



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas - ICBIM
Graduação em Biomedicina



Ramon Ferreira Vasconcelos

**Caracterização da fibrose e da população mastocitária cardíacas em ratos
diabéticos: efeito do alisquireno**

Uberlândia
Dezembro/2017

Ramon Ferreira Vasconcelos

**Caracterização da fibrose e da população mastocitária cardíacas em ratos
diabéticos: efeito do alisquireno**

Trabalho de conclusão de curso II
apresentado ao curso de
graduação em Biomedicina do
Instituto de Ciências Biomédicas
(ICBIM) como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina pela Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientador: Dr. Luiz Borges Bispo
da Silva

Luiz Borges Bispo da Silva

Ramon Ferreira Vasconcelos

**Uberlândia
Dezembro/2017**

Ramon Ferreira Vasconcelos

**Caracterização da fibrose e da população mastocitária cardíacas em ratos
diabéticos: efeito do alisquireno**

Trabalho de conclusão de curso II
apresentado ao curso de
graduação em Biomedicina do
Instituto de Ciências Biomédicas
(ICBIM) como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina pela Universidade
Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 13 de Dezembro de 2017.

Banca examinadora:

Luiz Borges Bispo da Silva (Orientador - UFU)

Celene Maria de Oliveira Simões Alves (Examinadora - UFU)

Érica Carolina Campos Pulici (Examinadora - UFU)

RESUMO

Os mastócitos são células imprescindíveis na resposta alérgica e inflamatória para o nosso organismo. Além disso, estas células podem estar envolvidas no remodelamento de tecidos em condições patológicas, como no caso da hipertensão, diabetes e insuficiência cardíaca, por exemplo. O sistema renina-angiotensina está envolvido na ativação dos mastócitos, e portanto, deve ser estudado juntamente com estas células para se entender a fisiopatologia das doenças cardiovasculares como a cardiomiopatia diabética, que irá prejudicar muito as funções cardíacas pela fibrose, aumento da pressão arterial e danos causados. A inibição do sistema renina-angiotensina foi feita através do uso de alisquireno, um inibidor da renina utilizado como anti-hipertensivo na clínica. Nesse estudo, os animais foram divididos em três grupos sendo controles não-diabéticos, controles diabéticos e diabéticos tratados com alisquireno. Os animais diabéticos apresentaram um grande aumento no número de mastócitos cardíacos se comparados ao grupo controle, e o grupo tratado com alisquireno apresentou um baixo número dessas células, mostrando uma relação entre a inibição do sistema renina-angiotensina e a quantidade de mastócitos. Outro dado analisado foi o percentual de fibrose cardíaca, que também está envolvido em disfunções miocárdicas, porém não apresentou diferenças significativas nesse experimento, visto que talvez seja necessário um tempo maior de indução de diabetes para que comece a ser observado diferenças na quantidade de fibrose no tecido. A ação da endotelina I e do succinato podem estar envolvidas com o desenvolvimento e multiplicação dos mastócitos cardíacos e da fibrose, porém mais estudos precisam ser feitos para elucidar essa questão.

Palavras chaves: Alisquireno, diabetes, disfunções cardíacas, fibrose, mastócitos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo Geral	11
3.2 Objetivos Específicos	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Considerações Éticas	12
4.2 Animais	12
4.3 Indução de Diabetes Mellitus	12
4.4 Grupos de estudo	13
4.5 Análise Histoquímica	13
4.5.1 Azul de Toluidina	13
4.5.2 Vermelho de Picrossirius (Picrosirius Red)	13
4.6 Análise Estatística	14
5. RESULTADOS	15
5.1 Glicemia	15
5.2 Densidade Mastocitária Cardíaca	16
5.3 Fibras de Colágeno	17
6. DISCUSSÃO	19
7. CONCLUSÕES	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. Introdução

Mastócitos são células do tecido conjuntivo que possuem grânulos em seu interior, os quais contêm mediadores químicos como histamina, proteases, citocinas, fatores de crescimento, agentes vasoativos, glicosaminoglicanos, além de sintetizarem renina. São células originárias de precursores hematopoiéticos pluripotentes da medula óssea que circulam no sangue e migram para os tecidos; os mastócitos desempenham um papel importante na inflamação, reparo tecidual e defesa do hospedeiro (ZIZZI *et al.*; 2011). Cabe ressaltar que, apesar da densidade mastocitária ser maior em órgãos como a pele e no trato respiratório, essas células também são encontradas no coração e participam ativamente nos processos de reparo e remodelamento em todos esses locais.

Diversas doenças estão relacionadas com a ativação e desgranulação dos mastócitos; assim, em corações submetidos experimentalmente à sobrecarga de volume, tem sido demonstrado que os mastócitos são capazes de ativar metaloproteinases de matriz via proteases (MMPs), as quais degradam fibras de colágeno participando, portanto, no remodelamento do coração na referida condição experimental (LEVICK *et al.*, 2011). A degradação do colágeno poderá ser maior do que a síntese se houver uma ativação significativa dessas metaloproteinases, daí a importância desse mecanismo. Nesse sentido, Peterson e colaboradores (2001) mostraram que o aumento na atividade de MMPs em situações de sobrecarga de pressão também contribui para o remodelamento ventricular.

A estabilização da membrana celular dos mastócitos (e a consequente ausência ou redução da liberação de mediadores químicos) pode levar à diminuição de efeitos adversos no organismo. O cromoglicato de sódio é um medicamento utilizado na profilaxia da asma e como antialérgico. Ele age inibindo a desgranulação dos mastócitos, impedindo assim a liberação de substâncias que irão causar hipersensibilidade. Dessa forma, o cromoglicato também é uma substância útil em estudos que avaliam a participação dos mastócitos em diferentes condições patológicas. Em um experimento realizado com ratas ovariectomizadas, observaram-se aumentos na pressão arterial

sistólica, na massa e espessura da parede do ventrículo esquerdo, quando comparados àquelas de ratas-controle, sendo que essas alterações diminuíram após 4 semanas de tratamento com cromoglicato (WANG et al., 2016). Nesses animais, a ovariectomia levou a uma condição chamada de disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, associada a aumento na quantidade de mastócitos cardíacos e à fibrose miocárdica. Em conjunto, esses dados corroboram a hipótese de participação dos mastócitos em doenças cardíacas, sugerindo que há uma relação entre o número de mastócitos e o percentual de fibrose no coração.

O processo de fibrose cardíaca envolve o acúmulo de miofibroblastos nesse órgão, deposição de colágeno intersticial e perivascular, remodelamento da matriz extracelular e rigidez do tecido; assim, a elasticidade reduzida compromete a função do coração (CHENG et al., 2017). Estudos mostram um elevado número de mastócitos cardíacos em processos que envolvem hipertrofia e insuficiência cardíaca (BALAKUMAR et al., 2008), além de uma relação entre os mastócitos e o desenvolvimento de fibrose em casos de hipertensão (LEVICK et al., 2009). Esses dados sugerem que os mastócitos estão envolvidos na fibrose cardíaca patológica e reforçam a importância do conhecimento da ação dessas células, no que tange ao aumento da deposição de fibras de colágeno cardíacas, objetivando o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

A hiperglicemia (i.e., o aumento da concentração de glicose sanguínea) é o sintoma mais característico do Diabetes mellitus (DM), uma doença metabólica generalizada, causada por deficiência ou resistência à ação da insulina, sendo considerada um dos problemas de saúde mais importantes no mundo. Pacientes com diabetes são susceptíveis ao desenvolvimento de diversas complicações microvasculares, como retinopatia, nefropatia e neuropatia (RAHIMI, Z.; 2016). Existem dois tipos de DM, designados de DM tipo 1 e tipo 2. No DM tipo 1, que corresponde de 5% a 10% da população com a doença, o sistema imunológico ataca as células beta-pancreáticas, fazendo com que pouca ou nenhuma insulina seja produzida, causando hiperglicemia. No DM tipo 2, o organismo não consegue utilizar corretamente ou não produz insulina suficiente para manter uma glicemia adequada. Esse é o tipo mais comum de diabetes, atingindo cerca de 90% daqueles que possuem a doença (MACHADO, F. F.; 2017).

Em pacientes com insuficiência cardíaca, tanto em grupos com alguma disfunção de ejeção quanto em grupos com ejeção preservada, o DM representa um importante preditor de morbidade e mortalidade (MacDONALD et al., 2008). Os principais fatores que levam os diabéticos a terem uma maior propensão a doenças cardíacas são: presença de maiores danos na artéria coronária e maiores chances de lesões ateroscleróticas, além disso, nos dois tipos de DM a hipertensão arterial é uma comorbidade muito frequente (FERRANNINI et al., 2012). Ainda, diversos estudos histopatológicos mostraram que, independentemente da presença de aterosclerose e hipertensão, pacientes diabéticos apresentam maior fibrose miocárdica quando comparados aos pacientes não diabéticos. A fibrose perivascular e intersticial são características da chamada “cardiomiopatia diabética”, a qual pode evoluir para estados de insuficiência cardíaca (RUBLER et al., 1972). A fibrose intersticial em diabéticos ocorre pelo acúmulo de colágeno tipos 1 e 3 nos dois ventrículos cardíacos, sendo frequentemente acompanhadas de hipertrofia do miocárdio e alterações microvasculares (KAWAGUCHI et al., 1997).

A renina é uma enzima proteolítica secretada pelas células justaglomerulares dos rins em resposta a uma série de estímulos fisiológicos e que irá promover a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Nesse sistema, a renina liberada na corrente sanguínea irá clivar o angiotensinogênio gerando a angiotensina I, essa, por sua vez, será convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) à forma ativa de angiotensina, denominada angiotensina II (Ang II). A Ang II possui ação direta e indiretamente como vasoconstrictora e irá estimular a secreção de aldosterona pelas suprarrenais, a qual provocará aumento na reabsorção de sódio e água e, portanto, aumentará a volemia e a pressão arterial sistêmica. Assim, a renina tem um papel muito importante no sistema cardiovascular, ao regular a pressão arterial e o tônus vascular. O alisquireno foi o primeiro inibidor da renina de uso oral utilizado como anti-hipertensivo eficaz. Ele promove significativa redução na pressão arterial quando utilizado em monoterapia ou em conjunto com outras drogas. A administração de inibidores do SRAA diminui o número de mastócitos cardíacos e essa diminuição leva a um menor remodelamento cardíaco (PARVING et al., 2012). Uma ativação exagerada do SRAA em doenças como

insuficiência cardíaca irá contribuir para uma fibrose miocárdica (NAKANO et al., 2017). O aumento nas concentrações de Ang II e de aldosterona incrementará a síntese de colágeno e diminuirá sua degradação promovendo, consequentemente, o acúmulo de proteínas da matriz extracelular. Esse desequilíbrio levará a um aumento na rigidez do tecido, disfunção contrátil, além de mudanças morfológicas. A produção de Ang II no tecido cardíaco, relacionada à atividade da renina proveniente de mastócitos, provoca liberação de norepinefrina de terminais nervosos simpáticos, levando à fibrilação ventricular. A estabilização dos mastócitos com cromoglicato diminui a liberação de norepinefrina e com isso as arritmias cardíacas. O mesmo efeito protetor foi observado em animais com deficiência de mastócitos comparados a grupos controle, sugerindo que a renina derivada de mastócitos é essencial para a ativação do sistema renina-angiotensina cardíaco, bem como para a orquestração da liberação de norepinefrina em casos de isquemia/reperfusão e sua repercussão deletéria, as arritmias (MACKINS et al., 2006).

Uma maior atividade da renina plasmática irá elevar as concentrações de Ang I e Ang II no organismo e, consequentemente, haverá uma acelerada fibrose tanto intersticial quanto perivascular, com hipertrofia cardiovascular e aumento da espessura do septo interventricular (OKAMOTO et al. 2017). Também foram observadas melhoras significativas em pacientes cardiopatas que utilizaram bloqueadores dos receptores de angiotensina ou inibidores da ECA, os quais apresentaram melhora na fração de ejeção e redução da hipertrofia ventricular esquerda (SWOBODA et al., 2017). Esses dados evidenciam a ligação direta entre SRAA e a fibrose cardíaca.

Assim, considerando: (i) o papel dos mastócitos em diferentes mecanismos fisiopatológicos cardíacos, em especial a sugestão de sua participação no desenvolvimento de fibrose miocárdica; (ii) a constatação de que o diabetes pode causar fibrose miocárdica; (iii) a sugestão de que mastócitos cardíacos secretam renina; e (iv) a capacidade que o sistema renina angiotensina possui de estimular o desenvolvimento de fibrose no sistema cardiovascular; aventamos a hipótese de que os corações de ratos diabéticos possuem maior número de mastócitos e que essas células possam secretar renina, a qual pode contribuir para a fibrose cardíaca associada ao diabetes.

2. Justificativa

As doenças cardiovasculares e o diabetes ainda são um grande problema de saúde pública. Indivíduos diabéticos podem apresentar alterações cardíacas associadas à insuficiência desse órgão. A fisiopatologia de tal condição, denominada cardiomiopatia diabética, ainda está sendo definida e sua compreensão é de extrema importância para a elaboração de estratégias terapêuticas seguras e eficazes.

3. **Objetivos**

- **Objetivos Gerais**

- Caracterizar a fibrose e a população mastocitária cardíacas em ratos diabéticos tratados ou não com um inibidor de renina.

- **Objetivos Específicos**

- Determinar a área de fibrose miocárdica em corações de ratos controles, diabéticos e diabéticos tratados com alisquireno.
- Determinar a densidade mastocitária em corações de ratos controles, diabéticos e diabéticos tratados com alisquireno.

4. Material e Métodos

4.1 Considerações Éticas

Todos os protocolos do presente projeto foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo 122/11).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 – 300 g). Os animais foram mantidos no Biotério de Animais da Área de Ciências Fisiológicas (BIODARF) em estantes climatizadas, com temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

4.3 Indução de Diabetes Mellitus

O DM foi induzido pela administração do análogo tóxico da glicose, aloxano (Sigma-Aldrich), o qual é captado pelo transportador de glicose do tipo GLUT-2 presente nas células beta pancreáticas, causando a necrose destas células e, consequentemente, abolindo a secreção endógena de insulina, característica do DM tipo 1. Assim, após um período de jejum absoluto de 24 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália) solução a 2,5%, na dosagem de 25 mg/Kg, administrado por via peritoneal. Posteriormente, 50 mg/kg de aloxano (em solução à 0,9% de NaCl) foi administrado intravenosamente utilizando-se a veia peniana. A glicemia capilar foi aferida 24 horas após a indução, utilizando-se um glicosímetro (Accu Check Active, Roche), considerando-se diabéticos os animais que apresentavam glicemia maior que 200 mg/dL. Os animais portadores do quadro de DM tipo 1 foram submetidos à insulino terapia (1 unidade em dias alternados por via subcutânea) com insulina NPH (Humulin N®, Lilly); esse procedimento objetivou manter os animais em quadro hiperglicêmico, porém, minimizando a alta mortalidade causada pela exacerbação deste quadro, comum com o modelo de DM empregado no presente estudo.

4.4 Grupos de Estudo

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

1) Controles (ND) – não diabéticos (N = 05);

2) Diabético (DB) – com DM sem tratamento (N = 06);

3) Alisquireno (DB+ALQ) - com DM tratados com inibidor de renina (50 mg/Kg/dia, por 90 dias, administrado por gavagem) (MARTINS-OLIVEIRA et al., 2012) (N = 08).

Após 90 dias de tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta de urina e, posteriormente, de sangue, para análise bioquímica. Realizada a coleta de material biológico para os exames laboratoriais, os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália) e seus corações foram coletados, fixados em methacarn e incluídos em parafina para análises morfológicas. Após a coleta dos corações os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia. Apresentaremos aqui apenas os dados histológicos para determinação da população mastocitária e da fibrose miocárdica, bem como os dados de glicemia dos animais.

4.5 Análise Histoquímica

Foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura, a partir dos corações emblocados em parafina e submetidos às seguintes colorações, para posterior análise em microscópio óptico, com aumento de 100x:

4.5.1 Azul de Toluidina

A coloração de azul de toluidina em pH ácido permite a identificação dos mastócitos, cujos grânulos são metacromáticos, propriedade caracterizada pela coloração púrpura.

4.5.2 Vermelho de Picrossírius (*Picrosirius Red*)

A coloração com vermelho de picrosirius é o método mais utilizado para

evidenciar a presença de fibras colágenas no tecido, especialmente colágeno tipo I e tipo III. As lâminas coradas com vermelho de picrossirius foram analisadas utilizando o software Image J® (Versão 1.4) para análise da porcentagem de colágeno cortical, separando os cortes em três partes sendo eles ventrículo direito, ventrículo esquerdo e septo.

4.6 Análise Estatística

Os dados apresentados representam a média $\pm$ EPM de 5-8 animais. Os parâmetros foram analisados empregando-se a ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls com o auxílio do software GraphPad Prism® Version 5.00. As diferenças foram consideradas significativas quando p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Glicemia

A glicemia dos animais tratados com aloxano foi significativamente maior do que aquela de animais tratados com salina (não diabéticos: ND), tanto 24 horas quanto 90 dias após o tratamento (Figura 1).

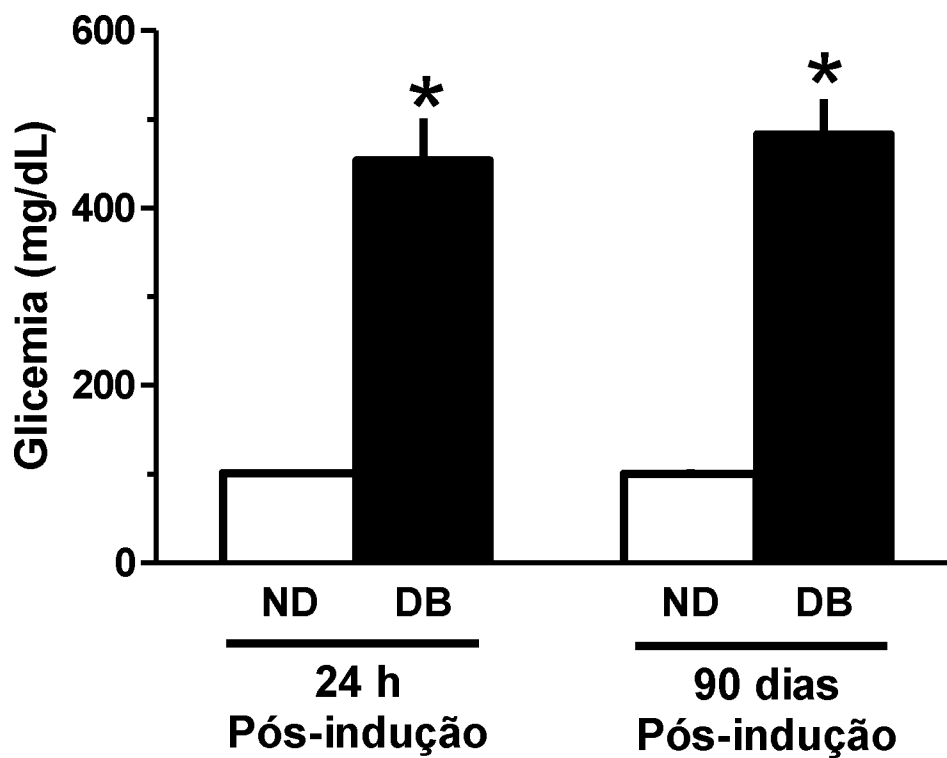


Figura 2: Glicemia dos animais tratados com salina (não diabéticos: ND) ou aloxano (diabéticos: DB), 24 horas ou 90 dias após o tratamento. * $p < 0,05$ vs. ND (Teste t-Student); $n = 5-7$.

5.2 Densidade mastocitária cardíaca

De acordo com a análise das lâminas histológicas coradas com azul de toluidina, foi observado que a densidade dos mastócitos no coração dos animais diabéticos foi maior do que aquela nos corações de animais não diabéticos (controles). O tratamento com alisquireno normalizou a densidade mastocitária nos corações de animais diabéticos (Figura 2).

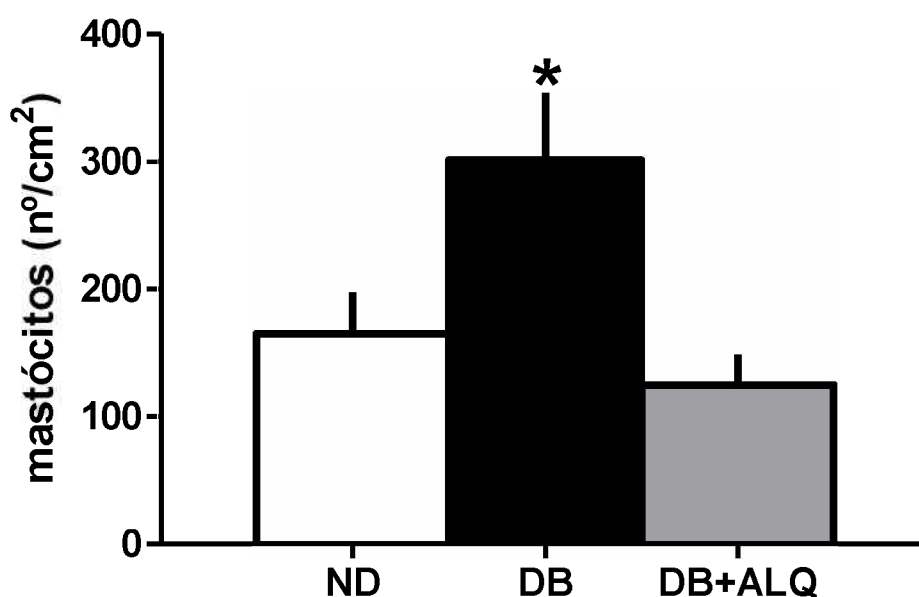


Figura 2: Densidade mastocitária no coração de ratos controles (não diabéticos), diabéticos e diabéticos tratados com alisquireno. * $p < 0,05$ vs. controle (ANOVA/Newman-Keuls); $n = 5-8$. ND = animais controles não diabéticos; DB = animais diabéticos; DB+ALQ = animais diabéticos tratados com alisquireno.

5.3 Fibras de Colágeno

A análise das lâminas coradas com vermelho de picrossírius evidenciou a presença de fibras de colágeno no interstício cardíaco, bem como ao redor dos

vasos sanguíneos (fibrose perivascular) (Figura 3). Os dados apresentados na Figura 4 correspondem à porcentagem da área marcada pelo corante no tecido cardíaco total (Figura 4A), além daquela avaliada separadamente no ventrículo direito (Figura 4B), septo (Figura 4C), e ventrículo esquerdo (Figura 4D). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

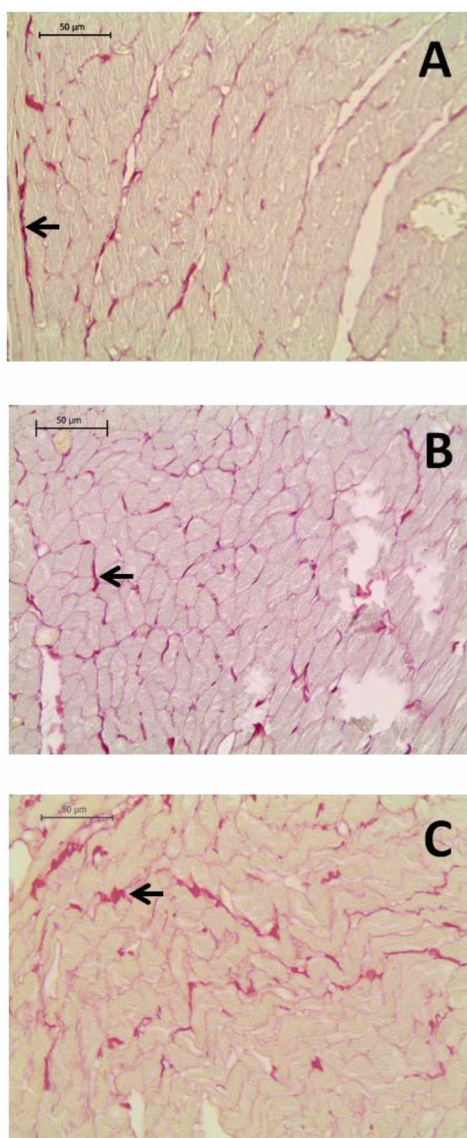


Figura 3. Fotomicrografia de secções representativas do ventrículo esquerdo de corações de ratos controles (A), diabéticos (B) e diabéticos tratados com alisquireno (C) coradas com vermelho de picrossírius. As setas indicam as fibras de colágeno.

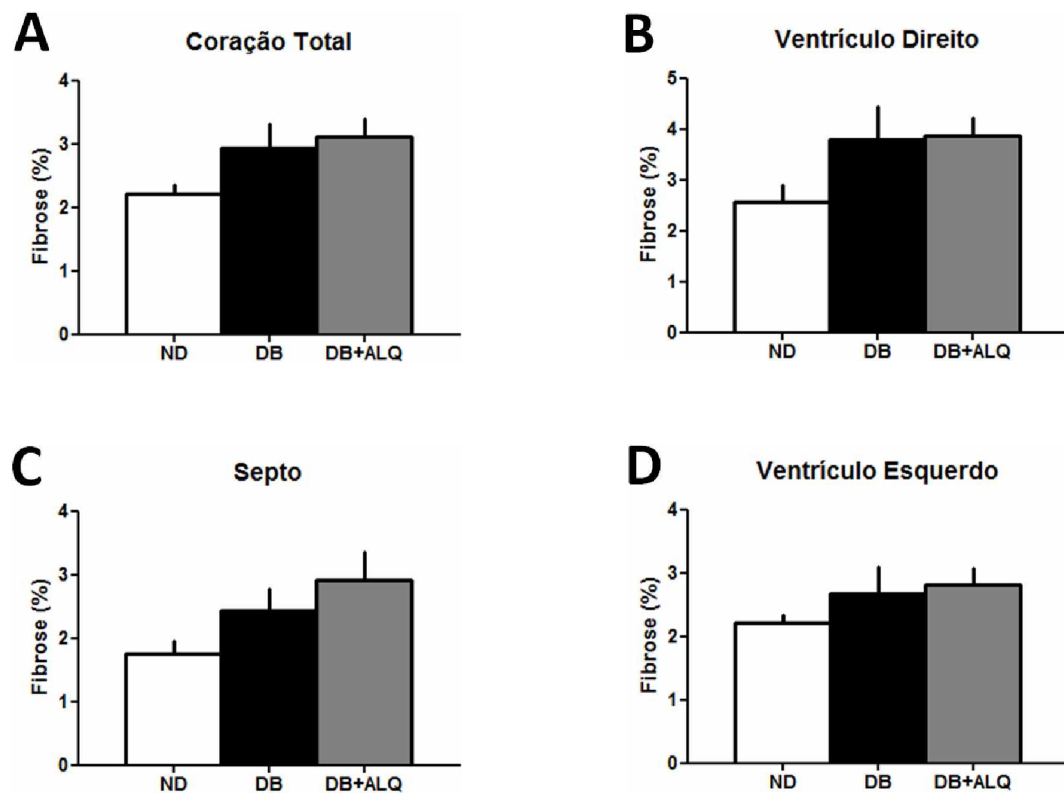


Figura 4. Porcentagem de fibrose tecidual de acordo com a região cardíaca considerada: (A) coração total, (B) ventrículo direito, (C) septo, (D) ventrículo esquerdo. Nenhuma diferença significativa foi observada; n=5-8. ND = animais controles não diabéticos; DB = animais diabéticos; DB+ALQ = animais diabéticos tratados com alisquireno.

6. Discussão

Como enfatizado recentemente por Russo e colaboradores (2016), a participação de mastócitos na indução de fibrose cardíaca associada ao DM ainda precisa ser elucidada. Nossos dados mostram claramente que o DM tipo 1 induz um aumento na população mastocitária cardíaca, um fenômeno que antecede a formação de fibrose (intersticial) miocárdica. Essa observação contrasta com aquela de Nishikori, Shiota e Okunishi (2014), os quais descrevem um atraso na migração de mastócitos para áreas de lesão de peles em camundongos com DM tipo 1. Dessa forma, é possível que o DM tipo 1 module a migração e/ou maturação/diferenciação de mastócitos de forma distinta na dependência do tecido e/ou do estímulo lesivo aplicado aos tecidos. Contudo, diferenças relacionadas às espécies estudadas não podem ser descartadas.

A fibrose miocárdica é um achado consistente em animais com DM induzido experimentalmente (ARES-CARRASCO et al., 2009; HAO et al., 2015), assim, o fato de não termos detectado fibrose significativa pode estar relacionado: (I) ao tempo decorrido entre a indução do DM e a remoção dos corações (90 dias em nosso estudo *versus* 165 e 120 dias, respectivamente, nos trabalhos descritos na literatura; ARES-CARRASCO et al., 2009; HAO et al., 2015); (II) as questões metodológicas. Com relação a essa última possibilidade, cabe salientar que no presente estudo evitamos analisar regiões do miocárdio com vasos sanguíneos, de forma que nossos resultados expressam mais a fibrose intersticial do que perivascular; entretanto, os estudos relatados na literatura não distinguem ambas quando realizam as análises (ARES-CARRASCO et al., 2009; HAO et al., 2015). Assim, reavaliações devem ser realizadas para confirmar essas possibilidades.

Apesar de há muito já estar estabelecido que o DM determina ativação do SRA, apenas na última década os mecanismos envolvidos nessa ativação foram descritos. Uma das hipóteses postula que a hiperglicemia causa aumentos na biossíntese de succinato pelas células endoteliais das arteríolas aferentes, o qual ativa o receptor GPR91 (um receptor metabotrópico que age como um detector do metabolismo celular) e que, por sua vez, estimula a liberação de

prostaglandinas pelo endotélio (TOMA et al., 2008; PETI-PETERDI; KANG; TOMA, 2008). Então, as prostaglandinas agem nas células do aparelho justaglomerular causando liberação de renina (TOMA et al., 2008; PETI-PETERDI; KANG; TOMA, 2008). Nossos dados sugerem que a ativação do SRA associada ao DM estimule, direta ou indiretamente, a migração e/ou maturação/diferenciação dos mastócitos no tecido cardíaco; de fato, o tratamento com o inibidor de renina normalizou a densidade mastocitária no coração de animais portadores de DM tipo 1. Ainda, interferências com o SRA intracardíaco, além do SRA sistêmico descrito acima, não podem ser descartadas, já que os mastócitos são capazes de sintetizar e secretar renina no coração (MACKINS et al., 2006).

Uma possível explicação para o fato de que a migração e/ou maturação/diferenciação dos mastócitos no tecido cardíaco requer atividade da renina seria a relação entre o SRA e a síntese e liberação de endotelina 1 (ET-1). Nesse sentido, tem sido demonstrado que o DM tipo 1 associa-se a aumento na população de mastócitos nas artérias do leito mesentérico, um fenômeno sensível à bosentana, um antagonista de receptores dos subtipos A e B para a ET-1 (GILBERT et al., 2000). Além disso, a Ang II é capaz de estimular a liberação de ET-1 pelas células endoteliais (FERRI et al., 1999), bem como de aumentar a expressão gênica de ET-1 em células do músculo liso vascular (HONG et al., 2004). Sendo assim, a inibição da renina presumivelmente diminuiria as concentrações intracardíacas de Ang I e, consequente de Ang II e de ET-1 (cuja liberação é estimulada pela Ang II), o que diminuiria a migração e/ou maturação/diferenciação dos mastócitos no tecido cardíaco, uma hipótese que permanece por ser investigada.

7. Conclusões

- Não houve fibrose (intersticial) significativa nos corações de ratos portadores de DM tipo 1, 90 dias após a indução da doença com aloxano;
- Houve aumento na densidade mastocitária nos animais portadores de DM tipo 1, 90 dias após a indução da doença com aloxano, um fenômeno que precede a fibrose intersticial;
- O tratamento de animais diabéticos com alisquireno diminui a densidade mastocitária
- O aumento na densidade mastocitária cardíaca foi causado, direta ou indiretamente, pela atividade da renina.

8. Referências

ARES-CARRASCO, S. et al. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.297, p.2109-2119, 2009.

BALAKUMAR P., et al. Resident cardiac mast cells: are they the major culprit in the pathogenesis of cardiac hypertrophy? **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v.102(1), p.5–9,2008.

CHENG, Y. et al. Large accumulation of collagen and increased activation of mast cells in hearts of mice with hyperlipidemia. **Arq. Bras. Cardiol**, [online] 2017.

FERRANNINI, E.; Cushman, W.C. Diabetes and hypertension: the bad companions, **Lancet** v.380 p.601–610, 2012.

HAO, P.P. et al. Angiotensin-(1-7) treatment mitigates right ventricular fibrosis as a distinctive feature of diabetic cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 308, p. 1007-1019, 2015.

KAWAGUCHI, M. et al. A comparison of ultrastructural changes on endomyocardial biopsy specimens obtained from patients with diabetes mellitus with and without hypertension, **Heart Vessel** v.12, p. 267–274, 1997.

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

LEVICK, S. P.. Cardiac mast cells: the centrepiece in adverse myocardial remodeling. **Cardiovasc Res** v.89, p.12–19, 2011.

LIAO C.H. et al. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. **J Clin Invest.** v.120(1) p.242-253, 2010.

MacDONALD, M.R. et al., Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the candesartan in heart failure: assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM) programme, **Eur. Heart J.** v.29, p. 1377–1385, 2008.

MACHADO, F. F. "Diabetes tipo 1"; **Brasil Escola**. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/doencas/diabetes-tipo-i.htm>>. Acesso em 10 de dezembro de 2017.

MACKINS, C. J. et al., Cardiac mast cell–derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. **The Journal of Clin Invest** v. 116 (4), p. 1063-1070, 2006.

MARTINS-OLIVEIRA, A. et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. **Int J Cardiol** v.167(4), p. 1199-205, 2013.

OKAMOTO, C. et al. Excessively low salt diet damages the heart through activation of cardiac (pro) renin receptor, renin-angiotensin-aldosterone, and sympatho-adrenal systems in spontaneously hypertensive rats. **PLoS One** v.12(12), 2017.

PETERSON, J.T. et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. **Circul**, v.103, p. 2303– 2309, 2001.

PETI-PETERDI, J.; KANG, J.J.; TOMA, I. Activation of the renal renin-angiotensin system in diabetes--new concepts. **Nephrol Dial Transplant.** v.23, p.3047-3049, 2008.

RUBLER, S. et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis, **Am. J. Cardiol.** v.30, p. 595–602, 1972.

SWOBODA, P.P. et al. Diabetes mellitus, microalbuminuria, and subclinical cardiac disease: identification and monitoring of individuals at risk of heart Failure. **J Am Heart Assoc.** v.6(7), 2017.

TOMA, I. et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. **J Clin Invest.** v.118(7), p.2526-2534, 2008.

WANG, H. et al. Mast Cell Inhibition Attenuates Cardiac Remodeling and Diastolic Dysfunction in Middle-aged, Ovariectomized Fischer 344 - Brown Norway Rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.68, p.49–57, 2016;.

ZIZZI, A. et al. Peri-implant diseases and host inflammatory response involving mast cells: a review. **Intern Journ of Immunopath and Pharm.** v.3, p.557-566, 2011.