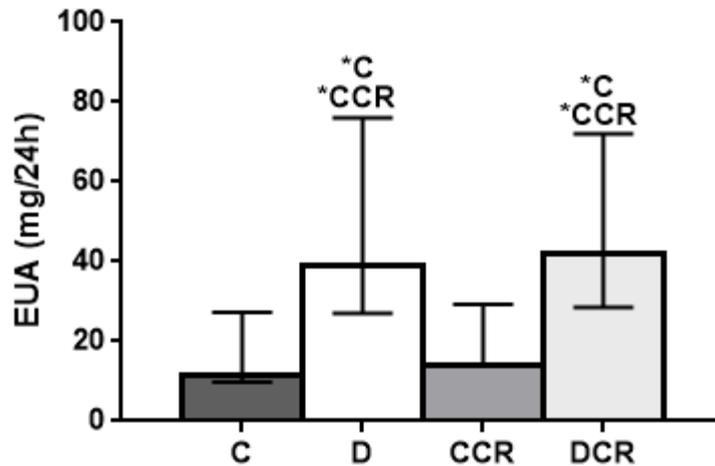
Área do espaço capsular dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Média±EPM. ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.6 Excreção Urinária de Albumina (EUA) e Taxa de Filtração Glomerular (TFG)

Os animais do grupo D e DCR tiveram um aumento significativo na EUA quando comparados com os grupos controles (Figura 14).

Os animais do Grupo D apresentaram redução na TFG quando comparados com os grupos controles, e o tratamento com CR reverteu parcialmente essa alteração (Figura 15).

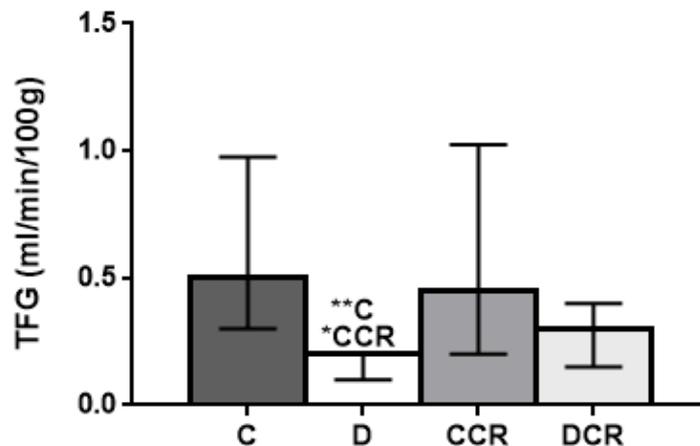
Figura 14- Excreção urinária de albumina dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Excreção urinária de albumina (EUA) dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 90 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Mediana com Intervalo Interquartil. *C P<0,05 versus C; *CCR P<0,05 versus CCR. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 15- Taxa de filtração glomerular dos diferentes grupos experimentais.



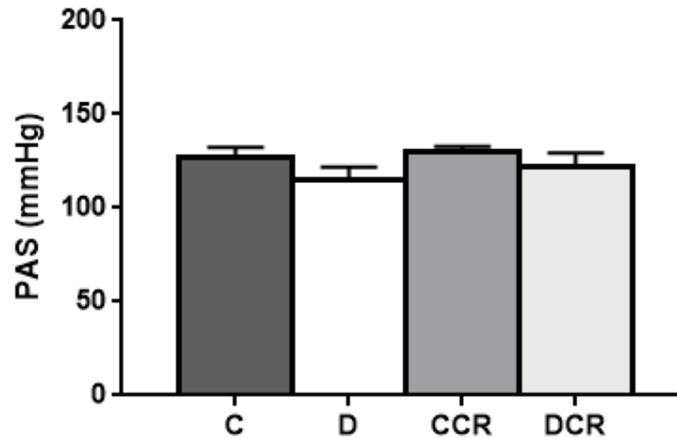
Fonte: O Autor, 2021.

Taxa de filtração glomerular (TFG) dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 90 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Mediana com Intervalo Interquartil. **C P<0,001 versus C; *CCR P<0,05 versus CCR. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

5.7 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Nenhuma alteração significativa na PAS foi observada entre os grupos (Figura 16).

Figura 16- Pressão arterial sistólica dos diferentes grupos experimentais.



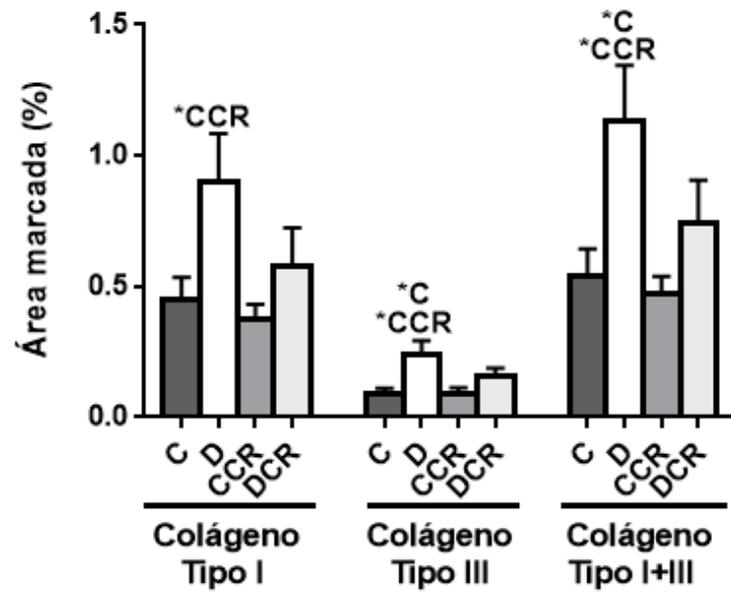
Fonte: O Autor, 2021.

Pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Média±EPM. ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.8 Fibras de Colágeno

A porcentagem de fibras de colágeno do tipo I foi maior no grupo D em relação ao grupo CCR. No entanto, os animais diabéticos apresentaram aumento significativo na porcentagem de fibras de colágeno do tipo III, e na soma de colágeno do tipo I com o do tipo III quando comparados com os grupos controles. Além disso, o tratamento com CR impediu parcialmente a deposição de fibras de colágeno (Figura 17, Figura 18 e Figura 19).

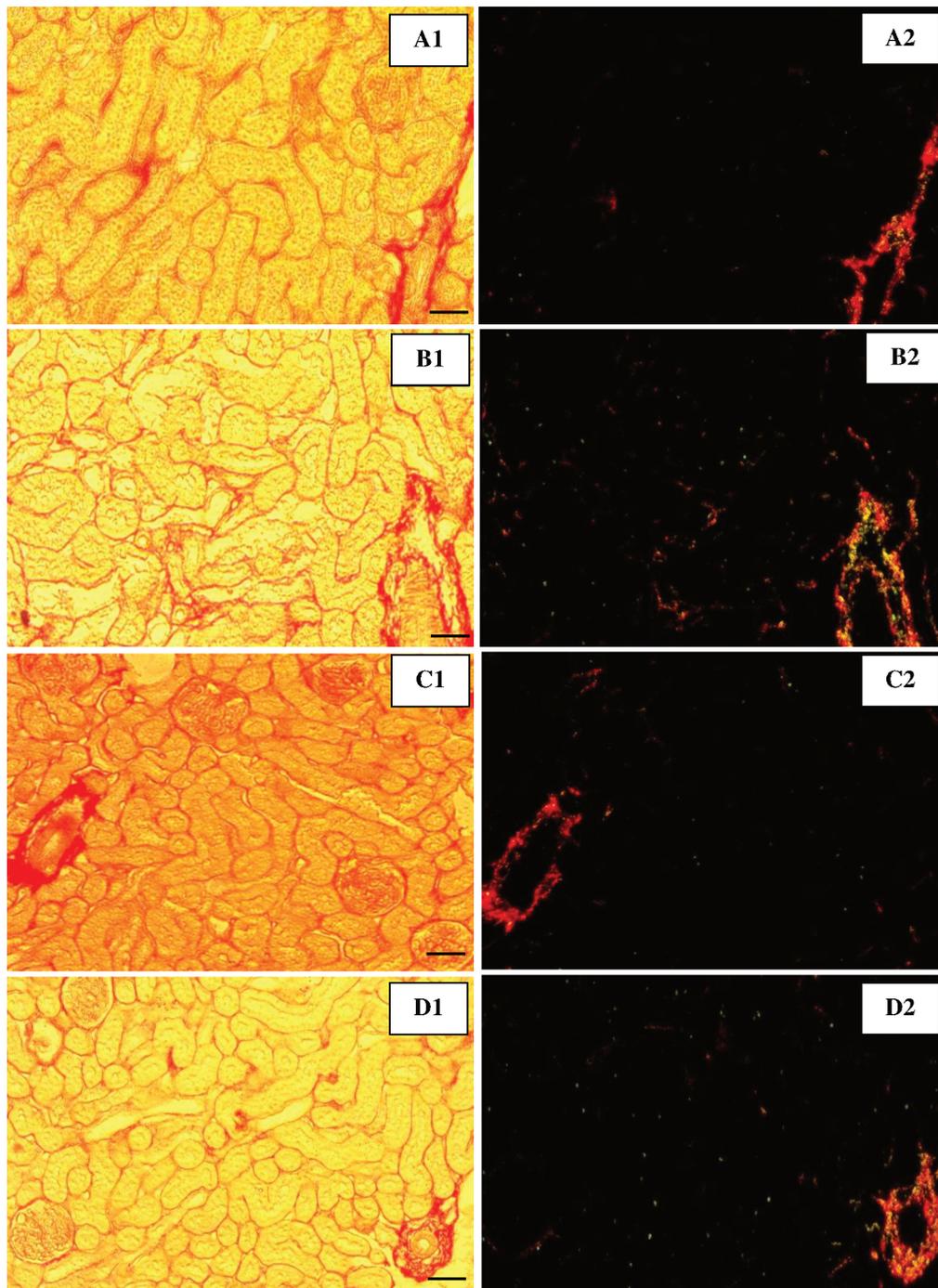
Figura 17- Colágeno do tipo I e do tipo III nos rins de animais dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Fibras de colágeno no parênquima renal de rins dos ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Média±EPM. *C P<0,05 versus C; *CCR P<0,05 versus CCR. ANOVA com pós-teste de Tukey.

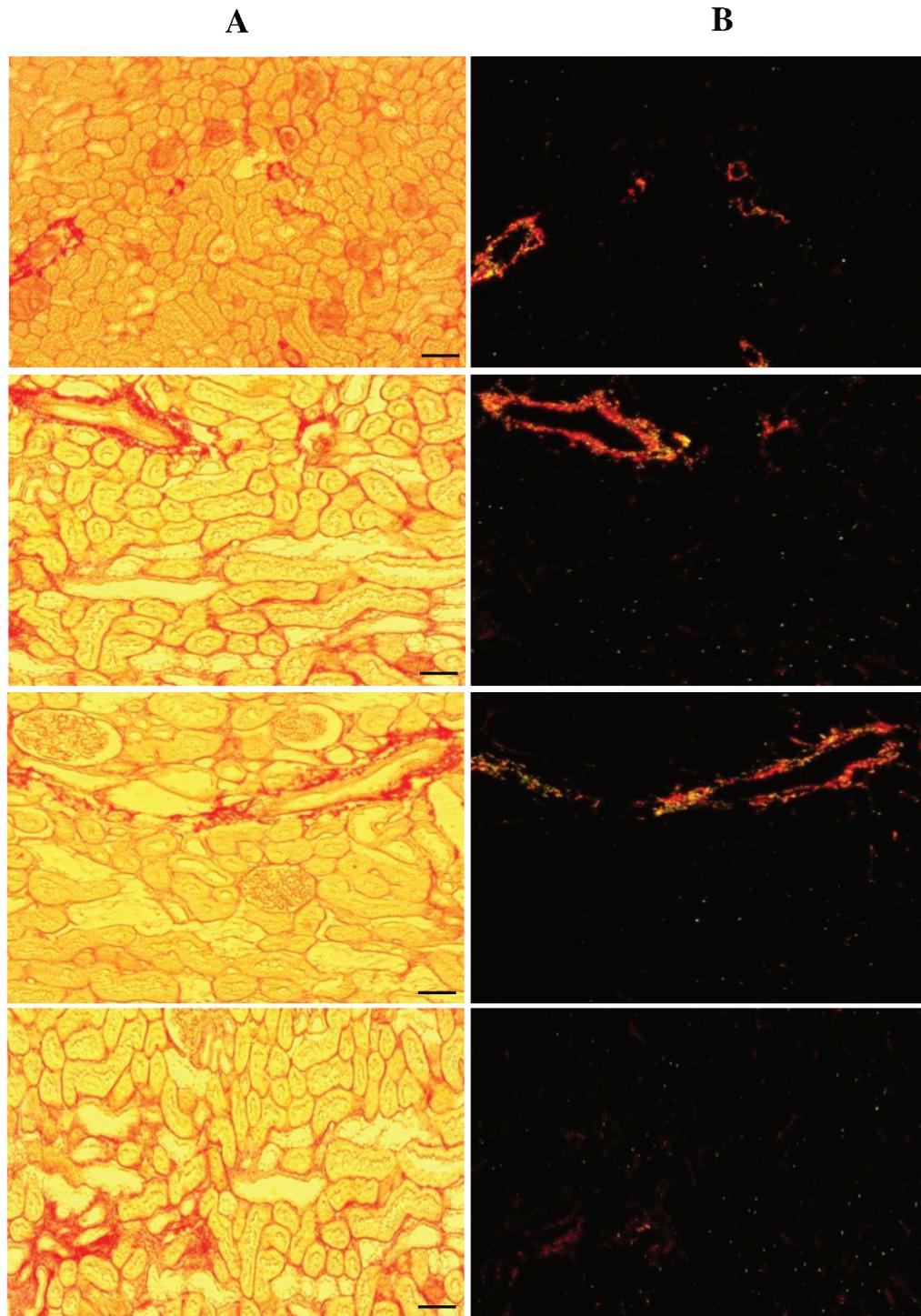
Figura 18- Imagens representativas da deposição de fibras de colágeno no parênquima renal.



Fonte: O Autor, 2021.

Secções representativas de tecido renal coradas com vermelho de picrossírius e observadas ao microscópio de luz, antes (A1- D1) ou após o uso de filtro polarizador (A2-D2). Observe a presença de fibras de colágeno no parênquima renal de rato controle (A), diabético (B), controle tratado com cromoglicato (C) e diabético tratado com cromoglicato (D) após 95 dias de tratamento. Note a maior extensão de área marcada nos rins dos animais do grupo B quando comparado ao controle, bem como a reversão parcial observada nos rins de animais diabéticos tratados com cromoglicato.

Figura 19- Imagens representativas da deposição de fibras de colágeno no parênquima renal de ratos diabéticos.



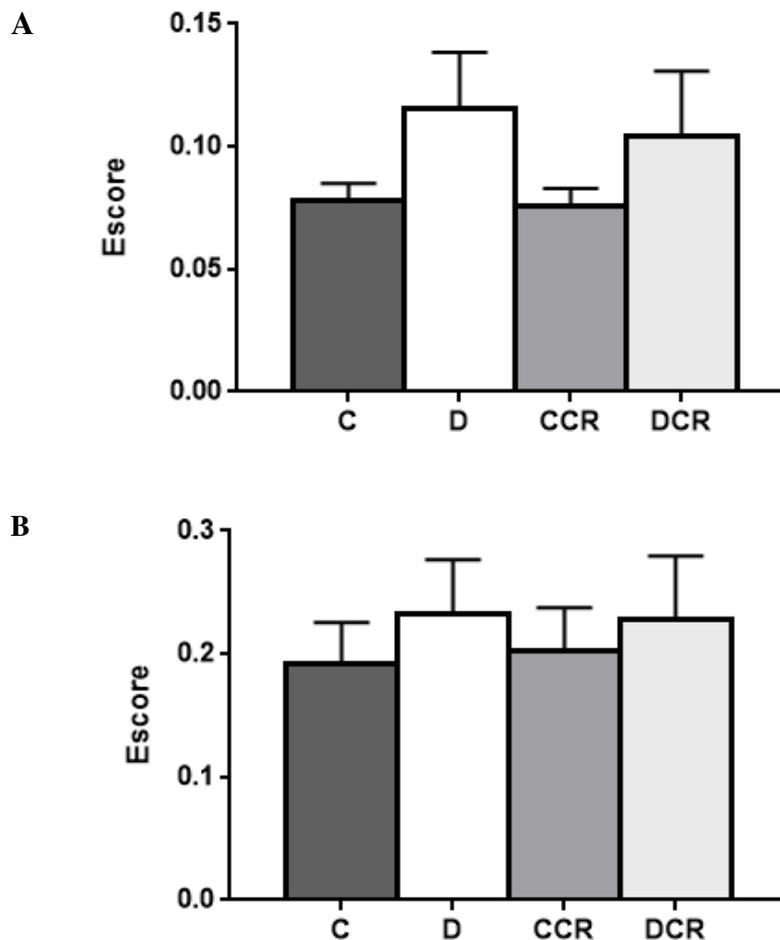
Fonte: O Autor, 2021.

Secções representativas de tecido renal coradas com vermelho de picrossírius e observadas ao microscópio de luz, antes (A) ou após o uso de filtro polarizador (B). Note a presença de marcação em regiões perivasculares (colágeno do tipo I e III) e não perivasculares (predominantemente colágeno do tipo III). Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 10x. Escala = 100 μ m.

5.9 Expressão Renal de α -SMA

Nenhuma alteração significativa na expressão renal de α -SMA foi observada entre os grupos no compartimento glomerular (Figura 20A e 21) e TBI (Figura 20B e 21).

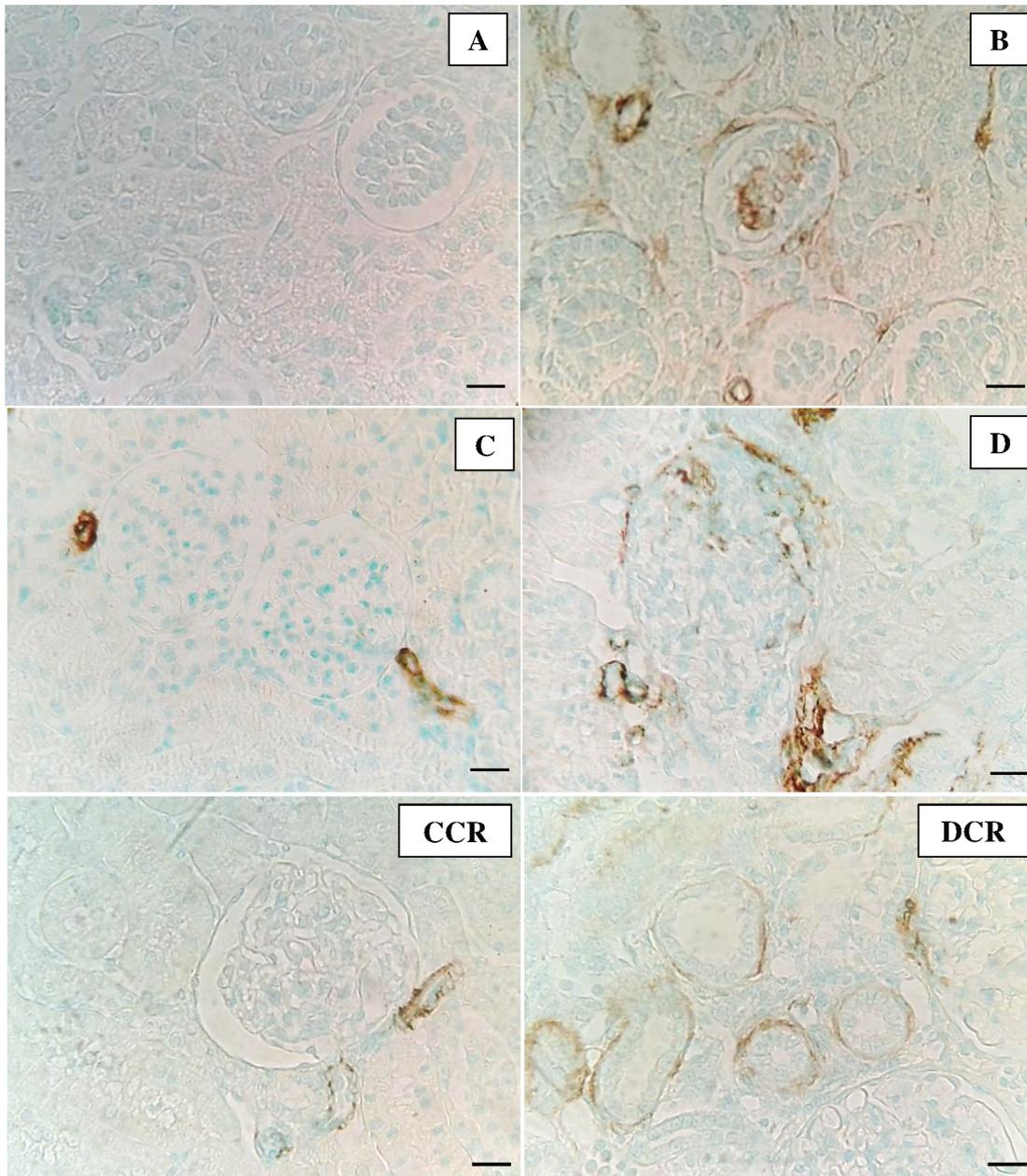
Figura 20- Expressão glomerular e túbulo-intersticial de α -SMA no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Expressão de α -SMA na região glomerular (A) e túbulo-intersticial (B) de rins oriundos de ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 5-6 animais. Os dados são expressos como Média±EPM. ANOVA com pós-teste de Tukey.

Figura 21- Imagens representativas da expressão de α -SMA em rins dos diferentes grupos experimentais.



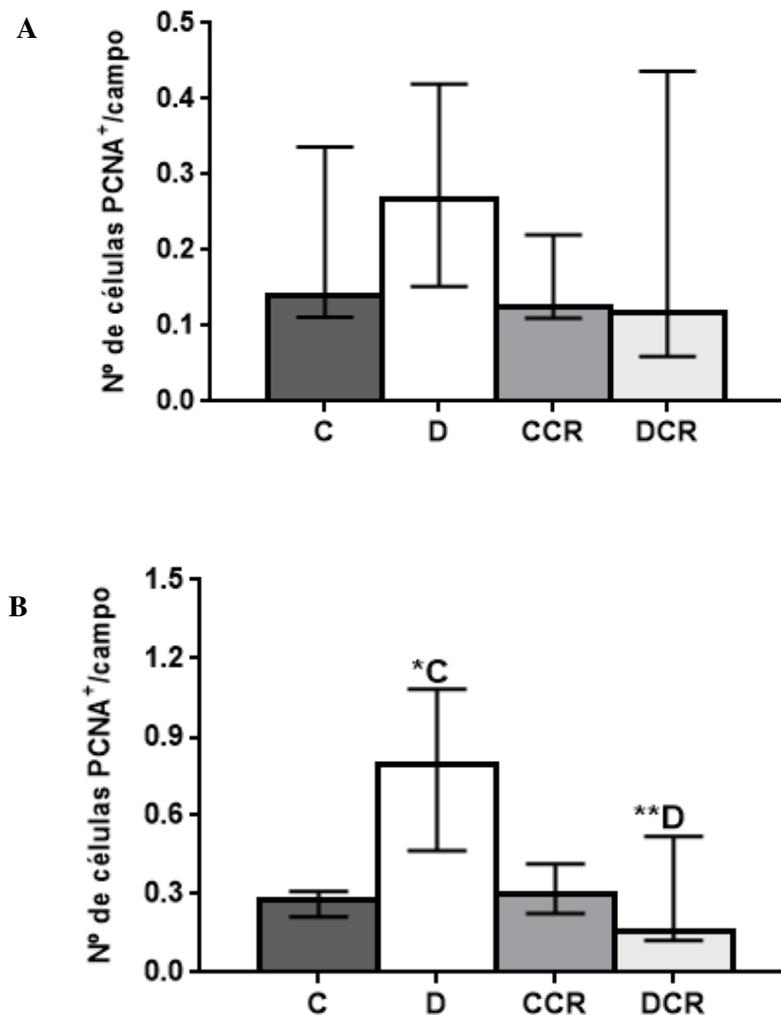
Fonte: O Autor, 2021.

Secções representativas do tecido renal evidenciando a imunomarcacão para α -SMA no rim rato de um dia de vida (controle negativo e controle positivo em A e B, respectivamente), e no rim de rato controle (C), diabético (D), controle tratado com cromoglicato (CCR) e diabético tratado com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 40x. Escala = 50 μ m.

5.10 Expressão Renal de PCNA

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos com relação à expressão de PCNA glomerular (Figura 22A e 23). Os animais diabéticos apresentaram aumento na expressão de PCNA na região TBI quando comparados ao grupo controle, e o tratamento com CR foi capaz de abolir essa alteração (Figura 22B e 23).

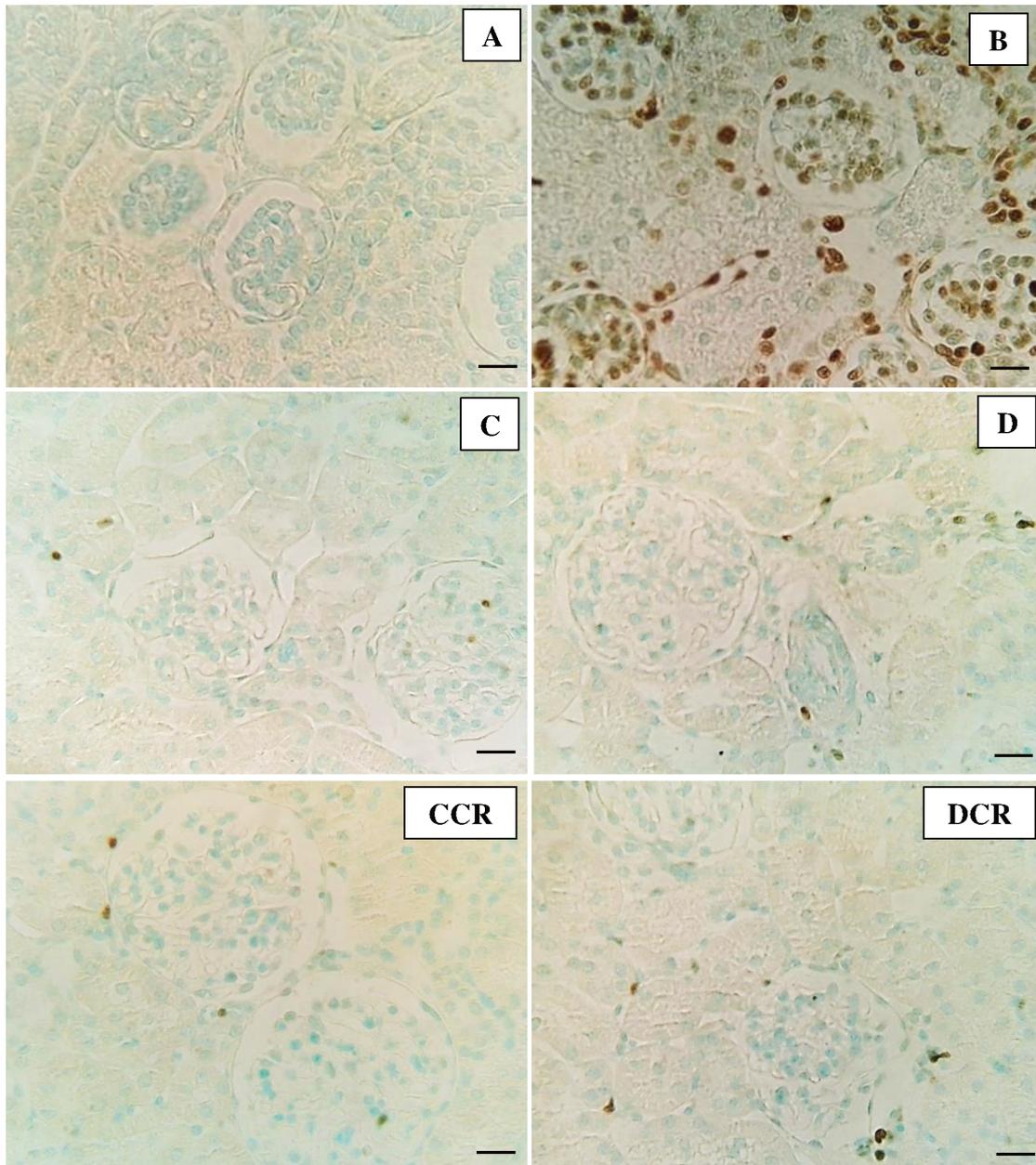
Figura 22- Número de células PCNA⁺ glomerulares e túbulo-intersticiais no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Expressão de PCNA na região glomerular (A) e túbulo-intersticial (B) de rins oriundos de ratos controles (C), diabéticos (D), controles tratados com cromoglicato (CCR) e diabéticos tratados com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. n: 4-5 animais. Os dados são expressos como Média e Intervalo Interquartil. ^{*C} P<0,05 versus C; ^{**D} P<0,01 versus D. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 23- Imagens representativas da expressão de PCNA em rins dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: O Autor, 2021.

Secções representativas do tecido renal evidenciando a imunomarcção para PCNA no rim rato de um dia de vida (controle negativo e controle positivo em A e B, respectivamente), e no rim de rato controle (C), diabético (D), controle tratado com cromoglicato (CCR) e diabético tratado com cromoglicato (DCR) após 95 dias de tratamento. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 40x. Escala = 50 μ m.

6 DISCUSSÃO

A aloxana é um substrato do transportador de glicose GLUT-2 presente nas células beta pancreáticas; após captação, essa droga promove necrose celular através da geração de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, inibe a secreção endógena de insulina (LENZEN, 2008). De fato, a administração de aloxana induziu um quadro de DM tipo 1 nos animais, caracterizado por hiperglicemia, polidipsia, poliúria e perda de peso. As alterações de glicemia observadas 24 h e 97 dias após a administração de aloxana sugerem a instalação de um quadro persistente de DM tipo 1, corroborando dados de literatura (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003; DE MORAIS et al., 2018).

O tratamento com CR a partir da primeira semana após a indução do DM diminuiu discretamente a hiperglicemia dos animais. Essa observação sugere que além da lesão aguda induzida pela aloxana, essa droga conta parcialmente com a participação dos mastócitos, em médio ou longo prazo, para induzir seu efeito tóxico máximo no pâncreas. Com relação a isso, o tratamento de camundongos com CR após a administração de baixas e múltiplas doses de estreptozotocina, outro agente diabetogênico que promove lesão de células β -pancreática (LENZEN, 2008), impediu o desenvolvimento de hiperglicemia (MARTIN et al., 1989). Mais recentemente, foi demonstrado que camundongos deficientes em mastócitos e tratados com estreptozotocina apresentaram glicemia significativamente menor quando comparados aos controles diabéticos, apesar dos níveis glicêmicos estarem extremamente elevados (HE et al., 2019), à semelhança do observado em nosso estudo. Ainda, Martino e colaboradores (2015) relataram um número maior de mastócitos nas ilhotas pancreáticas de humanos com DM 1, e que a histamina (um importante mediador mastocitário) foi capaz de induzir apoptose em células de ilhotas pancreáticas humanas em cultura. Em conjunto, nossos dados e aqueles reportados na literatura científica sugerem fortemente que a atividade mastocitária contribui, ao menos parcialmente, para o efeito tóxico induzido por agentes diabetogênicos como a aloxana e a estreptozotocina.

Dessa forma, poderíamos esperar que o tratamento com CR pudesse evitar a morte de algumas células β -pancreáticas, possibilitando uma secreção residual de insulina. Apesar de não termos determinados os níveis séricos desse hormônio hipoglicemiante, o efeito do CR sobre a glicemia e perda de peso dos animais tratados com aloxana corroboram essa hipótese. Por outro lado, a poliúria dos animais diabéticos não foi modificada pelo tratamento com CR, o que pode ser explicado pela elevada glicemia observada nesse grupo (479,6 mg/dl), apesar da diminuição média de aproximadamente 110 mg/dl com relação aos animais diabéticos

controles. Cabe informar que em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa foi observado que animais tratados com aloxana apresentaram, 90 dias após a indução, valores de glicemia compatíveis com aqueles dos animais tratados com CR em nosso estudo (i.e, valor médio de 483,1 mg/dl), e que tal nível glicêmico foi associado a alterações morfofuncionais renais (DE MORAIS et al., 2018). Portanto, a julgar pelo nível glicêmico, qualquer possível secreção residual de insulina apresentada pelos animais tratados com CR possivelmente não seria suficiente para proteger os rins de danos associados ao DM, a despeito do impacto do referido tratamento sobre o peso dos animais.

Nossa observação de que houve um aumento na densidade mastocitária associada ao DM experimental corrobora dados previamente publicados por nosso grupo de pesquisa (DE MORAIS et al., 2018). O aumento na densidade dessas células parece depender parcialmente da própria atividade mastocitária, a qual se encontra aumentada nos rins de animais diabéticos. De fato, o tratamento com CR impediu parcialmente não apenas a ativação dos mastócitos como o aumento em sua densidade. Esse comportamento é semelhante ao que foi observado em rins de animais submetidos à amarração ureteral; nessa condição, observou-se aumentos na densidade e ativação mastocitária no hilo renal, alterações que foram parcialmente ou totalmente impedidas pelo tratamento com CR, respectivamente (DE OLIVEIRA-SILVA et al., 2018). Mecanismos de autoamplificação com relação à atividade dos mastócitos já foram sugeridos na literatura, assim, mediadores secretados por essas células, como histamina e triptase, são capazes de atuar de forma autócrina e parácrina, determinando ativação mastocitária (HE et al., 2012). Ainda, Janicki e colaboradores (2006) sugeriram que mastócitos cardíacos maduros são capazes de estimular, via desgranulação, a maturação e diferenciação de mastócitos imaturos residentes. Em conjunto, ambos os mecanismos fornecem uma explicação para nossas observações com relação à densidade e ativação mastocitária em rins de animais diabéticos, tratados ou não com CR. Cabe ressaltar que apesar da controvérsia com relação ao aumento do número de mastócitos em rins de animais portadores de DM experimental (KHURANA; SHARMA; BUDHIRAJA, 2011; CRISTOVAM et al., 2012; ZHANG et al., 2016; DE MORAIS et al., 2018), Zheng e colaboradores (2012) observaram que a densidade e a ativação mastocitária aumentaram gradativamente em rins de pacientes diabéticos com a progressão da nefropatia.

Aumentos no tufo glomerular e no corpúsculo renal encontrados nos rins de animais diabéticos controles sugerem o desenvolvimento de hipertrofia glomerular, uma alteração precoce classicamente associadas à ND (POURGHASEM; SHAFI; BABAZADEH, 2015). O aumento do corpúsculo renal foi proporcional, como sugerido pela ausência de alterações no

espaço capsular associado ao DM. Alterações glomerulares, tubulares (hipertrofia e dilatação) e o acúmulo de componentes da MEC causam aumento na massa renal em portadores de DM (POURGHASEM; SHAFI; BABAZADEH, 2015). De fato, além da hipertrofia glomerular, observamos um aumento no conteúdo de colágeno no parênquima renal, o que pode explicar, ao menos em parte, o aumento no peso relativo dos rins constatado nos animais diabéticos.

O aumento na EUA e a diminuição na TFG observados nos animais diabéticos controles indicam o desenvolvimento de disfunção glomerular. A microalbuminúria apresentada por esses animais sugere que eles estejam no estágio inicial do desenvolvimento da ND. Nessa fase da progressão da doença, a TFG pode estar normal, aumentada ou, como relatado no presente estudo, diminuída (PAPADOPOULOU-MARKETOU; CHROUSOS; KANAKA-GANTENBEIN, 2016). A ausência de hipertensão nos animais diabéticos corrobora a sugestão de que estamos lidando com as fases iniciais da ND, já que dois terços dos pacientes com DM apresentam hipertensão associada a quadros de macroalbuminúria, um estado mais avançado da doença (PAPADOPOULOU-MARKETOU; CHROUSOS; KANAKA-GANTENBEIN, 2016).

O tufo glomerular é constituído por três tipos celulares: o endotélio fenestrado, localizado entre a luz do capilar e a membrana basal glomerular (MBG); os podócitos, que envolvem a camada mais externa da MBG; e as células mesangiais, posicionadas entre as alças capilares e conferindo-lhes suporte (NGUYEN; GOLDSCHMEDING, 2019). O endotélio fenestrado, a MBG e os processos podais dos podócitos formam a barreira de filtração (REIDY et al., 2014). O DM diminui as fenestrações endoteliais, causa espessamento da MBG e provoca perda de podócitos, alterando a citoarquitetura dos processos podais e, conseqüentemente, as fendas de filtração (REIDY et al., 2014; ALICIC; ROONEY; TUTTLE, 2017). Além disso, o DM provoca expansão mesangial, caracterizada por aumento na produção de MEC e por uma fase inicial, porém limitada, de proliferação celular seguida de hipertrofia (WOLF; ZIYADEH, 1999; NGUYEN; GOLDSCHMEDING, 2019); cabe ressaltar que a ausência de alterações na expressão glomerular de PCNA observada em nosso estudo, 102 dias após a indução do DM, sugere que a proliferação mesangial tenha, de fato, ocorrido precocemente. Tal sugestão baseia-se na importância do PCNA para a síntese de DNA, progressão do ciclo celular e, conseqüentemente, para a divisão da célula (JASKULSKI et al., 1988). Cabe ressaltar que uma característica importante das células mesangiais é sua propriedade contrátil, a qual possibilita a elas modular a tensão na parede capilar e o fluxo sanguíneo intraglomerular (NGUYEN; GOLDSCHMEDING, 2019). Pelo exposto, nota-se que várias alterações renais já bem estabelecidas e associadas ao DM possibilitam fornecer

possíveis explicações para a redução na TFG e para o aumento na EUA observados em nosso estudo. Dessa forma, a diminuição das fenestrações capilares e o espessamento da MBG reduzem a condutância hidráulica e, em conjunto com a expansão mesangial, que presumivelmente reduzir o fluxo sanguíneo intraglomerular, poderiam contribuir para a redução na TFG. Por sua vez, as alterações na barreira de filtração, associadas à perda de podócitos, explicaria a presença de microalbuminúria. Enfatiza-se que nenhuma dessas alterações foi avaliada em nosso estudo, assim, a contribuição dos diferentes mecanismos propostos para as alterações funcionais informadas no presente trabalho permanece por ser determinada.

Enquanto os mastócitos parecem contribuir, ao menos em parte, para a redução da TFG associada ao DM, essas células não participam na instalação da microalbuminúria presente nas fases iniciais da ND. De fato, apesar do tratamento com CR ter melhorado parcialmente a TFG, essa droga não foi capaz de impedir o aumento na EUA em animais diabéticos. Esses dados sugerem que os mediadores mastocitários apresentam, direta ou indiretamente, efeitos diferentes sobre os diversos componentes glomerulares. A constatação de que o tratamento com CR impediu significativamente o desenvolvimento da hipertrofia glomerular nos rins de animais diabéticos, o que provavelmente explica os efeitos dessa droga sobre o peso relativo dos rins e sobre a TFG, poderia ser interpretada como sugestão de que os mastócitos fossem capazes de estimular a expansão mesangial associada à hiperglicemia. No entanto, em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (DE MORAIS et al., 2018) foi constatado que o alisquireno, um inibidor de renina, diminuiu a densidade e a atividade dos mastócitos nos rins de ratos diabéticos, sem alterar a área do corpúsculo renal e do tufo glomerular. Portanto, é possível que os efeitos do CR não relacionados à sua capacidade de prevenir a desgranulação de mastócitos sejam responsáveis por sua renoproteção em relação às alterações morfofuncionais glomerulares; porém, esta importante questão ainda precisa ser avaliada.

Miofibroblastos são fibroblastos que possuem propriedade contrátil, conferida a essas células pela expressão, dentre outras proteínas, de α -SMA, a qual é amplamente empregada como um marcador para esse tipo celular (STRUTZ; ZEISBERG, 2006; FALKE et al., 2015). Entretanto, a distinção dos miofibroblastos é realizada utilizando-se critérios topográficos, já que essas células não são as únicas que expressam α -SMA no tecido renal; de fato, células de músculo liso vascular, pericitos (células mesenquimais associadas a vasos sanguíneos e que conferem suporte ao endotélio capilar) e células-tronco mesenquimais também expressam α -SMA (STRUTZ; ZEISBERG, 2006). Considera-se que os miofibroblastos representam o

principal fenótipo ativo de fibroblastos responsáveis pela deposição de MEC na fibrose túbulo-intersticial associada ao DM (STRUTZ; ZEISBERG, 2006). A origem dessas células no parênquima renal ainda é motivo de debate no meio acadêmico, contudo, podemos citar como fontes de miofibroblastos nos rins: fibroblastos residentes, pericitos, células mesangiais e células intersticiais produtoras de eritropoietina (processo de transdiferenciação mesenquimal); células endoteliais (transição endotélio-mesenquimal); e células derivadas da medula óssea (FALKE et al., 2015). A literatura sugere que os fibroblastos residentes e pericitos sejam as principais fontes de miofibroblastos relacionados à fibrose renal (FALKE et al., 2015). Questiona-se, no entanto, a contribuição de células tubulares renais (transição epitélio-mesenquimal) para a formação do *pool* de miofibroblastos nos rins (FALKE et al., 2015). No presente trabalho, não observamos alterações significativas na expressão renal de α -SMA, apesar do aumento na deposição de fibras de colágeno, em especial do colágeno do tipo III na região túbulo-intersticial. Nossos dados contrastam com aqueles relatados por Li, Qu e Bertram (2009), os quais observaram um aumento na expressão túbulo-intersticial de α -SMA em rins de camundongos após 30 dias da indução do DM. Uma possível explicação para essa discrepância podem ser as diferentes espécies empregadas nos estudos (camundongo vs. rato), uma vez que experimentos realizados com ratos diabéticos não evidenciaram aumentos significativos na expressão de α -SMA renal após 30 dias da indução (YOUNG et al., 1995). Assim, nossos dados sugerem que a deposição de matriz colágena associada à fase inicial da ND precede os processos de transdiferenciação que determinam o aparecimento e/ou aumento na população de miofibroblastos renais.

Dados do nosso grupo de pesquisa e aqueles oriundos da literatura mostram que os mastócitos são capazes de induzir fibrose renal e contribuir para o aumento na expressão de α -SMA em rins de animais submetidos à amarração ureteral (SUMMERS et al., 2012; DE OLIVEIRA-SILVA et al., 2018). Ainda, em culturas de fibroblastos, os mastócitos estimulam a produção de colágeno (atividade celular) e a expressão de α -SMA, efeitos que têm sido atribuídos a diferentes mediadores, como triptase, TGF- β 1 e histamina, mas não ao TNF- α (ABE et al., 1998; GAILIT et al., 2001). De forma intrigante, nossos dados sugerem que a atividade mastocitária contribui parcialmente para o aumento na deposição de fibras de colágeno na fase inicial da ND e que esse efeito ocorre sem que haja alterações na expressão renal de α -SMA. Portanto, os mastócitos devem estar aumentando a proliferação e/ou a atividade de células produtoras de colágeno do tipo I e III, como os fibroblastos residentes e/ou protomiofibroblastos (fenótipo intermediário entre fibroblasto e miofibroblasto que ainda não expressa α -SMA) (HAN et al., 1999; LAM et al., 2003; FALKE et al., 2015). A

normalização da expressão de PCNA no parênquima renal dos animais diabéticos tratados com CR corrobora a hipótese proliferativa. Por sua vez, as observações referentes ao conteúdo de colágeno renal, juntamente com dados de literatura, apoiam a sugestão de que os mastócitos estejam aumentando a atividade de células produtoras de colágeno. Cabe ressaltar que a musculatura lisa vascular também sintetiza colágeno, contudo, a quimase é capaz de inibir tanto a proliferação como a expressão de RNAm para colágeno do tipo I e III por essas células (WANG et al., 2001). Dessa forma, é pouco provável que o aumento no conteúdo de colágeno renal associado à atividade mastocitária observado em nosso estudo seja devido a ações em células de musculo liso vascular.

7 CONCLUSÃO

Esses dados sugerem que os aumentos na densidade e atividade mastocitárias renais contribuem para a deposição de colágeno túbulo-intersticial nos estágios iniciais da ND, mesmo na ausência de alterações na população renal de miofibroblastos. O tratamento com CR evidenciou efeitos renoprotetores que parecem estar relacionados à sua ação inibitória sobre a desgranulação mastocitária, bem como à sua capacidade de prevenir alterações morfofuncionais deletérias.

REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 28, n. 12, p. 1509-1517, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00360.x>.
- ALBERT-BAYO, M. et al. Intestinal mucosal mast cells: key modulators of barrier function and homeostasis. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 135, 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8020135>.
- ALICIC, R. Z.; ROONEY, M. T.; TUTTLE, K. R. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 12, p. 2032-2045, 2017. <https://dx.doi.org/10.2215%2FCJN.11491116>.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. **Diabetes Care**, v. 43, n. Supplement 1, p. S14-S31, 2020. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2012. **Diabetes Care**, v. 35, n Supplement 1, p. S11-63, 2012. <https://doi.org/10.2337/dc12-s011>.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory medicine**, v. 106, n. 1, p. 9-14, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2011.09.007>.
- BENIGNI, A. et al. Beneficial effect of TGF β antagonism in treating diabetic nephropathy depends on when treatment is started. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 104, n. 4, p. 158-168, 2006. <https://doi.org/10.1159/000094967>.
- BISPO-DA-SILVA, L. B. et al. Cardiac mast cell proteases do not contribute to the regulation of the rat coronary vascular responsiveness to arterial delivered angiotensin I and II. **Vascular pharmacology**, v. 53, n. 1-2, p. 22-27, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2010.03.001>.
- BRADDING, P.; PEJLER, G. The controversial role of mast cells in fibrosis. **Immunological reviews**, v. 282, n. 1, p. 198-231, 2018. <https://doi.org/10.1111/imr.12626>.
- CARVALHO, E. N. de; CARVALHO, N. A. S. de; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. spe, p. 60-64, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502003001100009>.
- CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum?. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 20, n. 4, p. 546, 2016. <https://dx.doi.org/10.4103%2F2230-8210.183480>.
- CRISTOVAM, P. C. et al. Role of chymase in diabetic nephropathy. **Experimental biology and medicine**, v. 237, n. 8, p. 985-992, 2012. <https://doi.org/10.1258%2Ffeb.2012.01135>.

- CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>.
- DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 698-738, 2014. <https://dx.doi.org/10.1369%2F0022155414545334>.
- DE MORAIS, R. B. et al. Mast cell population in the development of diabetic nephropathy: Effects of renin angiotensin system inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1115-1118, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.066>.
- DE OLIVEIRA-SILVA, G. L. et al. Testosterone and Mast Cell Interactions in the Development of Kidney Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 8, p. 1164-1169, 2018. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00829>.
- DEBRUIN, E. J. et al. Mast cells in human health and disease. In: **Mast Cells**. Humana Press, New York, NY, p. 93-119, 2015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_7.
- DJUDJAJ, S.; BOOR, P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. **Molecular aspects of medicine**, v. 65, p. 16-36, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.06.002>.
- DONATE-CORREA, J. et al. Inflammatory targets in diabetic nephropathy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 458, 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm9020458>.
- DURVASULA, R. V.; SHANKLAND, S. J. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 294, n. 4, p. 830-839, 2008. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00266.2007>.
- FALKE, L. L. et al. Diverse origins of the myofibroblast—implications for kidney fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 4, p. 233, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.246>.
- FERREIRA, S. R. G.; ZANELLA, M. T. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e nefropatia diabética. **Revista Brasileira Hipertensão**, v. 3, p. 268-74, 2000.
- FINEBERG, D.; JANDELEIT-DAHLM, K. A.M.; COOPER, M. E. Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 12, p. 713, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.184>.
- FRANÇA-SILVA, N.; OLIVEIRA, N. D. G.; BALBI, A. P. C. Morphofunctional renal alterations in rats induced by intrauterine hyperglycemic environment. **Archives of Medical Science: AMS**, v. 12, n. 2, p. 243, 2016. <https://dx.doi.org/10.5114%2Faoms.2015.48220>.
- GAILIT, J. et al. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, n. 5, p. 1113-1119, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.15211.x>.

- GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature immunology**, v. 6, n. 2, p. 135-142, 2005. <https://doi.org/10.1038/ni1158>.
- GONLUSEN, G. et al. The expression of cytoskeletal proteins (α -SMA, vimentin, desmin) in kidney tissue: a comparison of fetal, normal kidneys, and glomerulonephritis. **International urology and nephrology**, v. 33, n. 2, p. 299-305, 2001. <https://doi.org/10.1023/a:1015226426000>.
- GROSS, J. L. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes care*, v. 28, n. 1, p. 164-176, 2005. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.1.164>.
- GROSS, M. L. et al. Renal damage in the SHR/N-cp type 2 diabetes model: comparison of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and endothelin receptor blocker. **Laboratory investigation**, v. 83, n. 9, p. 1267-1277, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000085188.23709.29>.
- HAN, D. C. et al. High glucose stimulates proliferation and collagen type I synthesis in renal cortical fibroblasts: mediation by autocrine activation of TGF- β . **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 9, p. 1891-1899, 1999. PMID: 10477140.
- HE, A. et al. Mast cell-deficiency protects mice from streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. **Translational Research**, v. 208, p. 1-14, 2019. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.trsl.2019.01.005>.
- HE, S. et al. Self-amplification mechanisms of mast cell activation: a new look in allergy. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 10, p. 1329-1339, 2012. <https://doi.org/10.2174/156652412803833544>.
- 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. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008010015>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002243>.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 9th Edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019.
- JANICKI, J. S. et al. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 657-665, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.10.020>.
- JASKULSKI, D. et al. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. **Science**, v. 240, n. 4858, p. 1544-1546, 1988. <https://doi.org/10.1126/science.2897717>.
- 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. **The Journal of clinical investigation**, v. 87, n. 3, p. 847-858, 1991. <https://doi.org/10.1172/JCI115089>.

KAGAMI, S. Involvement of glomerular renin– angiotensin system (RAS) activation in the development and progression of glomerular injury. **Clinical and experimental nephrology**, v. 16, n. 2, p. 214-220, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10157-011-0568-0>.

KALANTARINIA, K.; AWAD, A. S.; SIRAGY, H. M. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF- α increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. **Kidney international**, v. 64, n. 4, p. 1208-1213, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00237.x>.

KANASAKI, K.; TADURI, G.; KOYA, D. Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 7, 2013. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffendo.2013.00007>.

KELLY, D. J. et al. Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2398-2404, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0795-9>.

KHOURY, C. C.; CHEN, S.; ZIYADEH, F. N. Pathophysiology of Diabetic Nephropathy. In: **Chronic Renal Disease**. Academic Press, 2020. p. 279-296. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815876-0.00019-X>.

KHURANA, H.; SHARMA, S.; BUDHIRAJA, R. D. Effect of mast cell stabilizer, ketotifen on streptozotocin induced experimental diabetic nephropathy in rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.2, n. 9, p-2387, 2011. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(9\).2387-93](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(9).2387-93).

KLIEM, V. et al. Mechanism involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney International**, New York, v. 49, p. 666-678, 1996. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.95>.

KONDO, S. et al. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 8, p. 1668-1676, 2001. PMID: 11461939.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast cell: a multi-functional master cell. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 620, 2016. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffimmu.2015.00620>.

LAM, S. et al. Glucose-induced fibronectin and collagen type III expression in renal fibroblasts can occur independent of TGF- β 1. **Kidney international**, v. 63, n. 3, p. 878-888, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00824.x>.

LAVOZ, C. et al. Angiotensin II contributes to renal fibrosis independently of Notch pathway activation. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40490, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040490>.

- LAW, J. K. Y. et al. The significance of chloride in the inhibitory action of disodium cromoglycate on immunologically-stimulated rat peritoneal mast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1810, n. 9, p. 867-874, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.007>.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>.
- LIM, A. K. H; TESCH, G. H. Inflammation in diabetic nephropathy. **Mediators of inflammation**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/146154>.
- 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. **The American journal of pathology**, v. 175, n. 4, p. 1380-1388, 2009. <https://dx.doi.org/10.2353%2Fajpath.2009.090096>.
- MAKINO, H. et al. Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. **Diabetes**, v. 45, n. 4, p. 488-495, 1996. <https://doi.org/10.2337/diab.45.4.488>.
- MARTIN, S. et al. Pathogenesis of low dose streptozotocin induced diabetes in mice: requirement for α 1-adrenoceptor activation and vasoactive amine release. **Diabetologia**, v. 32, n. 2, p. 140-142, 1989. <https://doi.org/10.1007/bf00505187>.
- MARTINO, L. et al. Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 58, n. 11, p. 2554-2562, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3734-1>.
- MEDAPATI, J. R.; PAPARANI, M. R.; BUDHIRAJA, R. D. The Novel Role of Mast Cell Stabilizer in Halting the development of nephropathy in diabetic rats: Implication of resident renal mast cells, 22nd Int. In: **Conference on Medical Biological Pharmaceutical Sciences**, Singapore 2012.
- MIYAZAWA, S. et al. Role of mast cells in the development of renal fibrosis: Use of mast cell-deficient rats. **Kidney international**, v. 65, n. 6, p. 2228-2237, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00629.x>.
- MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 1-11, 1991. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000700002>.
- MORIYA, R. et al. Juxtaglomerular apparatus T-cell infiltration affects glomerular structure in Type 1 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 47, n. 1, p. 82-88, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1253-y>.
- MOUNSEY, A. L.; GRAY, R. E. Topical antihistamines and mast cell stabilizers for treating allergic conjunctivitis. **American family physician**, v. 93, n. 11, p. 915-916, 2016. PMID: 27281835

NGUYEN, T. Q.; GOLDSCHMEDING, R. The Mesangial Cell in Diabetic Nephropathy. In: **Diabetic Nephropathy**. Springer, Cham, 2019. p. 143-151. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93521-8_9.

OKON, K.; STACHURA, J. Increased mast cell density in renal interstitium is correlated with relative interstitial volume, serum creatinine and urea especially in diabetic nephropathy but also in primary glomerulonephritis. **Pol J Pathol**, v. 58, n. 3, p. 193-197, 2007. PMID: 18074865

PAPADOPOULOU-MARKETOU, N.; CHROUSOS, G. P.; KANAKA-GANTENBEIN, C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 33, n. 2, p. e2841, 2017. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2841>.

PAPATHEODOROU, K. et al. Complications of diabetes 2017. **Journal of diabetes research**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3086167>.

POURGHASEM, M.; SHAFI, H.; BABAZADEH, Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. **Caspian journal of internal medicine**, v. 6, n. 3, p. 120, 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644877>.

REDEGELD, F. A. et al. Non-IgE mediated mast cell activation. **Immunological reviews**, v. 282, n. 1, p. 87-113, 2018. <https://doi.org/10.1111/imr.12629>.

REIDY, K. et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 6, p. 2333-2340, 2014. <https://dx.doi.org/10.1172%2FJCI72271>.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Journal of morphological sciences**, v. 22, n. 2, p. 0-0, 2005.

SHI, M. A.; SHI, G. Different roles of mast cells in obesity and diabetes: lessons from experimental animals and humans. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 7, 2012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00007>.

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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403208101>.

SINNIAH, A.; YAZID, S.; FLOWER, R. J. The anti-allergic cromones: past, present, and future. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 827, 2017. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffphar.2017.00827>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. São Paulo: Editora Clannad, 2019.

STRUTZ, F.; ZEISBERG, M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 2992-2998, 2006. <https://doi.org/10.1681/asn.2006050420>.

SUMMERS, S. A. et al. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction. **Kidney international**, v. 82, n. 6, p. 676-685, 2012. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.211>.

TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **JBM**, v. 102, n. 5, p. 8-9, 2014.

VEERAPPAN, A. et al. Mast cells are required for the development of renal fibrosis in the rodent unilateral ureteral obstruction model. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 302, n. 1, p. 192-204, 2012. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00562.2010>.

WANG, Y. et al. Mast cell chymase inhibits smooth muscle cell growth and collagen expression in vitro: transforming growth factor- β 1-dependent and-independent effects. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 21, n. 12, p. 1928-1933, 2001. <https://doi.org/10.1161/hq1201.100227>.

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. <https://doi.org/10.2174/157340212800505007>.

WOLF, G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. **European journal of clinical investigation**, v. 34, n. 12, p. 785-796, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01429.x>

WOLF, G.; ZIYADEH, F. N. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. **Kidney international**, v. 56, n. 2, p. 393-405, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.15231755.1999.00590.x>.

YONG, L. C. J. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 49, n. 6, p. 409-424, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0940-2993\(97\)80129-7](https://doi.org/10.1016/S0940-2993(97)80129-7).

YOUNG, B. A. et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. **Kidney international**, v. 47, n. 3, p. 935-944, 1995. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.139>.

ZHANG, M. et al. Chymase inhibition protects diabetic rats from renal lesions. **Molecular medicine reports**, v. 14, n. 1, p. 121-128, 2016. <https://dx.doi.org/10.3892%2Fmmr.2016.5234>.

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. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2391-2>.

ZIZZI, A. et al. Peri-implant diseases and host inflammatory response involving mast cells: a review. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 557-566, 2011. <https://doi.org/10.1177%2F039463201102400302>.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Alterações renais ao longo do desenvolvimento de nefropatia diabética após o uso de alisquereno e cromoglicato de sódio em ratos Wistar”, protocolo nº 073/18, sob a responsabilidade de **Ana Paula Coelho Balbi** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 21 de setembro de 2018.

(We certify that the project entitled intitulado “Alterações renais ao longo do desenvolvimento de nefropatia diabética após o uso de alisquereno e cromoglicato de sódio em ratos Wistar”, protocol 073/18, under the responsibility of - Ana Paula Coelho Balbi involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 21th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 15/11/2018 Término: 20/12/2020
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	84
Peso/Idade	250g
Sexo	Machos
Origem/Local	Rede de Biotério de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU).
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotério de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU)

Uberlândia, 28 de setembro de 2018

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