

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GRASIELLE LOPES DE OLIVEIRA SILVA

**INTERAÇÃO ENTRE TESTOSTERONA E ATIVIDADE MASTOCITÁRIA NO
DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE RENAL INDUZIDA POR OBSTRUÇÃO
URETERAL EM RATOS WISTAR**

UBERLÂNDIA

2015

GRASIELLE LOPES DE OLIVEIRA SILVA

**INTERAÇÃO ENTRE TESTOSTERONA E ATIVIDADE MASTOCITÁRIA NO
DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE RENAL INDUZIDA POR OBSTRUÇÃO
URETERAL EM RATOS WISTAR**

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

Orientador: Luiz Borges Bispo-da-Silva

UBERLÂNDIA

2015

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

- S586i
2015 Silva, Grasielle Lopes de Oliveira, 1990-
Interação entre testosterona e atividade mastocitária no desenvolvimento da fibrose renal induzida por obstrução ureteral em ratos wistar / Grasielle Lopes de Oliveira Silva. - 2015.
72 f. : il.
- Orientador: Luiz Borges Bispo-da-Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.
1. Citologia - Teses. 2. Mastócitos - Teses. 3. Rins - Doenças - Teses. I. Bispo-da-Silva, Luiz Borges. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

GRASIELLE LOPES DE OLIVEIRA SILVA

**INTERAÇÃO ENTRE TESTOSTERONA E ATIVIDADE MASTOCITÁRIA NO
DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE RENAL INDUZIDA POR OBSTRUÇÃO
URETERAL EM RATOS WISTAR**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profª Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira Gregolini
(Examinador - UNESP)

Profª Dra. Samara Urban de Oliva
(Examinador - Centro Universitário São Camilo)

UBERLÂNDIA

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, João José e Maria
Aparecida, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter escutado minhas orações e iluminado meus passos nessa caminhada.

Aos meus pais, João José e Maria Aparecida, que fizeram dos meus sonhos os seus sonhos, pela confiança e empenho. Obrigada por serem meus maiores incentivadores e por estarem sempre ao meu lado. Essa vitória também é de vocês.

Aos meus irmãos, Danielle e Gustavo, sempre presentes e atenciosos. Obrigada, pela amizade e companheirismo.

Ao meu namorado Gabriel, que sempre esteve ao meu lado, me dando carinho e atenção. Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência e pelo companheirismo.

Ao meu orientador Luiz, por esses quatro anos que fiquei no laboratório, pela confiança e aprendizado. Obrigada por acreditar no meu potencial e me incentivar a fazer pesquisa. Continue sendo exemplo de professor e pesquisador.

A professora Ana Paula, pela paciência, colaboração e incentivo. Obrigada por me fazer apaixonar pelos rins e ser um exemplo de pessoa.

A professora Fernanda, pela colaboração e por me incentivar na pesquisa e na área acadêmica.

A professora Karen, pela oportunidade no estágio docência e pelas ajudas no decorrer dos experimentos.

A professora Renata, por ser tão prestativa e me auxiliar no uso do microscópio.

Aos colegas de laboratório da Fisiologia, por terem me ajudado e terem ficado várias noites fazendo companhia no laboratório.

A Simone, que fez parte desse trabalho ajudando nas ideias e partes dos experimentos. Obrigada pela força e apoio!

Aos colegas de laboratório, Marcela (Coleguinha) e Samuel, que apesar de terem ficado pouco tempo, fizeram meus momentos no laboratório serem mais animados.

A Ingrid, que sempre me ajudou nos experimentos desde o início. Pessoa admirável, que vou sentir muita falta! Obrigada pela força, companhia e por estar sempre presente nos momentos que mais precisei.

A Nathane, amizade antiga, dos tempos da graduação. Sempre tão prestativa e companheira. A sua paixão pelos rins, me fez cada dia também me interessar mais. Obrigada por estar sempre comigo.

A Raquel, pelas horas de conversas e ideias trocadas. Obrigada por ter sempre aquela palavra amiga.

Aos meus amigos de outras cidades, que entenderam meus momentos de ausência.

Aos meus familiares que me incentivaram e apoiaram minhas decisões.

Aos Professores do Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, por todo conhecimento passado e por me fazerem interessar cada dia mais pela pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado, que fizeram as aulas e apresentações serem mais interessantes.

Aos colegas da terceira turma de Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia, que entraram no mestrado comigo e dividiram momentos de estresse, alegrias, tristezas e conquistas.

Enfim, agradeço a todos que de algum modo contribuíram para realização deste trabalho.

“O grande obstáculo ao conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do conhecimento.”

Daniel Boorstein.

RESUMO

Os mastócitos são um grupo de células multifuncionais, derivadas de células progenitoras hematopoiéticas, sob influência do fator de células-tronco. Estudos obtiveram evidências que reforçam a importância dessas células no desenvolvimento da fibrose renal. Relatam que a deposição intrarenal de colágeno foi significativamente menor nos animais deficientes em mastócitos, quando comparados aos controles não deficientes, 7 e 14 dias após obstrução uretérica. Outros estudos observaram que o aumento da deposição de fibras de colágeno nos rins induzido pela obstrução ureteral é mais intenso em machos do que em fêmeas; notaram, ainda, que a orquiectomia inibiu o desenvolvimento de fibrose renal associada à amarração do ureter. Assim, no presente trabalho objetivamos: (i) avaliar o número de mastócitos, a expressão de α -actina, PCNA e o nível de fibrose em rins submetidos à amarração ureteral em animais pré-tratados com cromoglicato de sódio (inibidor da desgranulação mastocitária) ou salina; (ii) avaliar se a orquiectomia e a administração de testosterona altera o padrão de alterações renais induzidas no modelo. Para isso, cada animal permaneceu 21 dias em experimentação, sendo considerado o dia 0 (zero), o dia do início dos experimentos. Neste dia os animais eram submetidos à falsa-operação ou a orquiectomia. No 7º dia, os animais eram submetidos à falsa operação ou à amarração do ureter esquerdo. Decorridos 14 dias de amarração os animais eram anestesiados e sacrificados para coleta do material biológico. A reposição hormonal iniciou-se um dia após a orquiectomia, i.e., no dia 1, o tratamento com cromoglicato iniciou-se no 5º dia. O rim foi fixado e processado, e em seguida foi realizado cortes para corar com azul de toluidina, com o intuito de quantificar mastócitos; Picrosirius red, para análise do colágeno; hematoxilina e eosina para análise do glomérulo e morfologia. Além disso, foram realizadas duas imunohistoquímicas, para α -actina e PCNA. Foi possível observar uma diminuição da área do glomérulo e do tufo capilar no grupo em que foi induzida a lesão renal. Além disso, ocorreu um aumento da densidade de mastócitos, sendo que a orquiectomia e o tratamento com cromoglicato diminuíram esse efeito, o mesmo foi observado para o colágeno. Também houve um aumento de células PCNA⁺ nos rins lesionados, porém somente a orquiectomia bloqueou parcialmente esse efeito. Enquanto que a avaliação da α -actina, o cromoglicato e a orquiectomia diminuíram parcialmente o aumento da expressão de α -actina causada pela lesão renal. O presente estudo sugere que há uma interação entre mastócito e testosterona no desenvolvimento de fibrose renal no modelo de obstrução ureteral.

Palavras- chaves: mastócitos, testosterona, lesão renal, fibrose.

ABSTRACT

Mast cells are a group of multifunctional cells derived from hematopoietic stem cells, under the influence of stem cell factor. Studies have found evidence that reinforce the importance of these cells in the development of renal fibrosis. These studies report that intrarenal collagen deposition was significantly lower in mice deficient in mast cells, when compared to non-deficient controls, 7 and 14 days after ureteric obstruction. Other researches described that increased deposition of collagen fibers in kidneys with induced ureteral obstruction is more intense in males than females; they have also noticed that orchiectomy inhibited the development of renal fibrosis associated with ureteral obstruction. Thus, the present study aimed to: (i) assess the number of mast cells, the expression of α -actin, PCNA and the level of fibrosis in kidneys of animals underwent ureteral obstruction pretreated with sodium cromoglycate (an inhibitor of mast cell degranulation) or saline; (ii) to evaluate whether orchiectomy and testosterone administration alters the pattern of renal changes induced in the experimental model. To do so, each animal remained 21 days in trial, and it is considered day 0 (zero) the day of the beginning of the experiments. On this day the animals were subjected to a false-operation or orchiectomy. On the 7th day, the animals were subjected to a false-operation or ureteral obstruction. After 14 days of the obstruction the animals were anesthetized and sacrificed to collect biological material. Hormone replacement began one day after orchiectomy, wich means, on day 1 and the treatment with cromoglycate began on the 5th day. The kidney was fixed, embedded, sectioned and then stained with toluidine blue, in order to quantify mast cells; Picrosirius red, for analysis of collagen; Hematoxylin and eosin for examination of the glomerulus and morphology. In addition, two immunohistochemical analysis were performed: α - actin and PCNA. It was observed a decrease in the glomerulus and the capillary tuft area in the group that was induced renal damage. Furthermore, mast cells had an increased density, while orchiectomy and cromoglycate treatment decreased this effect and the same was observed for collagen. There was also an increase in PCNA + cells in the injured kidney, but only orchiectomy partially blocked this effect. Whilst evaluation of α -actin, cromoglycate and orchiectomy partially diminished the increased expression caused by renal injuries. The present study suggests that there is an interaction between mast cells and testosterone in the development of renal fibrosis model of ureteral obstruction.

Keywords: mast cells, testosterone, kidney damage, fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organização geral do rim.....	16
Figura 2- Localização e morfologia dos mastócitos.....	18
Figura 3 - Respostas fisiológicas mediadas pelos inúmeros mediadores mastocitários.....	19
Figura 4 - Mecanismos propostos para ação dos mastócitos na fisiopatologia renal.....	21
Figura 5- Etapas da síntese de testosterona a partir do colesterol e conversão da testosterona em outros esteróides ativos.....	22
Figura 6- Representação esquemática dos protocolos experimentais	28
Figura 7 - Procedimento utilizado para a castração dos animais.....	29
Figura 8- Procedimento cirúrgico para amarração do ureter esquerdo.....	30
Figura 9- Fotos das gaiolas metabólicas utilizadas no presente estudo para coleta de urina.....	31
Figura 10- Imagem ilustrativa da análise do glomérulo.....	33
Figura 11- Área da parede da pelve ou do parênquima de rins de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral.....	37
Figura 12- Histoarquitetura de rins de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral.....	38
Figura 13- Histoarquitetura de rins de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral.....	39
Figura 14- Áreas de inflamação aguda ou crônica em rins de ratos submetidos à amarração ureteral.....	40
Figura 15 – Presença de material amorfo acidófilo e de células no interior dos túbulos de rins oriundos de ratos submetidos à amarração ureteral.....	41
Figura 16- Área do glomérulo e do tufo capilar.....	41
Figura 17- Alterações glomerulares induzidas pela amarração ureteral.....	42
Figura 18- Fluxo urinário e taxa de filtração glomerular de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral unilateal.....	43
Figura 19- População de mastócitos no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.....	44
Figura 20- Densidade de mastócitos no parênquima renal dos diferentes grupos experimentais.....	45
Figura 21- Alterações induzidas pela amarração ureteral na densidade de mastócitos no parênquima e na pelve renais.....	46

Figura 22- Esquema ilustrativo da distribuição dos mastócitos no parênquima e pelve renais de animais falso-operados ou submetidos à obstrução ureteral.....	47
Figura 23- Presença de mastócitos na parede da pelve renal de ratos submetidos à amarração ureteral.....	48
Figura 24- Fibras de colágeno no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.....	49
Figura 25- Imagens representativas das alterações induzidas pela obstrução ureteral sobre a deposição de fibras de colágeno no parênquima renal.....	50
Figura 26- Imagens representativas das alterações induzidas pela obstrução ureteral sobre a deposição de fibras de colágeno no parênquima renal dos diferentes grupos experimentais.....	51
Figura 27 – Expressão túbulo-intersticial e glomerular de α -actina no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.....	52
Figura 28- Imagens representativas da expressão de α -actina em rins dos diferentes grupos experimentais.....	53
Figura 29- Número de células PCNA ⁺ túbulo-intersticial e glomerular no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.....	54
Figura 30- Imagens representativas da expressão de PCNA em rins dos diferentes grupos experimentais.....	55
Figura 31– Efeitos da orquiectomia e da reposição hormonal sobre os níveis séricos de testosterona.....	56
Figura 32 - Imagem representando a análise das fibras de colágeno.....	71
Figura 33 - Imagem representativa da quantificação de células PCNA ⁺ no rim pelo programa Image J.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL-8 - Interleucina 8

IL-16 - Interleucina 16

TNF- α – Tumor Necrosis Factor α

FGF -Fibroblast Growth Factor

VEGF- Vascular Endothelial Growth Factor

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

PGD₂ – Prostagladina D₂

IL-3- Interleucina 3

IL-4- Interleucina 4

IL-5- Interleucina 5

IL-6- Interleucina 6

PAR-S - proteases do subtipo 2

PCNA – Proliferation Cell Nuclear Antigen

PCNA⁺ - células PCNA positivas

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

FO- Falso-operado

LS - lesão; salina

LS-CG – lesão; cromoglicato

OQ – Orquiectomizado; salina

OQ- CG – Orquiectomizado; cromoglicato

OQ-TR – Orquiectomizado; testosterona; salina

OQ-TR/CG – Orquiectomizado; testosterona; cromoglicato

TFG – taxa de filtração glomerular

PCNA – Proliferation Cell Nuclear Antigen

PCNA⁺ - células PCNA positivas

α -SMA - α -Smooth Muscle Actin

DAB - 3,3 diaminobenzidina

BSA - Bovine Serum Albumin

PBS – Phosphate Buffered Saline

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Os Rins: Breve Visão Morfofuncional	16
2.2 Obstrução do trato urinário superior: modelo experimental	17
2.3 Mastócitos	17
<i>2.3.1 Participação dos Mastócitos no Desenvolvimento da Fibrose Renal</i>	<i>20</i>
2.4 Testosterona	22
<i>2.4.1 Participação da Testosterona no Desenvolvimento da Fibrose Renal</i>	<i>23</i>
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Animais	25
3.2 Grupos experimentais	25
3.3 Protocolos experimentais	27
<i>3.3.1 Sequência das manobras experimentais</i>	<i>27</i>
<i>3.3.2.1 Orquiectomia</i>	<i>28</i>
<i>3.3.2.2 Reposição Hormonal</i>	<i>28</i>
<i>3.3.2.3 Tratamento com cromoglicato de sódio</i>	<i>29</i>
<i>3.3.2.4 Amarração do ureter</i>	<i>30</i>
<i>3.3.2.5 Coleta do Material</i>	<i>31</i>
<i>3.3.3 Estudos de função renal</i>	<i>31</i>
<i>3.3.4 Coleta de Sangue</i>	<i>32</i>
<i>3.3.5 Dosagem de testosterona</i>	<i>32</i>
<i>3.3.6 Preparo dos órgãos e fixação</i>	<i>32</i>
3.4 Análises Histológicas	32
<i>3.4.1 Coloração com hematoxilina e eosina</i>	<i>32</i>
<i>3.4.2 Análise Morfométrica através da coloração de Hematoxilina e Eosina</i>	<i>33</i>
<i>3.4.3 Análise das lâminas coradas com azul de toluidina</i>	<i>34</i>
<i>3.4.3 Coloração com Picrosirius red</i>	<i>34</i>
<i>3.4.4 Análise das lâminas coradas com Picrosirius red</i>	<i>35</i>
3.5 Análise imunohistoquímica	35
<i>3.5.1 Avaliação dos resultados imunohistoquímicos</i>	<i>35</i>

3.6 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Caracterização da lesão renal induzida pela obstrução ureteral	37
<i>4.1.1 Caracterização Macroscópica</i>	<i>37</i>
<i>4.1.2 Caracterização Microscópica</i>	<i>39</i>
4.3 Fluxo Urinário e Taxa de Filtração Glomerular	43
4.3 População de Mastócitos Renais	44
4.4 Fibrose Renal	49
4.5 Expressão Renal de α-actina	52
4.7 Dosagem Sérica de Testosterona	56
6. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO A	67
ANEXO B	68
ANEXO C	69
ANEXO D	70
ANEXO E	71
ANEXO F	72

1. INTRODUÇÃO

A obstrução do trato urinário superior é uma causa comum de disfunção renal, a qual está associada a inúmeras alterações histológicas, como dilatação tubular e fibrose (KLAR; ISHIDOYA; MORRISSEY, 1995; NASCIMENTO; JULIO, 2010). A obstrução ureteral produzida experimentalmente induz alterações renais semelhantes às aquelas descritas após obstrução do trato urinário superior em humanos e, portanto, representa importante ferramenta para os estudos que objetivam investigar a patogênese da nefropatia obstrutiva (CHEVALIER et al., 2009; KLAR, ISHIDOYA e MORRISSEY, 1995, 2002; NAGLE et al., 1973; SHARMA et al., 1993; VEERAPAN et al., 2012).

Apesar das evidências que sugerem um elo causal entre a instalação de fibrose e a atividade mastocitária renais serem ainda limitadas e conflitantes, alguns estudos apontam, de fato, para um efeito pró-fibrótico dos mastócitos no tecido renal após obstrução ureteral (SUMMER et al., 2012; VEERAPPAN et al., 2012). Outro fator que parece contribuir para a orquestração da deposição de fibras de colágeno nessa condição é o hormônio sexual testosterona (METCLAFE et al., 2008; CHO et al., 2012). Assim, considerando que a literatura relata que os mastócitos expressam receptores para androgênios (CHEN et al., 2010), e que tanto a castração quanto o tratamento com inibidores da desgranulação mastocitária produzem efeitos anti-fibróticos nos rins após amarração ureteral (METCLAFE et al., 2008; CHO et al., 2012; SUMMER et al., 2012; VEERAPPAN et al., 2012), aventamos e testamos a hipótese de que parte dos efeitos deletérios atribuídos à testosterona, no contexto da patogênese da nefropatia obstrutiva, sejam mediados e/ou modulados pela atividade mastocitária.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como no presente estudo investigaremos a possível interação entre testosterona e atividade mastocitária para a deposição de fibras de colágeno nos rins após obstrução ureteral, descreveremos a seguir uma breve revisão da literatura sobre os aspectos morfofuncionais gerais desse órgão e dos mastócitos, bem como forneceremos informações relevantes sobre o modelo experimental utilizado. Por fim, faremos considerações sobre a participação dos mastócitos e da testosterona no desenvolvimento da fibrose renal induzida pela obstrução do trato urinário superior.

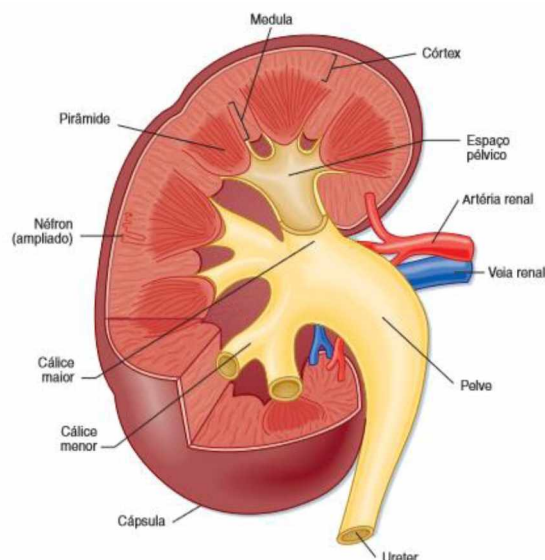
2.1 Os Rins: Breve Visão Morfofuncional

Os rins regulam a osmolalidade e os volumes corporais, participam no balanço eletrolítico ácido-básico. Além disso, excretam produtos do metabolismo e substâncias exógenas com as quais o organismo entra em contato, bem como produzem e secretam hormônios. A quantidade e a qualidade (composição) da urina eliminada são, portanto, consequências do papel regulador dos rins (AIRES, 2012; BERNE; LEVY, 2009).

Os rins são órgãos pareados situados na parede posterior do abdome, em cada lado da coluna vertebral, posicionados atrás do peritônio. O lado medial de cada rim contém uma região identificada como hilo, local por onde passam uma série de estruturas como a artéria e veia renais, o ureter, os nervos e vasos linfáticos renais. Dentro do rim, o hilo se expande em uma cavidade central denominada seio renal que aloja a pelve renal (DANGELO; FATTINI, 2007; GUYTON; HALL, 2006).

O rim está dividido em duas zonas: medular e cortical (ou córtex); essas zonas são compostas por néfrons (as unidades funcionais do rim), vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. A medula do rim humano se divide em massas cônicas, chamadas pirâmides renais (BERNE; LEVY, 2009; DANGELO; FATTINI, 2007).

Figura 1- Organização geral do rim.



Fonte: BERNE; LEVY, 2009.

2.2 Obstrução do trato urinário superior: modelo experimental

A obstrução do trato urinário superior é uma causa comum de disfunção renal tanto em adultos quanto em crianças. Nos adultos a obstrução pode ser consequência de doenças prostáticas, estenose ureteral, cálculos, ou compressão extrínseca do ureter. Em crianças, a causa mais comum é a obstrução da junção ureteropielica, a qual determina restrição ao fluxo urinário da pelve em direção ao ureter; tal obstrução pode ser precipitada por diferentes fatores, tais como segmento ureteral aperistáltico, pregas mucosas obstrutivas, pólipos ureterais e raramente por estenose verdadeira do ureter (BERNSTEIN et al 1988; METCALFE et al., 1997; NASCIMENTO; JULIO; 2010). A obstrução do trato urinário superior está associada a alterações histológicas, incluindo maciça dilatação tubular renal, fibrose renal progressiva devido à proliferação de fibroblastos intersticiais e ao aumento da deposição de matriz extracelular, além do recrutamento de células inflamatórias no compartimento intersticial do rim (KLAHR; ISHIDOYA; MORRISSEY, 1995).

Estudos realizados utilizando-se o modelo de obstrução ureteral unilateral, tanto em coelhos quanto em ratos, mostraram que a amarração do ureter resulta em proliferação de fibroblastos e sua transformação em miofibroblastos, bem como na síntese e deposição de proteínas da matriz extracelular, como fibras de colágeno I, III, IV e fibronectina (CHEVALIER et al., 2009; NAGLE et al., 1973; SHARMA et al., 1993; VEERAPAN et al., 2012). Assim, dadas às semelhanças nas alterações fisiopatológicas renais observadas nesse modelo com aquelas descrita após obstrução do trato urinário superior em humanos, a obstrução ureteral unilateral experimental passou a ser amplamente utilizada nos estudos que objetivam investigar a patogênese da nefropatia obstrutiva, os mecanismos responsáveis pela fibrose renal, e naqueles que pretendem desenvolver estratégias terapêuticas (CHEVALIER et al., 2009; KLHAR, ISHIDOYA; MORRISSEY, 1995, KLHAR; MORRISEY, 2002).

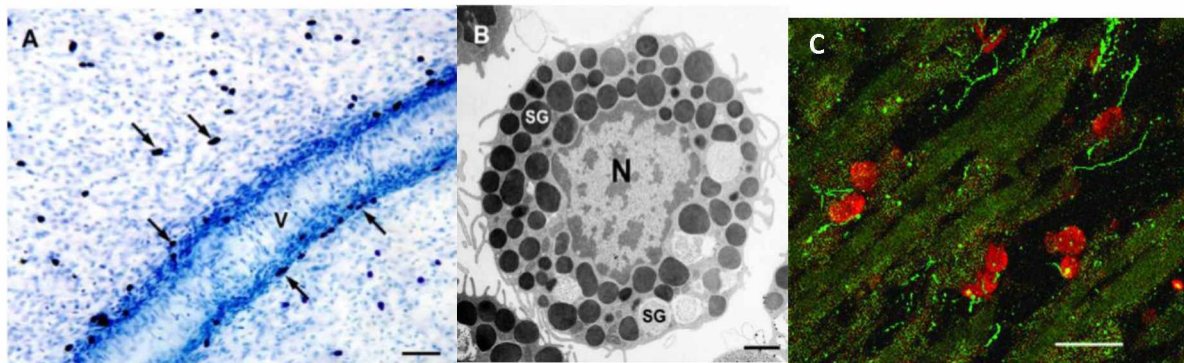
2.3 Mastócitos

Os mastócitos são um grupo de células multifuncionais, derivadas de células progenitoras hematopoiéticas; migram através do sangue para os tecidos periféricos (JAMUR; OLIVER, 2011) onde completam seu processo de amadurecimento sob influência de fatores do microambiente tecidual (SUMMERS et al., 2012; ZHENG et al., 2012). Essas células interagem

com vasos linfáticos, vasos sanguíneos, músculo liso e terminações nervosas, como sugere sua localização tecidual (LEVICK et al., 2011; WILGUS; WULFF, 2012) (Figura 2).

Os mastócitos podem apresentar-se alongados quando presentes no tecido conjuntivo, ou arredondados quando isolados da cavidade peritoneal (Figura 2). Essas células apresentam o citoplasma repleto de grânulos (os quais se coram metacromicamente por corantes básicos, como o azul de toluidina), microvilos finos na membrana plasmática, núcleo grande, central e arredondado, contendo dois ou mais nucléolos (COMBS, 1966; DVORAK et al., 1994; METCALFE et al., 1997) (Figura 2 A e B).

Figura 2- Localização e morfologia dos mastócitos.



Fonte: A e B: DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014; C: SILVER et al., 2004.

Proximidade dos mastócitos corados com azul de toluidina (apontados pelas setas) com a parede de um vaso sanguíneo mesentérico (V) (A). Mastócito maduro peritoneal repleto de grânulos secretores (SG) observado por meio de microscopia eletrônica de transmissão (B); note o núcleo grande e arredondado localizado centralmente (N). Mastócitos (detectados pela imunomarcacão com anticorpos anti-renina, em vermelho) localizados próximos a terminações nervosas (detectadas pela imunomarcacão com anticorpos anti-sinapsina, em verde) (C). Escala = 25 μ m, 1 μ m e 40 μ m, em A, B e C, respectivamente.

Os mastócitos são conhecidos por sua capacidade de sintetizar e liberar histamina, uma amina biogênica responsável pela vasodilatação que ocorre após a ativação imunológica dessas células, i.e., durante reações alérgicas. Contudo, os mastócitos são capazes de sintetizar uma gama de outros mediadores, tais como fatores de crescimento, proteases (quimase, triptase, carboxipeptidase A), citocinas, quimiocinas e metabólitos de ácidos graxos biologicamente ativos, como leucotrienos (FRAGOIANNIS et al., 1998; LEVICK et al., 2011; OVERED-SAYER et al., 2014) (Figura 3). Esses inúmeros produtos podem ser agrupados em:

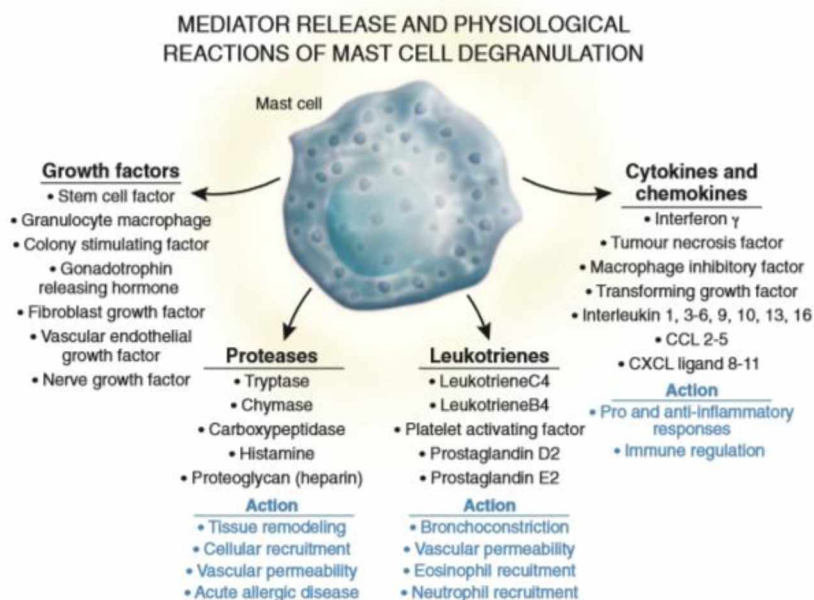
a) fatores pré-formados: histamina, heparina, β -hexosaminidase, proteoglicanas, proteases neutras, algumas interleucinas (IL-8 e IL-16), citocinas e fatores de crescimento

[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 ativação mastocitária; a maioria é constituída de derivados do metabolismo do ácido araquidônico, como a PGD₂ (prostaglandina D₂), leucotrienos e tromboxanas;

c) fatores neo-sintetizados: a síntese desses mediadores ocorre dentro de a 8-12 horas após a desgranulação; dentre eles destacam-se as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6 (GALLI; NAKAE; TSAI, 2005; LEVICK et al., 2011, METCALFE et al., 1997; YONG, 1997).

Figura 3 – Respostas fisiológicas mediadas pelos inúmeros mediadores mastocitários.



Fonte: HOLDWORTH, S.R; SUMMERS, S.A, 2008.

A desgranulação dos mastócitos resulta na liberação de fatores de crescimento, proteases, aminas biogênicas, leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas. Essas substâncias participam na remodelação tecidual, produzem quimotaxia, alteram a permeabilidade vascular, contribuem para a resposta imunológica imediata, induzem broncoconstrição, e promovem imunomodulação por meio de efeitos tanto pró- quanto anti-inflamatórios.

Os mastócitos são classicamente agrupados em dois fenótipos de acordo sua localização e conteúdo de serina-proteases em seus grânulos: *mastócitos de tecido conjuntivo* (que expressam quimase e triptase em seus grânulos); *mastócitos de mucosa* (que expressam apenas triptase) (SHIMIZU; TSUCHIYA; HORII, 2001; OVERED-SAYER et al., 2014). Com base na observação de que algumas espécies apresentam mastócitos quimase/triptase positivos e apenas triptase positivos no mesmo tecido, a literatura atual sugere que essas células sejam

classificadas de acordo com o conteúdo de proteases de seus grânulos e não apenas com base na sua localização (SHIMIZU; TSUCHIYA; HORII, 2001; NORRBY, 2002).

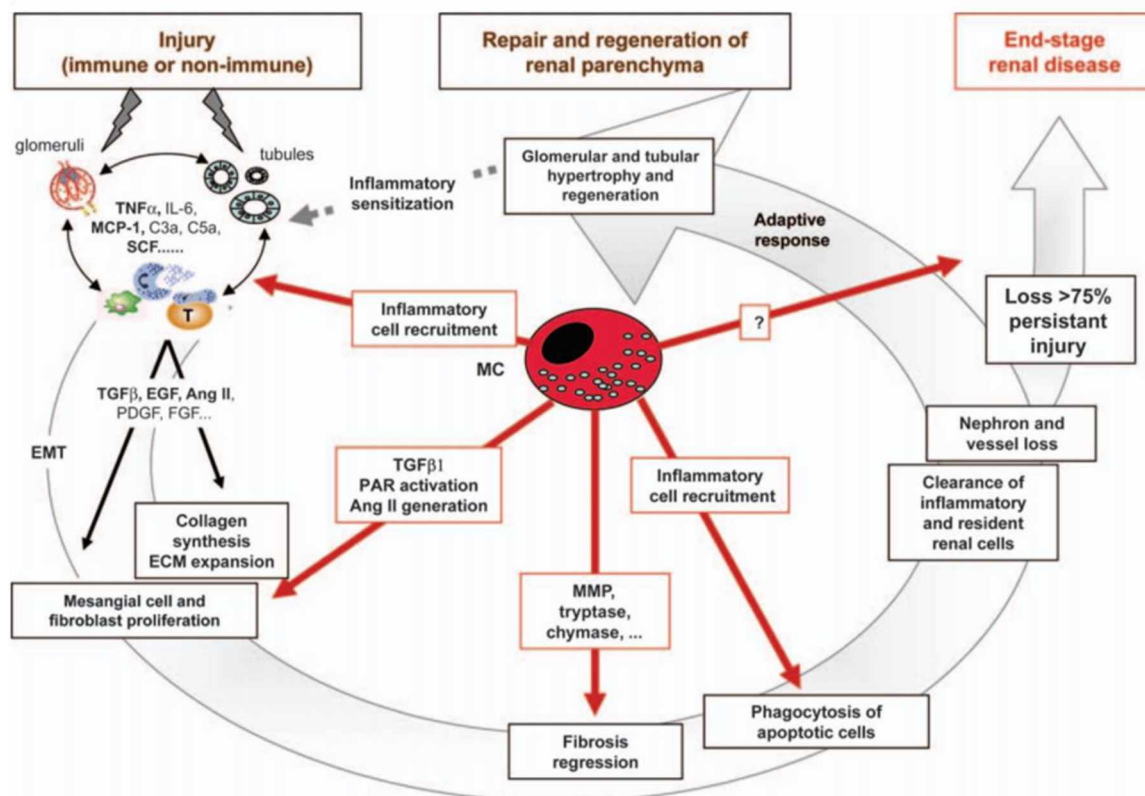
2.3.1 Participação dos Mastócitos no Desenvolvimento da Fibrose Renal

Os mastócitos expressam moléculas fibrinogênicas capazes de estimular a proliferação de fibroblastos, bem como proteases que sabidamente participam da remodelação da matriz extracelular (EHARA; SHIGEMATSU, 1998; JONES et al., 2003; MADJENE et al., 2015). Nesse sentido, o desenvolvimento de fibrose em casos de doença renal crônica parece guardar relação com o número de mastócitos renais (EHARA; SHIGEMATSU, 1998; 2003; HIROMURA et al., 1998; ROBERTS; BRENCHLY, 2000).

Entretanto, como apontado muito recentemente por Madjene et al. (2015), as evidências que mostram um elo causal entre a instalação de fibrose e a atividade mastocitária renais ainda são limitados e conflitantes. Assim, Miyazawa et al. (2004) e Kim et al. (2009) sugerem um efeito protetor dos mastócitos no desenvolvimento da fibrose renal induzida pela administração de um agente nefrotóxico ou pela obstrução ureteral, respectivamente; relatam aumento na fibrose renal, bem como nos níveis de citocinas pró-fibroticas (IL-4 e TGF- β 1) em animais deficientes em mastócitos quando comparados aos controles não deficientes. Por outro lado, Summers et al. (2012) e Veerappan et al. (2012) forneceram, independentemente, fortes evidências que sugerem um efeito pró-fibrótico dos mastócitos no tecido renal. Esses autores relatam que a deposição intrarenal de colágeno foi significativamente menor em animais deficientes em mastócitos, quando comparados aos controles não deficientes, após obstrução uretérica unilateral (SUMMERS et al., 2012; VEERAPPAN et al., 2012). Ainda, o tratamento de animais controles (não deficientes desse tipo celular) com um inibidor da desgranulação mastocitária (cromoglicato) atenuou significativamente o desenvolvimento de fibrose renal após obstrução ureteral (VEERAPPAN et al., 2012). Algumas diferenças experimentais têm sido apontadas como as responsáveis pelas discrepâncias relatadas anteriormente, como: (i) o tempo utilizado para a avaliação dos parâmetros renais após a indução das lesões, o qual foi variado (14 vs. 21 dias, por exemplo) e pode determinar alterações fenotípicas nos mastócitos por conta de alterações no microambiente renal que podem ocorrer ao longo do tempo; (ii) as linhagens de animais utilizadas nos diferentes estudos, algumas das quais são portadoras de deficiências hematopoiéticas que podem influenciar nos desfechos experimentais (MADJANE

et al., 2015). A figura 4 apresenta um esquema dos possíveis mecanismos pelos quais os mastócitos participam da progressão de doenças renais.

Figura 4 – Mecanismos propostos para ação dos mastócitos na fisiopatologia renal.



Fonte: BLANK et al. (2007).

Os mastócitos (MC) podem participar de várias fases do processo inflamatório renal por meio da secreção de mediadores, os quais participam tanto de processos reparativos quanto lesivos (descritos nas caixas presentes na figura).

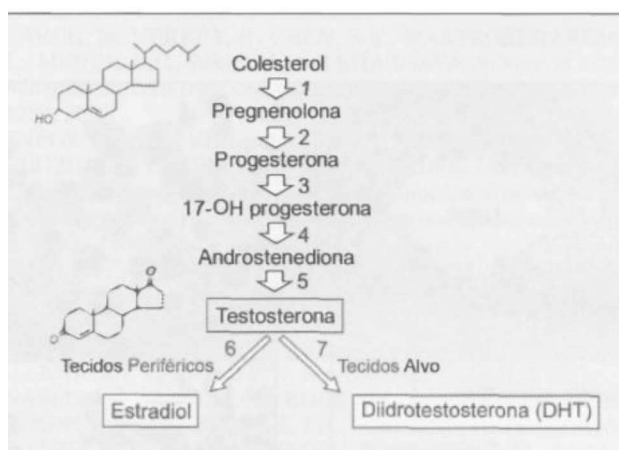
Por fim, além da participação dos mastócitos nas alterações de matriz extracelular supracitadas, cabe ressaltar os efeitos dessas células nas alterações funcionais dos rins que não estão relacionadas à fibrose; dessa forma, foi sugerido que a quimase mastocitária participa na indução de proteinúria via ativação de receptores ativados por proteases do subtipo 2 (PAR-S) (SHARMA et al., 2007).

2.4 Testosterona

A testosterona é um hormônio esteroidal pertencente a um grupo genericamente denominado de androgênios. Esse hormônio é produzido principalmente pelas células intersticiais de Leydig (células esteroidogênicas do estroma), mas a síntese também pode ocorrer nas adrenais. Em ambos os locais de síntese, a molécula precursora dos androgênios é o colesterol, o qual pode ser captado a partir do plasma por meio de endocitose de lipoproteínas ou ser sintetizado pelas células da própria glândula. A transformação do colesterol em testosterona requer cinco etapas, todas elas catalisadas por enzimas (Figura 5). A clivagem da cadeia lateral do colesterol ocorre na mitocôndria, enquanto as demais reações ocorrem no retículo endoplasmático liso (AIRES, 2012; BERNE; LEVY, 2009; GUYTON; HALL, 2006).

A testosterona produzida nas células de Leydig é secretada no fluido dos túbulos seminíferos e nos capilares intersticiais, de onde atinge a circulação sistêmica para posteriormente exercer seus múltiplos efeitos endócrinos, tais como o desenvolvimento de características sexuais masculinas e ações anabolizantes. Embora em quantidade muito menor, alguns precursores androgênicos, tais como androstenediona e desidroepiandrosterona (DHEA), também são liberados pelo na circulação testículo (AIRES, 2012; BERNE; LEVY, 2009; GUYTON; HALL, 2006).

Figura 5- Etapas da síntese de testosterona a partir do colesterol e conversão da testosterona em outros esteróides ativos.



Fonte: AIRES, 2012.

Enzimas envolvidas na síntese de testosterona: 1) isoforma 1A1 do citocromo P450 (CYPI 1A1); 2) 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD), 3) 17 α -hidroxilase (CYP17), 4) 17,20-liase (CYP17), 5) 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD), 6) aromatase e 7) 5 α -redutase.

2.4.1 Participação da Testosterona no Desenvolvimento da Fibrose Renal

A perda de função renal associada à doença crônica desse órgão tende a ser mais rápida em homens do que em mulheres (NEUGARTEN et al., 2000). Contudo, apesar da obstrução do trato urinário superior ser reconhecida há muito tempo como uma causa comum de lesão e disfunção renal, apenas nos últimos anos foi sugerido que a testosterona acentua a lesão renal induzida por obstrução ureteral (CHO et al., 2012; METCLAFE et al., 2008). Dessa forma, Metcalfe et al. (2008) relataram que a produção endógena de testosterona em ratos machos, ou sua administração em fêmeas castradas, aumentou a produção de TNF- α , bem como as vias de sinalização envolvidas com apoptose (ativação de caspases 8, 9 e 3) e com o desenvolvimento de fibrose túbulo-intersticial. Nesse sentido, Cho et al. (2012) observaram que o aumento da deposição de fibras de colágeno nos rins induzido pela obstrução ureteral é mais intenso em machos do que em fêmeas; notaram, ainda, que a orquiectomia inibiu o desenvolvimento de fibrose renal associada à amarração do ureter. Em conjunto, essas observações sugerem um efeito deletério da testosterona no contexto de doenças renais (CHO et al., 2012).

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

Geral

Avaliar a possível interação entre a testosterona e a atividade mastocitária para a instalação de fibrose renal após obstrução ureteral unilateral.

Específicos

1. Caracterizar as alterações histopatológicas renais após obstrução ureteral em lâminas coradas com hematoxilina e eosina;
2. Avaliar a função renal de animais controles e daqueles submetidos à amarração ureteral;
3. Caracterizar a população mastocitária nos rins de animais controles e naqueles que foram submetidos à obstrução ureteral;
4. Quantificar as fibras de colágeno no parênquima renal de animais controles e naqueles que foram submetidos à obstrução ureteral;
5. Quantificar a expressão de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) e de α -actina no parênquima renal de animais controles e naqueles que foram submetidos à obstrução ureteral;
6. Avaliar o efeito da castração, do tratamento com cromoglicato (um inibidor da desgranulação mastocitária), da associação da castração com o tratamento com cromoglicato, da reposição de testosterona em animais castrados, ou da associação da reposição hormonal com o tratamento com cromoglicato sobre os parâmetros descritos nos itens 3, 4 e 5 em rins de animais submetidos à obstrução ureteral;
7. Avaliar a efetividade do protocolo de reposição de testosterona através da dosagem sérica desse hormônio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos-jovens (*Rattus norvegicus albinus*), com peso de 200-300 g. Os animais foram mantidos no depósito de animais da Área de Ciências Fisiológicas/UFU, com livre acesso à ração e água e submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas. Os protocolos utilizados no presente estudo foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia/Minas Gerais (Protocolo: nº 132/13; ANEXO A).

3.2 Grupos experimentais

Foram utilizados 42 ratos Wistar machos, divididos em sete grupos, como segue:

1. Para avaliação da contribuição mastocitária para o desenvolvimento da fibrose renal após obstrução ureteral foram utilizados três grupos:

Grupo 1: FO - Os animais desse grupo foram submetidos à falsa-operação (FO), com manipulação do rim esquerdo sem amarração do ureter; sem a realização de orquiectomia (FO); receberam apenas os veículos como tratamento, i.e., recebiam salina ao invés de cromoglicato e óleo de oliva ao invés de testosterona (n=6).

Grupo 2: LS - Os animais desse grupo foram submetidos à cirurgia para amarração do ureter esquerdo com o intuito de induzir lesões renais; foram submetidos à cirurgia para simulação da orquiectomia; receberam apenas os veículos como tratamentos, i.e., salina e óleo de oliva (n=6).

Grupo 3: LS-CG - Os animais desse grupo foram submetidos à cirurgia para amarração do ureter esquerdo com o intuito de induzir lesões renais; foram submetidos à cirurgia para simulação da orquiectomia; receberam tratamento com cromoglicato e óleo de oliva (n=6).

2. Para avaliação da contribuição da testosterona endógena e da sua interação com a atividade mastocitária para o desenvolvimento da fibrose renal após obstrução ureteral foram utilizados dois grupos:

Grupo 4: OQ - Os animais desse grupo foram submetidos à cirurgia para amarração do ureter esquerdo com o intuito de induzir lesões renais; foram orquiectomizados; receberam apenas os veículos como tratamentos, i.e., recebiam salina ao invés de cromoglicato e óleo de oliva ao invés de testosterona (n=6).

Grupo 5: OQ-CG - Os animais desse grupo foram submetidos à cirurgia para amarração do ureter esquerdo com o intuito de induzir lesões renais; foram orquiectomizados; receberam tratamento com cromoglicato e óleo de oliva (n=6).

3. Para avaliação da contribuição mastocitária na instalação dos efeitos da reposição de testosterona sobre o desenvolvimento da fibrose renal foram utilizados dois grupos:

Grupo 6: OQ-TR - Os animais desse grupo foram submetidos à cirurgia para amarração do ureter esquerdo com o intuito de induzir lesões renais; foram orquiectomizados; receberam salina e reposição de testosterona (n=6).

Grupo 7: OQ-TR/CG - Os animais desse grupo foram submetidos à cirurgia para amarração do ureter esquerdo com o intuito de induzir lesões renais; foram orquiectomizados; receberam tratamento com cromoglicato e reposição de testosterona (n=6).

Os diferentes grupos experimentais encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Procedimentos cirúrgicos e tratamentos realizados nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Lesão/ Falsa Operação (FO)	Orquiectomia/ FO	Cromoglicato/ Salina	Testosterona/ Óleo
FO	FO	FO	Salina	Óleo
LS	Lesão	FO	Salina	Óleo
LS-CG	Lesão	FO	Cromoglicato	Óleo
OQ	Lesão	Orquiectomia	Salina	Óleo
OQ-CG	Lesão	Orquiectomia	Cromoglicato	Óleo
OQ-TR	Lesão	Orquiectomia	Salina	Testosterona
OQ-TR/CG	Lesão	Orquiectomia	Cromoglicato	Testosterona

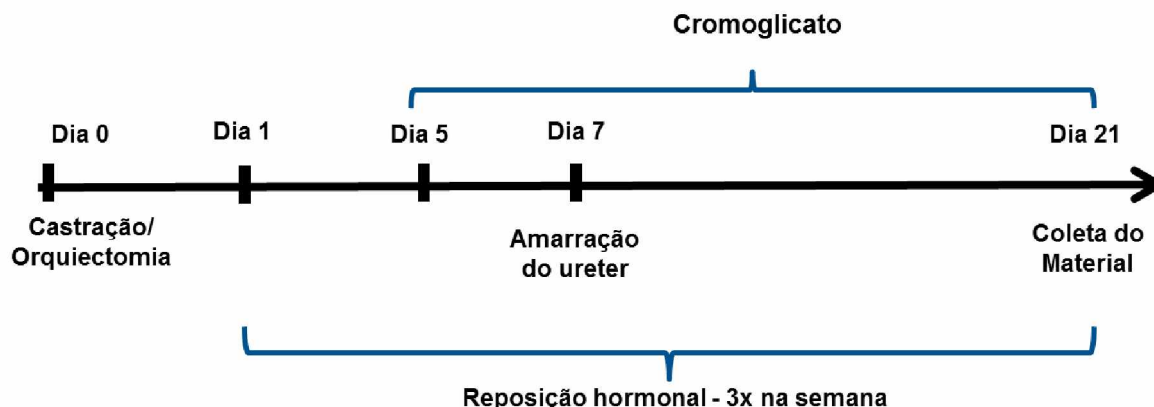
Fonte: A autora (2015).

3.3 Protocolos experimentais

3.3.1 Sequência das manobras experimentais

Cada animal permaneceu 21 dias em experimentação, sendo considerado o dia 0 (zero), o dia do início dos experimentos. Neste dia, os animais eram submetidos à falsa-operação ou à orquiectomia. No 7º dia, os animais eram submetidos à falsa operação ou à amarração do ureter esquerdo. Decorridos 14 dias da amarração (21º dia de experimento), os animais eram anestesiados e sacrificados para a realização da coleta do material biológico (descrita a seguir). A reposição hormonal iniciou-se um dia após a orquiectomia, i.e., no dia 1; o tratamento com cromoglicato iniciou-se no 5º dia, i.e., dois dias antes do procedimento para a amarração do ureter (esta manobra visou garantir a inibição mastocitária antes da indução da obstrução). O fluxograma dos protocolos gerais utilizados no presente estudo está representado na Figura 6.

Figura 6- Representação esquemática dos protocolos experimentais.



Fonte: A autora (2015).

3.3.2 Cirurgias e Tratamentos

3.3.2.1 Orquiectomia

No dia zero, todos os ratos foram anestesiados com a associação de cloridrato de quetamina (100 mg/kg; i.p) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg; i.p). Os ratos foram imobilizados sobre a prancha cirúrgica em posição de decúbito dorsal. As operações foram realizadas através de incisão mediana anterior do escroto, abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Em seguida, o procedimento dependeu do grupo ao qual o animal pertencia. Como descrito anteriormente, nos grupos FO, LS, LS-CG, a pele do escroto era suturada, realizando uma simulação da orquiectomia, enquanto que nos grupos OQ, OQ-CG, OQ-TR, OQ-TR/CG, os testículos foram removidos e o escroto foi suturado (Figura 7). Após a cirurgia os animais receberam pentabiótico (0,1 ml/kg; IM).

3.3.2.2 Reposição Hormonal

No 1º dia, os animais dos grupos OQ-TR e OQ-TR/CG iniciavam a reposição hormonal com propionato de testosterona (0,5 mg/kg; administração subcutânea), três vezes na semana até o dia da retirada do rim (ELEAWA et al., 2013). Os outros grupos recebiam óleo de oliva, veículo no qual a testosterona era diluída. A última administração de testosterona foi realizada

no dia do sacrifício pela manhã, enquanto que a coleta de material biológico foi realizada no período da tarde.

3.3.2.3 Tratamento com cromoglicato de sódio

No 5º dia, os animais dos grupos LS-CG, OQ-CG e OQ-TR/CG receberam cromoglicato de sódio na dose de 50 mg/kg (i.p) (HEI et al., 2007) até o dia da retirada dos rins. Os demais grupos receberam apenas o veículo NaCl 0,9% (i.p).

Figura 7 – Procedimento utilizado para a castração dos animais.



Fonte: A autora (2015).

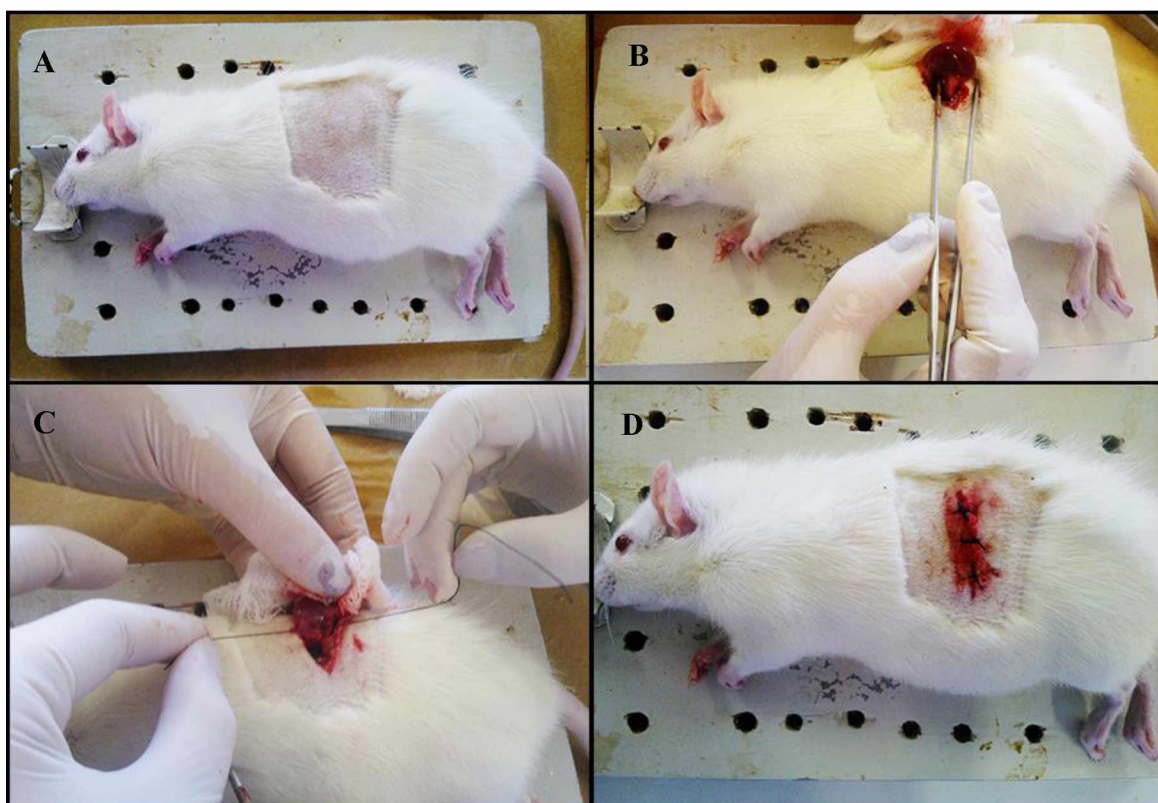
Fotos representativas do procedimento realizado na orquiectomia dos animais. Higienização do local (A); incisão cirúrgica e isolamento testicular (B); retirada dos testículos (C); testículos isolados (D).

3.3.2.4 Amarração do ureter

No 7º dia, os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg; i.p) e cetamina (100mg/kg; i.p), submetidos à tricotomia da região lateral esquerda do abdômen, e colocado em uma prancha de madeira. A seguir, realizávamos a antissepsia com álcool iodado, incisão e exposição do rim esquerdo; o ureter esquerdo era então identificado, isolado e amarrado (foram realizados dois nós). Por fim, após reintrodução do rim no abdômen a incisão cirúrgica era suturada (Figura 8).

Como descrito anteriormente, todos os grupos foram submetidos à amarração do ureter exceto o grupo falso-operado (FO). Esses últimos eram operados e tinham os ureteres manipulados, mas não ligados (KLAHR et. al, 1993). Todos os animais recebiam pentabiótico (0,1ml/kg; IM) após os procedimentos cirúrgicos.

Figura 8- Procedimento cirúrgico para amarração do ureter esquerdo.



Fonte: A autora (2015).

Procedimento para amarração do ureter esquerdo. O animal era submetido à tricotomia (A); o rim esquerdo era exposto (B); realizávamos a amarração do ureter esquerdo (C); o rim era reintroduzido e a incisão cirúrgica era suturada (D).

3.3.2.5 Coleta do Material

No 21º dia, os ratos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg; i.p) e cetamina (100 mg/kg; i.p) e submetidos à laparotomia. Primeiramente, retiramos sangue através da punção cardíaca para dosagem de testosterona e para avaliação da função renal. Após a punção cardíaca, o rim esquerdo era fixado e processado (descrito a seguir).

3.3.3 Estudos de função renal

Para os estudos de função renal, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (Figura 9) dois dias antes do sacrifício, sendo as primeiras 24 horas para adaptação, e as próximas 24 horas para coleta de urina. Então, no dia do sacrifício foi realizada a coleta da urina e de sangue por punção cardíaca, conforme descrito anteriormente. Para determinação do clearance de creatinina e consequentemente da taxa de filtração glomerular (TFG), a dosagem de creatinina urinária e plasmática foi realizada utilizando-se método colorimétrico.

Figura 9- Fotos das gaiolas metabólicas utilizadas no presente estudo para coleta de urina.



Fonte: A autora (2015).

3.3.4 Coleta de Sangue

Parte do sangue (retirado por punção cardíaca) foi colocada em eppendorfs (1,5 ml) para dosagem de creatinina, e parte foi acondicionada em tubos contendo gel separador e destinavam à dosagem de testosterona. Para dosagem de creatinina o sangue foi centrifugado à 3000 rpm, por cinco minutos, enquanto que para dosagem de testosterona o sangue foi centrifugado à 4°C e à 4000 rpm, por oito minutos.

3.3.5 Dosagem de testosterona

As amostras de sangue eram enviadas para um laboratório Tecsá em Belo Horizonte-MG e o exame foi realizado através da técnica de Eletroquimioluminescência de acordo com as especificações dos fabricantes dos kits e protocolos estabelecidos no laboratório.

3.3.6 Preparo dos órgãos e fixação

O rim foi fixado em methacarn por 24 horas e, posteriormente, lavados e mantidos em álcool 70%. Após a etapa de fixação, a amostra foi desidratada em concentrações crescentes de etanol (75, 85, 95 e três vezes em álcool absoluto), três trocas de xilol e três de parafina por meia hora em cada passo. Após a inclusão em parafina, o material foi cortado em micrótomo de forma a obtermos secções transversais com 5 µm de espessura, as quais foram colocadas em lâminas de vidro.

3.4 Análises Histológicas

3.4.1 Coloração com hematoxilina e eosina

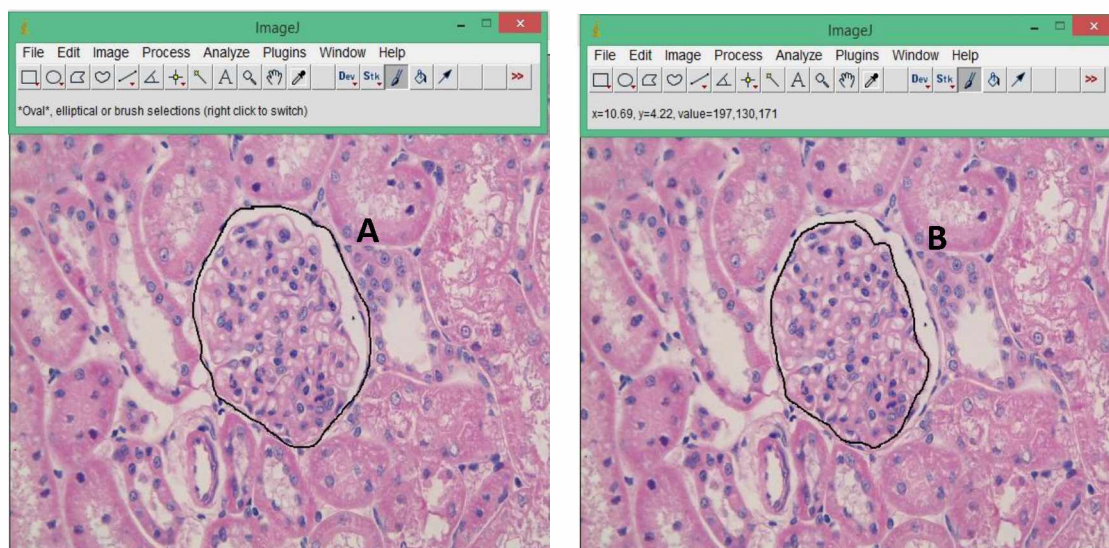
As lâminas contendo cortes de rins foram desparafinizadas, hidratadas até a obtenção de uma graduação alcoólica de 70% e lavadas em água corrente por 20 minutos, mantidas em água destilada por 5 minutos e, em seguida, imersas em hematoxilina, por um minuto. Novamente colocadas na água corrente por 20 minutos e em seguidas imersas na eosina por um minuto e

30 segundos. Por fim, as lâminas foram desidratadas e montadas em goma de Damar (ANEXO B).

3.4.2 Análise da Estereologia através da coloração de Hematoxilina e Eosina

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram avaliadas em microscopia de luz para a determinação das alterações histopatológicas gerais. Essas lâminas foram utilizadas também para a determinação da área glomerular e do tufo capilar. Assim, imagens das secções foram capturadas utilizando-se um microscópio óptico (objetiva de 40x) acoplado a uma câmera digital (Leica ICC50). Em seguida, as imagens captadas foram processadas pelo programa LAS EZ (versão 1.8). Para a análise das imagens utilizou-se o software de análise e processamento de imagem, Image J, disponível gratuitamente na Internet (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Foram avaliados aleatoriamente 20 glomérulos por rim, sendo que as áreas glomerulares, bem como do tufo capilar glomerular, foram obtidas em μm^2 (WANG et al., 2000). A delimitação destas áreas foi realizada com o auxílio de um mouse, orientando-se pelos limites da capsula de Bowman (A) e do tufo capilar (B) como demonstrado na Figura 10.

Figura 10- Imagem ilustrativa da análise do glomérulo.



Fonte: A autora (2015).

Fotos ilustrativas de secções renais coradas com hematoxilina e eosina evidenciando a delimitação da cápsula de Bowman (A) e do tufo capilar (B). As análises foram realizadas utilizando-se o programa Image J. Aumento 400x.

3.4.2 Coloração com azul de toluidina

As lâminas contendo cortes de rins foram desparafinizadas e hidratadas até a obtenção de uma graduação alcoólica de 70%; posteriormente, essas lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, mantidas em água destilada por 5 minutos e, por fim, imersas em tampão citrato (pH 3) por mais 5 minutos. As lâminas equilibradas em tampão citrato foram então coradas, por 3 minutos, em solução de azul de toluidina (0,5%) em tampão citrato (pH 3). O excesso de corante foi removido por uma imersão rápida em tampão citrato e as lâminas foram desidratadas e montadas em goma de Damar (ANEXO C).

3.4.3 Análise das lâminas coradas com azul de toluidina

A coloração com azul de toluidina permitiu que os mastócitos fossem facilmente identificados, possibilitando, inclusive, visualizar a desgranulação que os mesmos apresentavam; assim, realizamos a contagem total de mastócitos (expressa em mastócitos/mm²) e a densidade de mastócitos desgranulando (mastócitos desgranulados/mm²). As análises foram feitas em microscópio óptico (OLYMPUS MODEL CHT) utilizando-se lente objetiva de 40x (quando havia dúvidas com relação ao nível de integridade celular a análise era realizada utilizando-se a objetiva de 100x). Para 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 1.4) devidamente calibrado.

3.4.3 Coloração com Picrosirius red

As lâminas contendo cortes de rins foram desparafinizadas e hidratadas até a obtenção de uma graduação alcóolica de 70%; posteriormente, essas lâminas foram lavadas em água corrente por 20 minutos, mantidas em água destilada por 5 minutos e em seguida permaneciam no corante Picrosirius red por uma hora. Foram novamente lavadas em água corrente por 15 minutos e em seguidas contra-coradas com hematoxilina por 30 segundos. As lâminas eram lavadas e em seguida desidratadas e montadas em goma de Damar (ANEXO D).

3.4.4 Análise das lâminas coradas com Picrosirius red

A combinação da coloração com Picrosirius red e a luz polarizada fornece uma ferramenta poderosa para a análise estrutural do colágeno (RICH; WHITTAKER, 2005). As fibras de colágeno mais espessas, fortemente birrefringentes apresentam-se coradas em vermelho, representam o colágeno tipo I, enquanto que as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentam-se coradas em verde, representando o colágeno tipo III.

Para a quantificação do colágeno total, lâminas coradas com Picrosirius red foram observadas em microscópio Nikon equipado com filtro de polarização. Foram analisados 20 campos histológicos aleatórios de rim, com ampliação de 200 vezes. Todas as imagens foram analisadas pelo programa Image J, e os valores obtidos foram expressos como porcentagem de área marcada (ANEXO F).

3.5 Análise imunohistoquímica

Secções de tecido renal foram desparafinizadas para a realização de imunohistoquímica. 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 (1:1000, (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) durante 30 minutos em temperatura ambiente. 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 e 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.

3.5.1 Avaliação dos resultados imunohistoquímicos

A imunohistoquímica para o anticorpo anti- α -SMA foi avaliada analisando-se a porcentagem do glomérulo ou do córtex renal marcada. Atribuíamos um escore de 0 a 4. 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 a reação para PCNA foi analisada pela contagem de células positivas. Para a quantificação das células positivas foram tiradas fotos de 30 campos de cada lâmina utilizando-se um microscópio de luz (OLYMPUS MODEL CHT) acoplado a uma câmara digital (objetiva de 40x). A ferramenta “Cell Counter” do programa Image J (versão 1.4), foi utilizada para contar as células marcadas. Consideramos como valor de células marcadas por rim a média dos valores encontrados nos 30 campos analisados (ANEXO G).

3.6 Análise estatística

Os dados foram expressão como média $\pm$ E.P.M. e analisados pela ANOVA, seguida do pós-teste de Newman-Keuls, ou pelo teste “t” de Student, quando apropriado. Os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism® (versão 5.00; Trial) e o nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

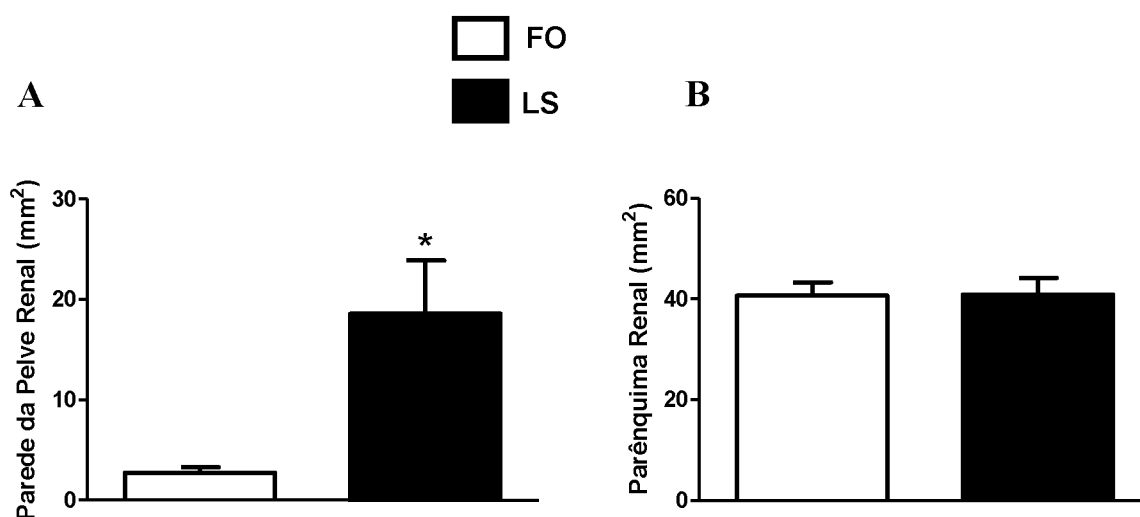
4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da lesão renal induzida pela obstrução ureteral

4.1.1 Caracterização Macroscópica

A obstrução ureteral mantida por 14 dias dilatou a pelve renal e aumentou a área da parede da mesma (Figura 11). Entretanto, apesar da área do parênquima não ter sido alterada, houve nítido remodelamento renal caracterizado macroscopicamente por estreitamento medular e cortical (avaliação qualitativa) (Figura 12). Apenas 3 rins de animais falso-operados apresentaram nítida parede pélvica nos cortes obtidos no presente trabalho, o que explica a diferença no número amostral nesse grupo quando a referida região está sendo avaliada. A ausência de pelve renal em alguns cortes explica-se pela altura na qual as secções foram obtidas (pouco além da região do hilo renal).

Figura 11- Área da parede da pelve ou do parênquima de rins de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral.



Fonte: A autora (2015).

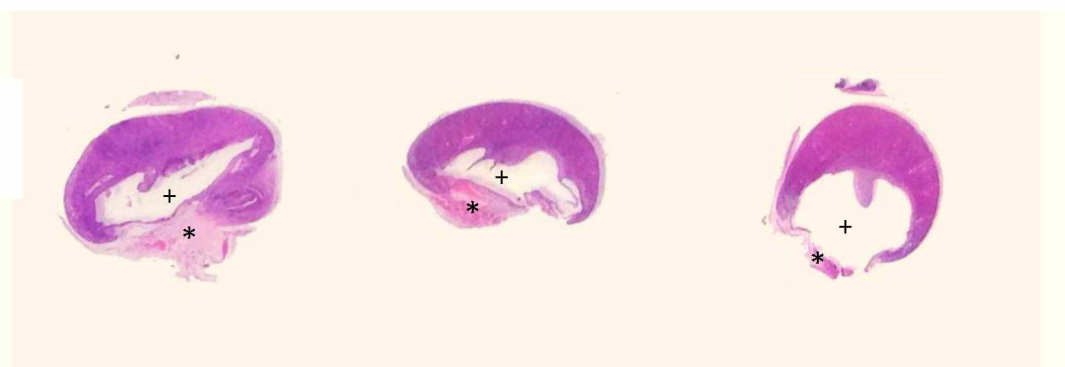
Área da parede da pelve (A) ou do parênquima (B) de rins de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à indução de lesão renal através da amarração ureteral (LS). * $P < 0,05$ vs. FO (teste “t” de Student). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 3-6 (A) ou 5-6 (B) animais.

Figura 12- Histoarquitetura de rins de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral.

A



B



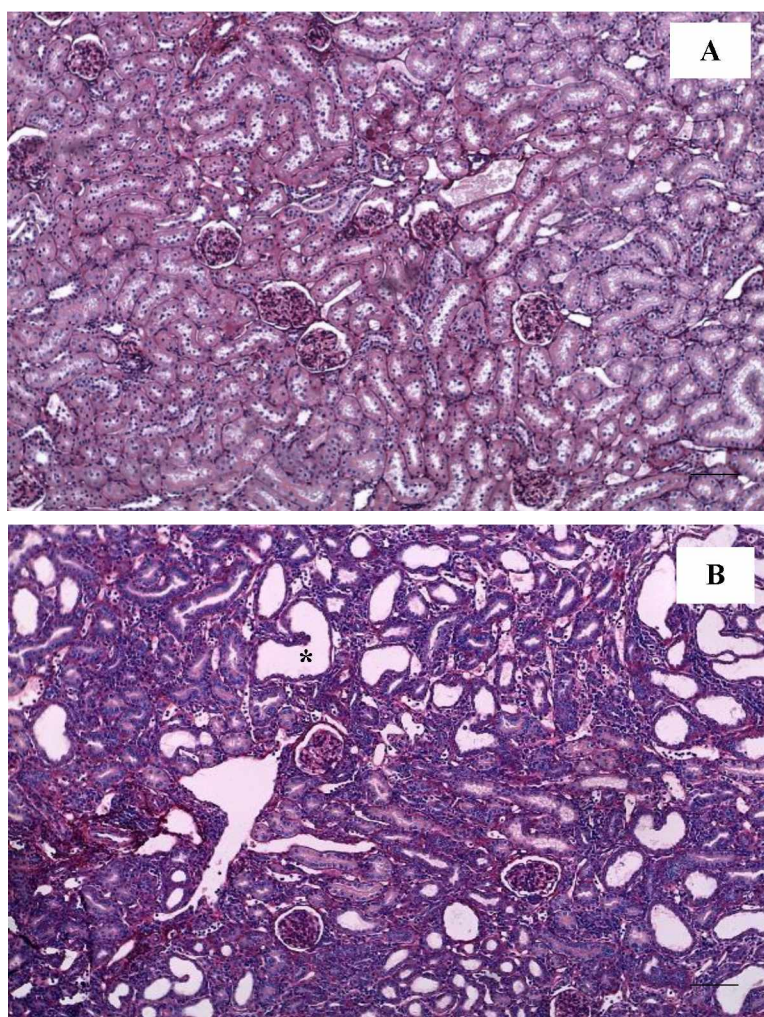
Fonte: A autora (2015).

Fotos de secções transversais de rins de ratos falso-operados (A) ou submetidos à indução de lesão renal através da amarração ureteral (B). Note o estreitamento da medula e do córtex renal, bem como a dilatação da pelve (+) e o aumento na área da parede (*) da mesma 14 dias após a obstrução ureteral.

4.1.2 Caracterização Microscópica

A obstrução ureteral mantida por 14 dias causou dilatação tubular (Figura 13) e determinou o aparecimento de áreas de necrose na região da pelve renal (não mostradas). Regiões com características de inflamação aguda ou crônica também foram detectadas nos rins de animais submetidos à amarração ureteral (Figura 14). Por fim, observamos, em 4 de 6 rins avaliados, um acúmulo de material amorfo acidófilo e a presença de células no interior dos túbulos renais; rins de animais controles não apresentaram essas características (Figura 15).

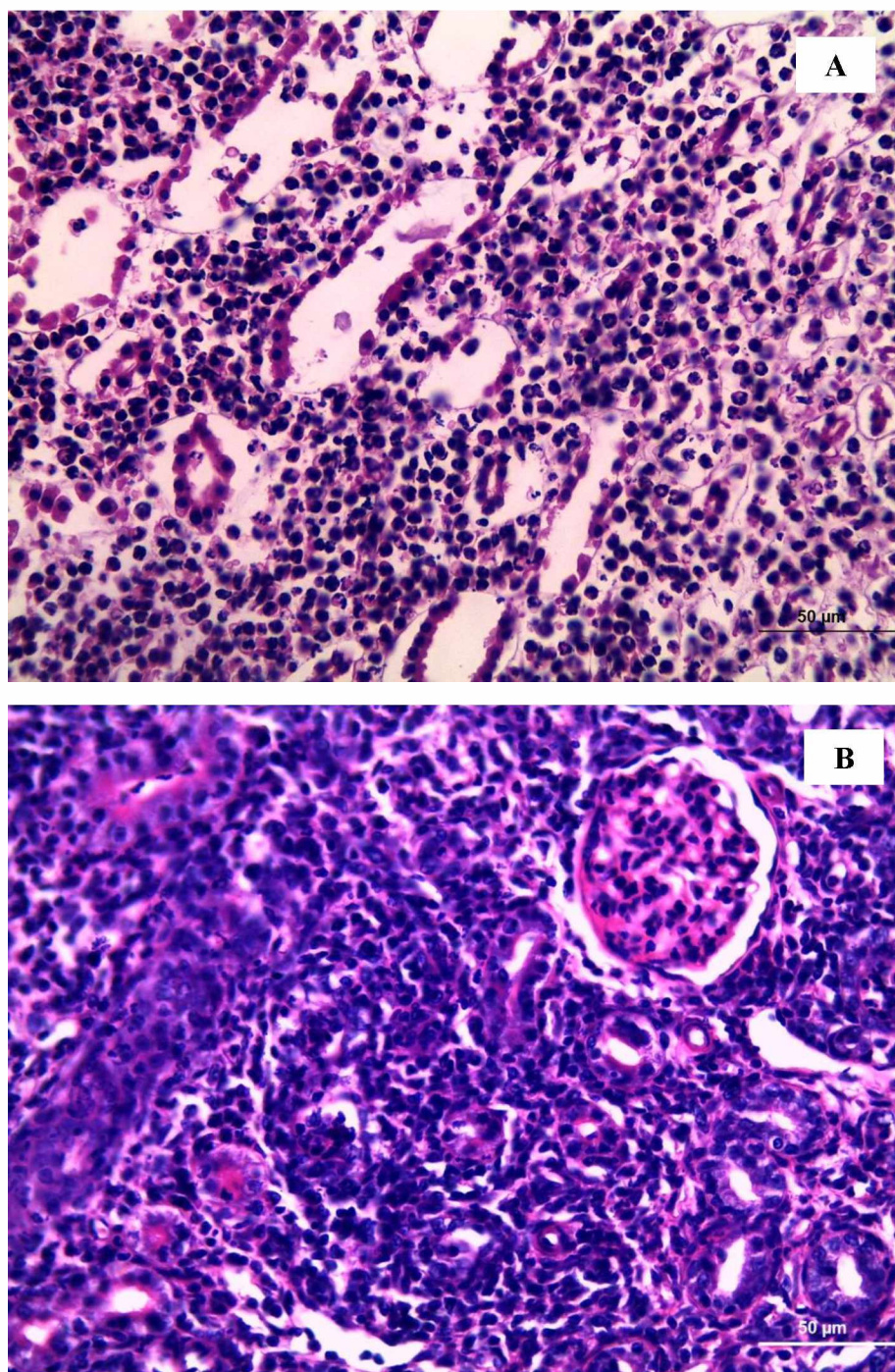
Figura 13- Histoarquitetura de rins de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral.



Fonte: A autora (2015).

Secções de tecido renal coradas com Picrosirius red e contra-coradas com Hematoxilina. Os rins de ratos falso-operados exibiram histoarquitetura normal, enquanto aqueles oriundos de animais submetidos à amarração do ureter (B) apresentaram dilatação tubular (*). Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 10x. Escala= 100µm

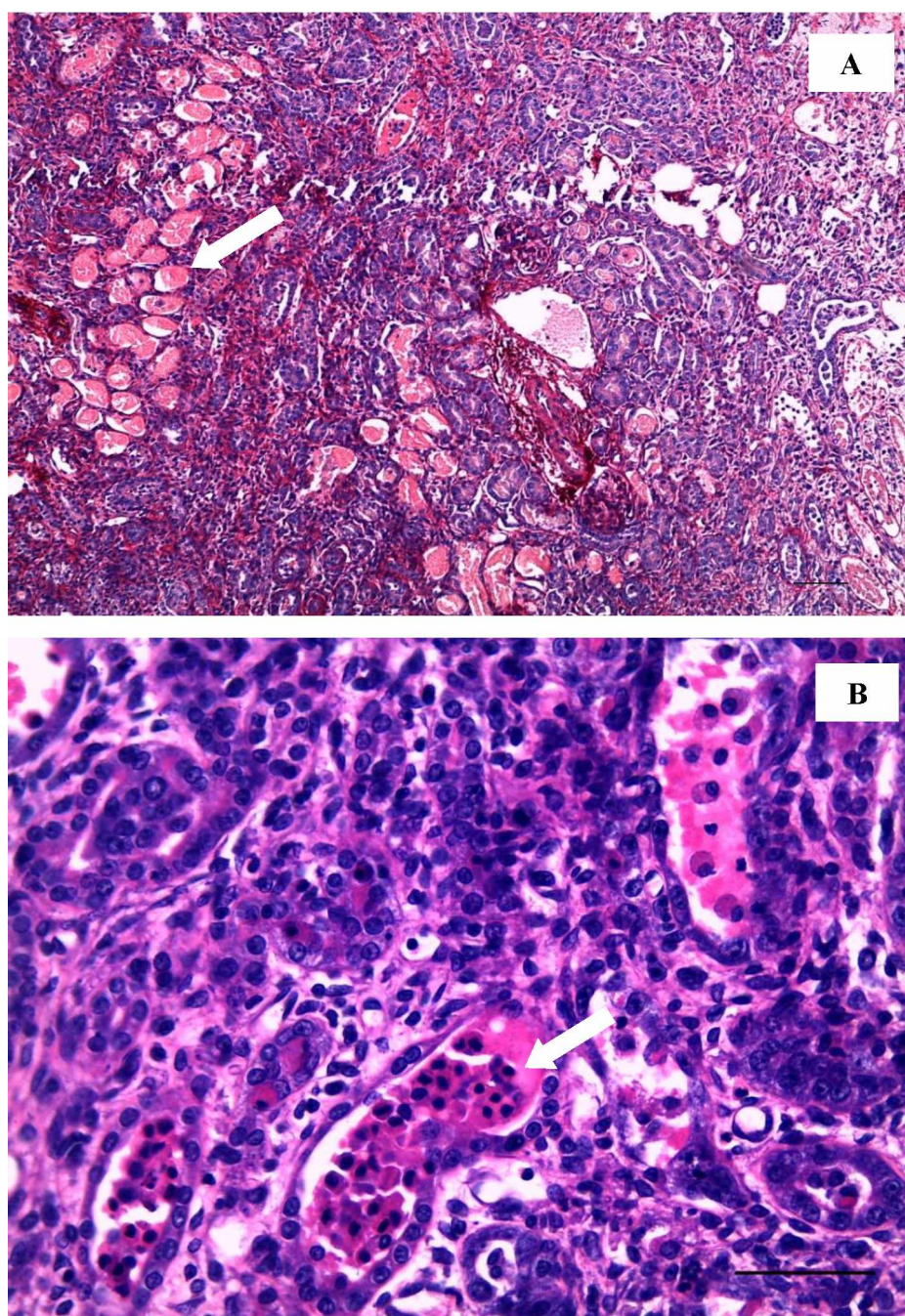
Figura 14- Áreas de inflamação aguda e crônica em rins de ratos submetidos à amarração ureteral.



Fonte: A autora (2015).

Secções de tecido renal coradas com hematoxilina e eosina. (A) Área de inflamação aguda, apresentando infiltrado predominantemente neutrofilico. (B) Área de inflamação crônica com intenso infiltrado linfocitário. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 40x. Escala = 50 µm.

Figura 15 – Presença de material amorfo acidófilo e de células no interior dos túbulos de rins oriundos de ratos submetidos à amarração ureteral.

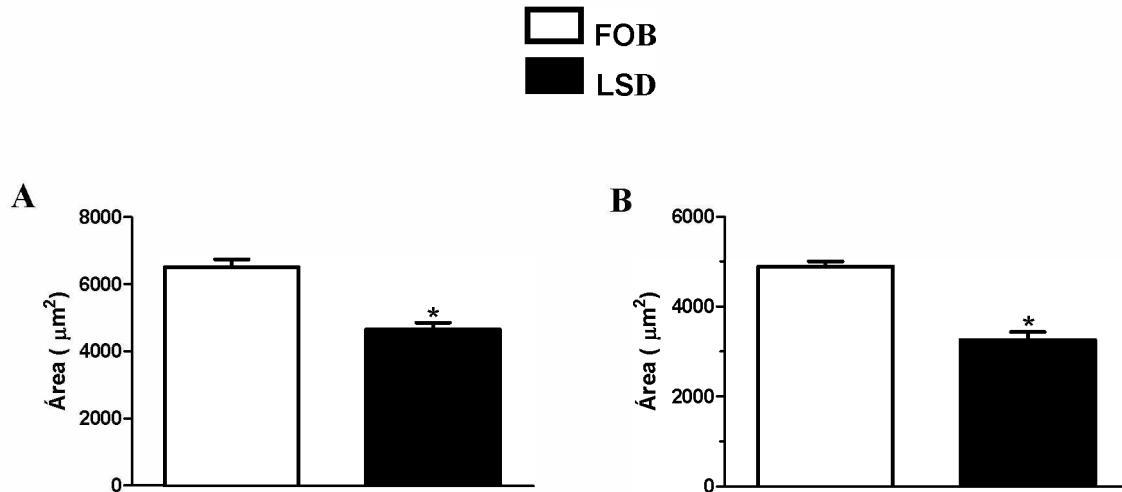


Fonte: A autora (2015).

Secções de tecido renal evidenciando o acúmulo de material amorfo acidófilo (A) e a presença de células no interior dos túbulos (B) de rins oriundos de animais submetidos à amarração ureteral (setas); as lâminas foram coradas com Picrosirius red e contra-coradas com hematoxilina. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 10x (A) ou de 40x (B). Escala = 100 μ m (A); 50 μ m (B).

A obstrução ureteral diminui a área do glomérulo (Figura 16A; Figura 17) e do tufo capilar (Figura 16B; Figura 17).

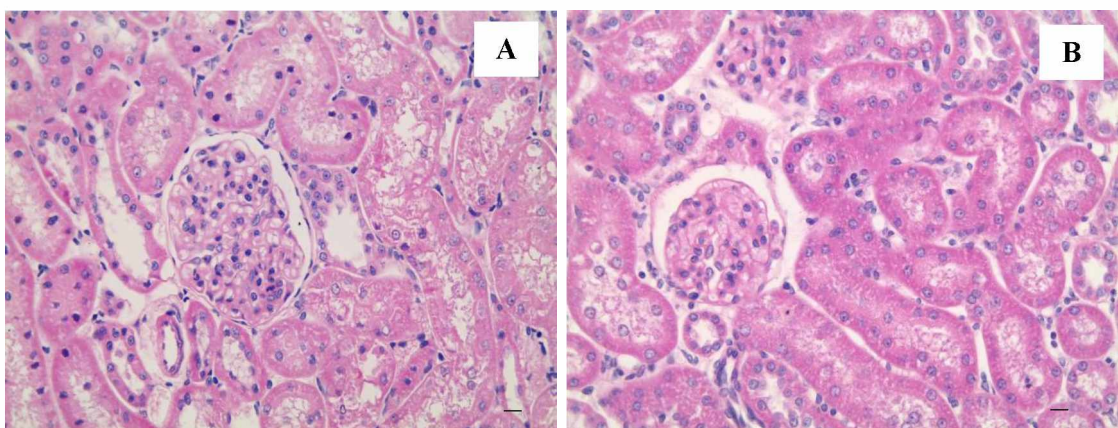
Figura 16- Área do glomérulo e do tufo capilar.



Fonte: A autora (2015).

Área do glomérulo (A) e do tufo capilar (B) de rins de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à indução de lesão renal através da amarração ureteral (LS). *P<0,05 vs. FO (teste “t” de Student). Os dados representam a média±EPM de 5-6 animais.

Figura 17- Alterações glomerulares induzidas pela amarração ureteral.



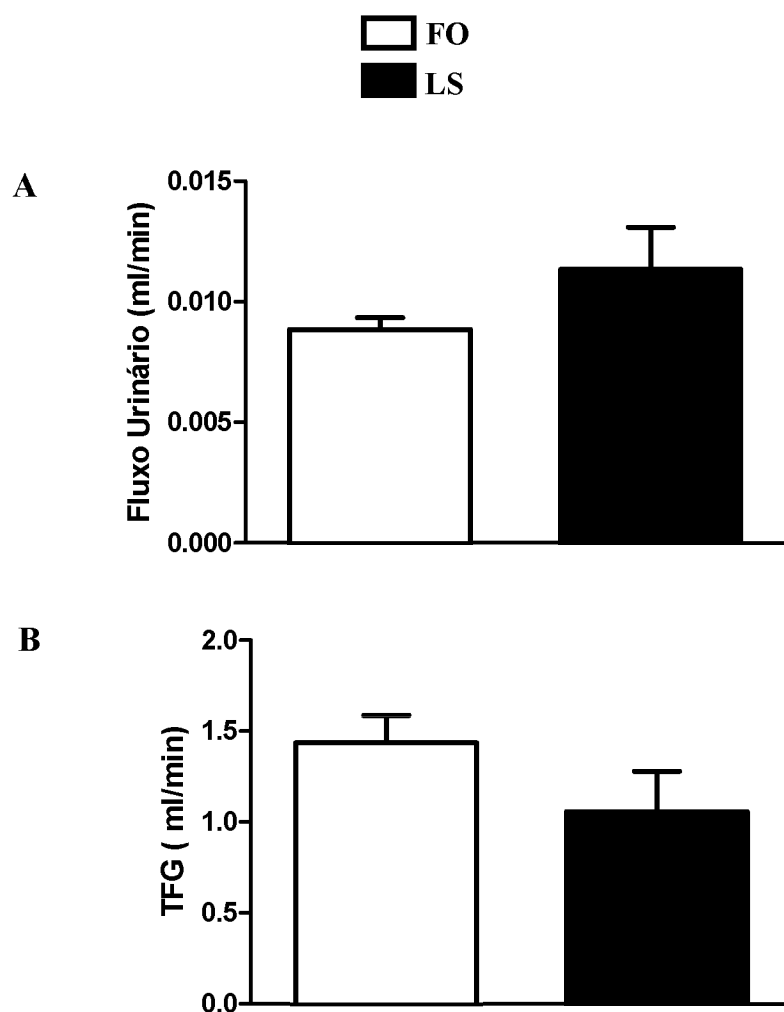
Fonte: A autora (2015).

(A) Secções de tecido renal de ratos falso-operados (FO) ou (B) submetidos à indução de lesão renal através da amarração unilateral (LS), coradas com Hematoxilina e Eosina e evidenciando os glomérulos. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 40x. Escala = 10 μm.

4.3 Fluxo Urinário e Taxa de Filtração Glomerular

A amarração ureteral unilateral não determinou alterações no fluxo urinário (Figura 18A) e na taxa de filtração glomerular – TFG (Figura 18B).

Figura 18- Fluxo urinário e taxa de filtração glomerular de ratos falso-operados ou submetidos à amarração ureteral unilateal.



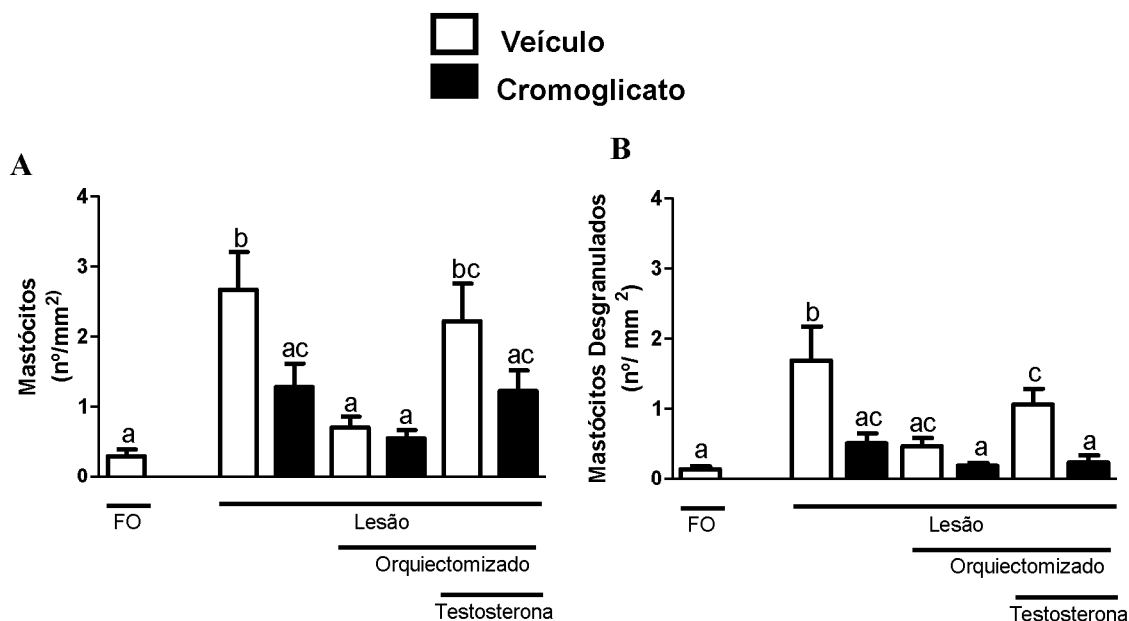
Fonte: A autora (2015).

Fluxo urinário (ml/min) urinário (A) e taxa de filtração glomerular (B) de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à amarração ureteral unilateal (LS). A amarração ureteral não alterou os parâmetros avaliados ($P > 0,05$; teste “t” de Student). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5-6 animais.

4.3 População de Mastócitos Renais

A obstrução ureteral aumentou a densidade de mastócitos no tecido renal total (i.e, parênquima+pelve) e o tratamento com cromoglicato ou a orquiectomia inibiram esse efeito. O tratamento com cromoglicato não intensificou o efeito da orquiectomia. Por outro lado, a reposição de testosterona reverteu o efeito da orquiectomia sobre a densidade mastocitária e o tratamento concomitante com cromoglicato inibiu parcialmente o efeito da reposição hormonal (Figura 19A). Além disso, a obstrução ureteral aumentou a densidade de mastócitos desgranulando e o tratamento com cromoglicato ou a orquiectomia inibiram esse efeito. Novamente, o tratamento com cromoglicato não intensificou o efeito da orquiectomia. Contudo, a reposição de testosterona reverteu parcialmente o efeito da orquiectomia sobre a desgranulação mastocitária e o tratamento concomitante com cromoglicato inibiu o efeito da reposição hormonal (Figura 19B).

Figura 19- População de mastócitos no tecido renal dos diferentes grupos experimentais

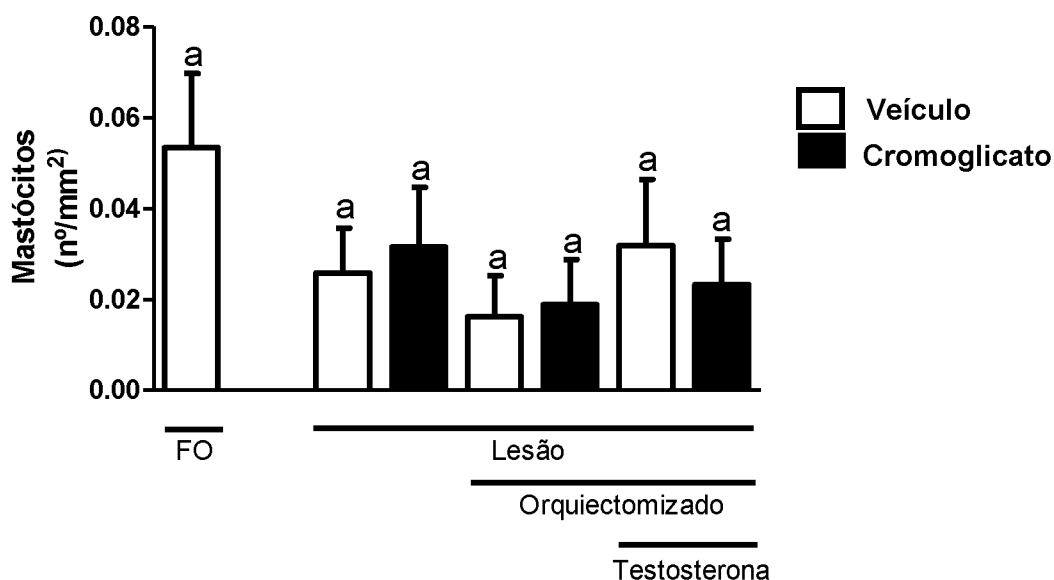


Fonte: A autora (2015).

Densidade de mastócitos totais (independentemente do estado de desgranulação) (A) e de mastócitos desgranulando (B) em rins de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral. Os efeitos do tratamento com cromoglicato, da orquiectomia, da reposição hormonal com testosterona, bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia ou reposição hormonal, foram avaliados em grupos de animais submetidos à obstrução ureteral. Os dados representam a média±EPM de 5-6 animais. Grupos que compartilham o mesmo sobrescrito não diferem significativamente (ANOVA/Newman-Keuls).

A densidade de mastócitos no parênquima renal se mostrou extremamente baixa e nenhuma das manobras ou tratamentos utilizados no presente estudo causaram alterações significativas nesse parâmetro (Figura 20). Contudo, a população mastocitária observada na parede da pelve renal foi muito mais abundante, sendo cerca de 64 ou 525 vezes maior do que aquela do parênquima de rins de animais falso-operados ou submetidos à amarração ureteral, respectivamente (Figura 21). Ainda, a obstrução ureteral aumentou significativamente a densidade mastocitária no tecido pélvico (Figura 22; Figura 23).

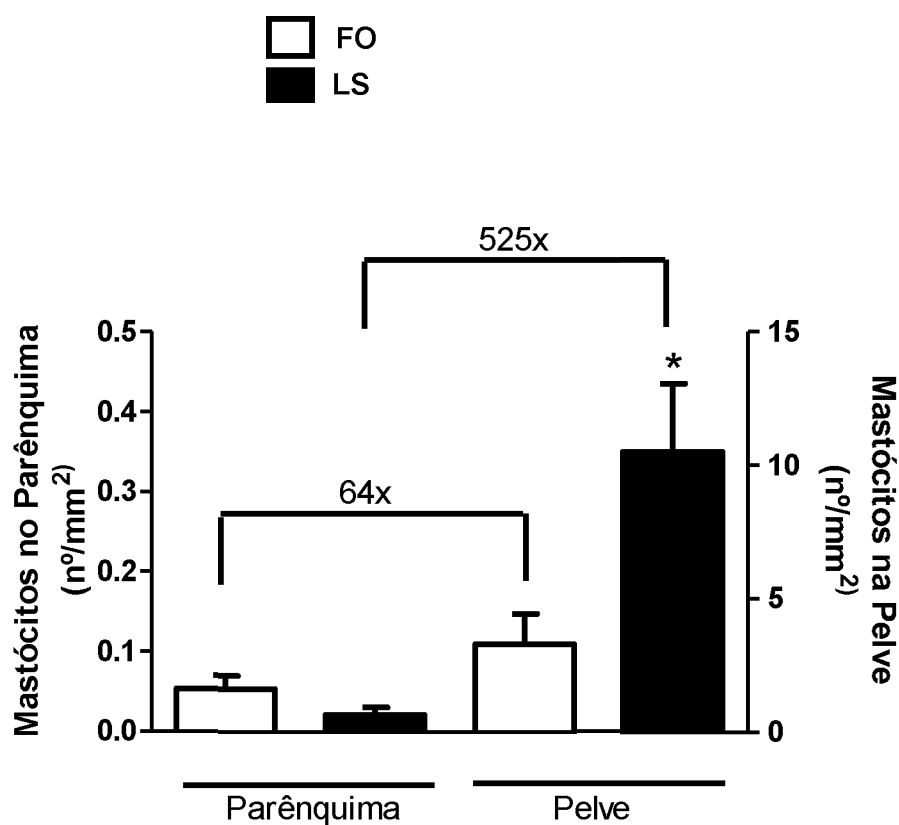
Figura 20- Densidade de mastócitos no parênquima renal dos diferentes grupos experimentais



Fonte: A autora (2015).

Densidade de mastócitos totais (independentemente do estado de desgranulação) no parênquima renal de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral. Os efeitos do tratamento com cromoglicato, da orquiectomia, da reposição hormonal com testosterona, bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia ou reposição hormonal, foram avaliados em grupos de animais submetidos à obstrução ureteral. Os dados representam a média±EPM de 5-6 animais. Nenhuma alteração significativa foi observada entre grupos ($P>0,05$; ANOVA).

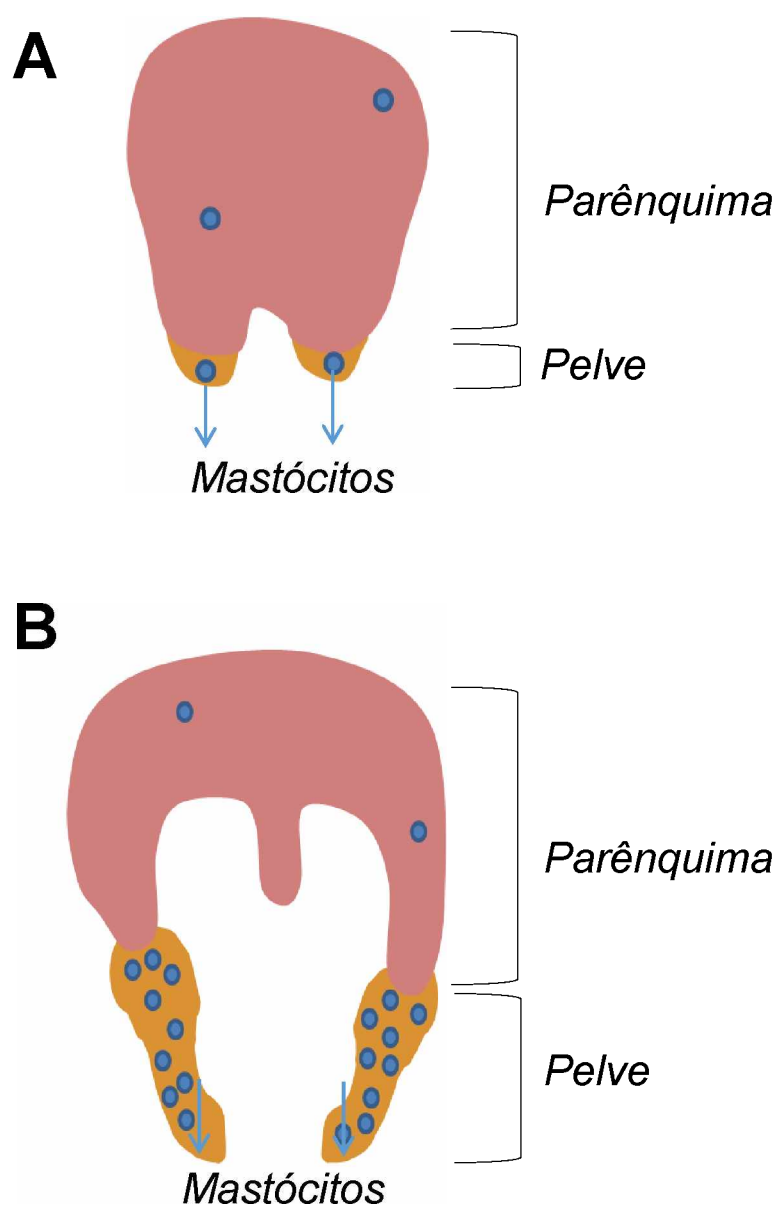
Figura 21- Alterações induzidas pela amarração ureteral na densidade de mastócitos no parênquima e na pelve renais.



Fonte: A autora

Densidade de mastócitos totais (independentemente do estado de desgranulação) no parênquima e pelve renais de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral (LS). Os dados representam a média±EPM de 3-6 animais. *P<0,05 vs. Pelve-FO (teste “t” de Student).

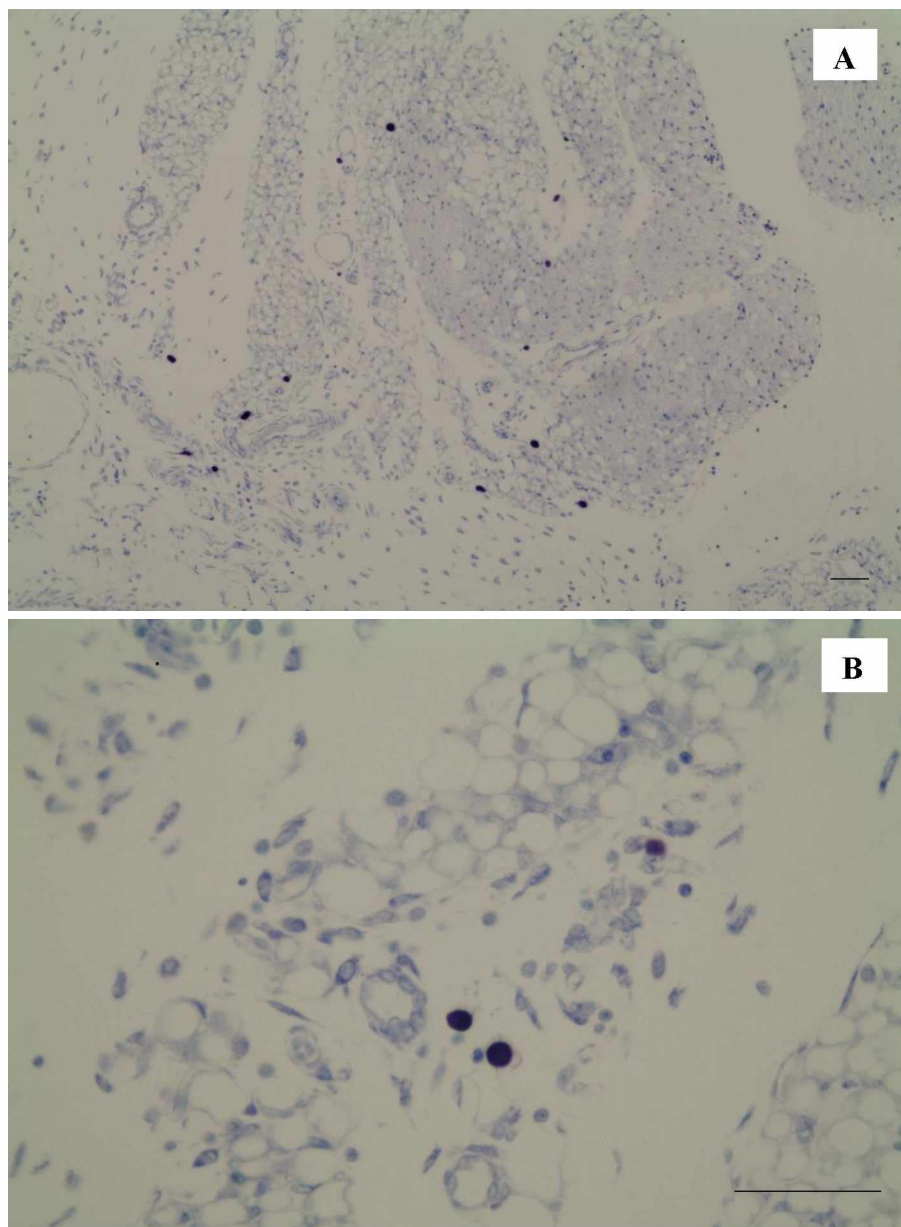
Figura 22- Esquema ilustrativo da distribuição dos mastócitos no parênquima e pelve renais de animais falso-operados ou submetidos à obstrução ureteral.



Fonte: A autora (2015).

A população de mastócitos nas diferentes regiões dos rins não é homogênea. Assim, a densidade mastocitária é bem maior na parede da pelve renal do que no parênquima (A) e a obstrução ureteral mantida por 14 dias determina aumentos tanto na população mastocitária quanto da área apenas na região pélvica (B).

Figura 23- Presença de mastócitos na parede da pelve renal de ratos submetidos à amarração ureteral.



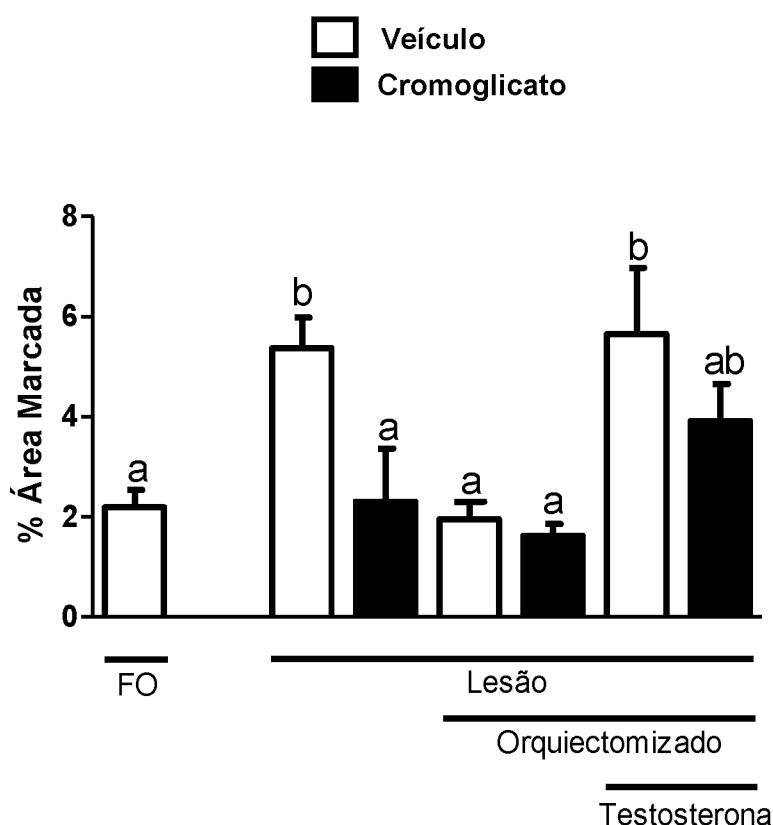
Fonte: A autora (2015).

Secções da região pélvica do tecido renal de animais submetidos à obstrução ureteral coradas com azul de toluidina. Note a presença de mastócitos. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 10x (A) ou com a objetiva de 40x (B). Escala = 50 μ m.

4.4 Fibrose Renal

A obstrução ureteral aumentou a deposição de fibras de colágeno no parênquima renal e o tratamento com cromoglicato ou a orquiectomia aboliram esse efeito. O tratamento com cromoglicato não intensificou o efeito da orquiectomia. Por outro lado, a reposição de testosterona reverteu o efeito da orquiectomia sobre a deposição de fibras de colágeno e o tratamento concomitante com cromoglicato inibiu parcialmente o efeito da reposição hormonal (Figura 24; Figura 25; Figura 26).

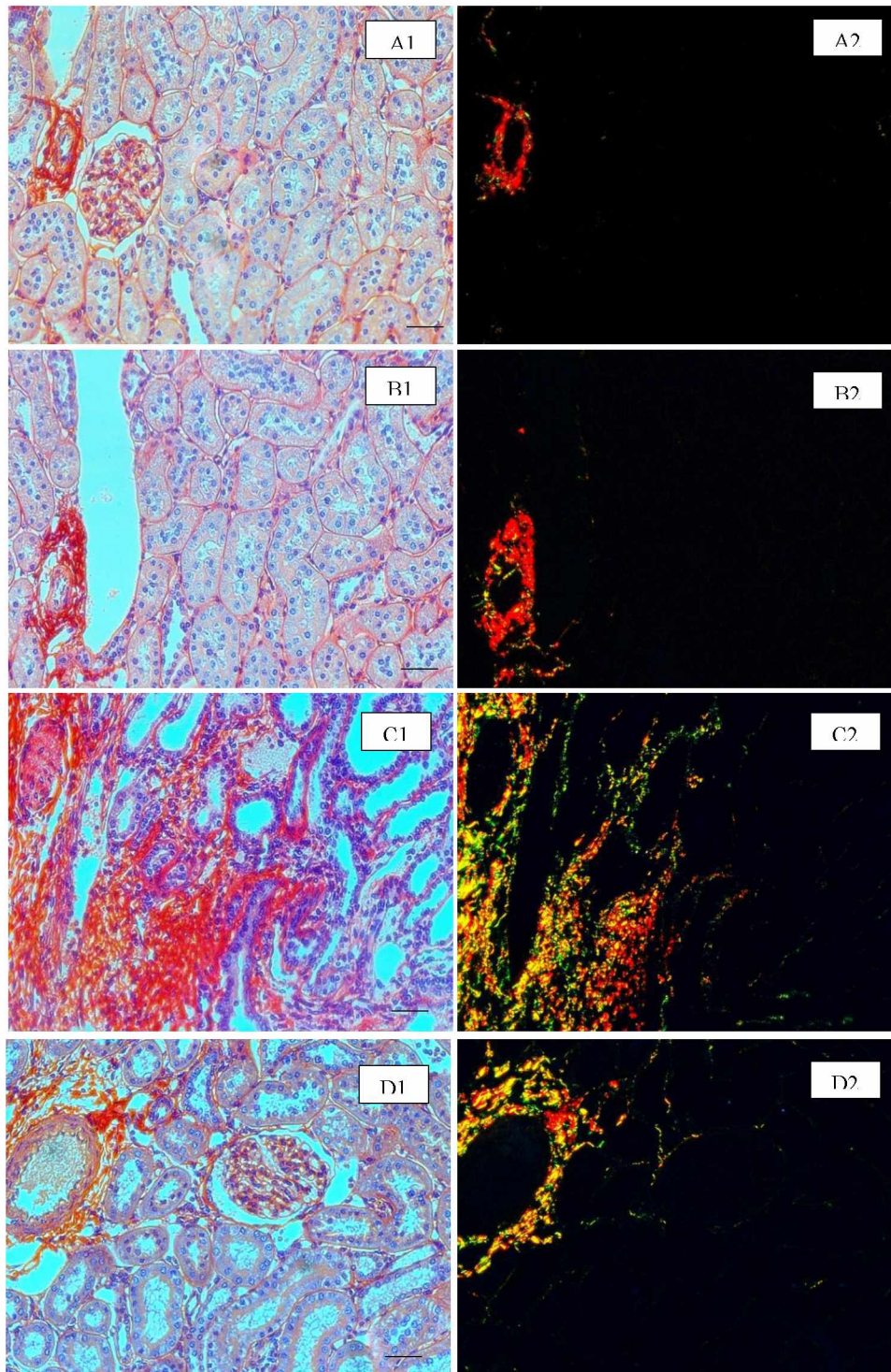
Figura 24- Fibras de colágeno no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: A Autora (2015).

Fibras de colágeno no parênquima de rins oriundos de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral. Os efeitos do tratamento com cromoglicato, da orquiectomia, da reposição hormonal com testosterona, bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia ou reposição hormonal, foram avaliados em grupos de animais submetidos à obstrução ureteral. Os dados representam a média±EPM de 5-6 animais. Grupos que compartilham o mesmo sobrescrito não diferem significativamente (ANOVA/Newman-Keuls).

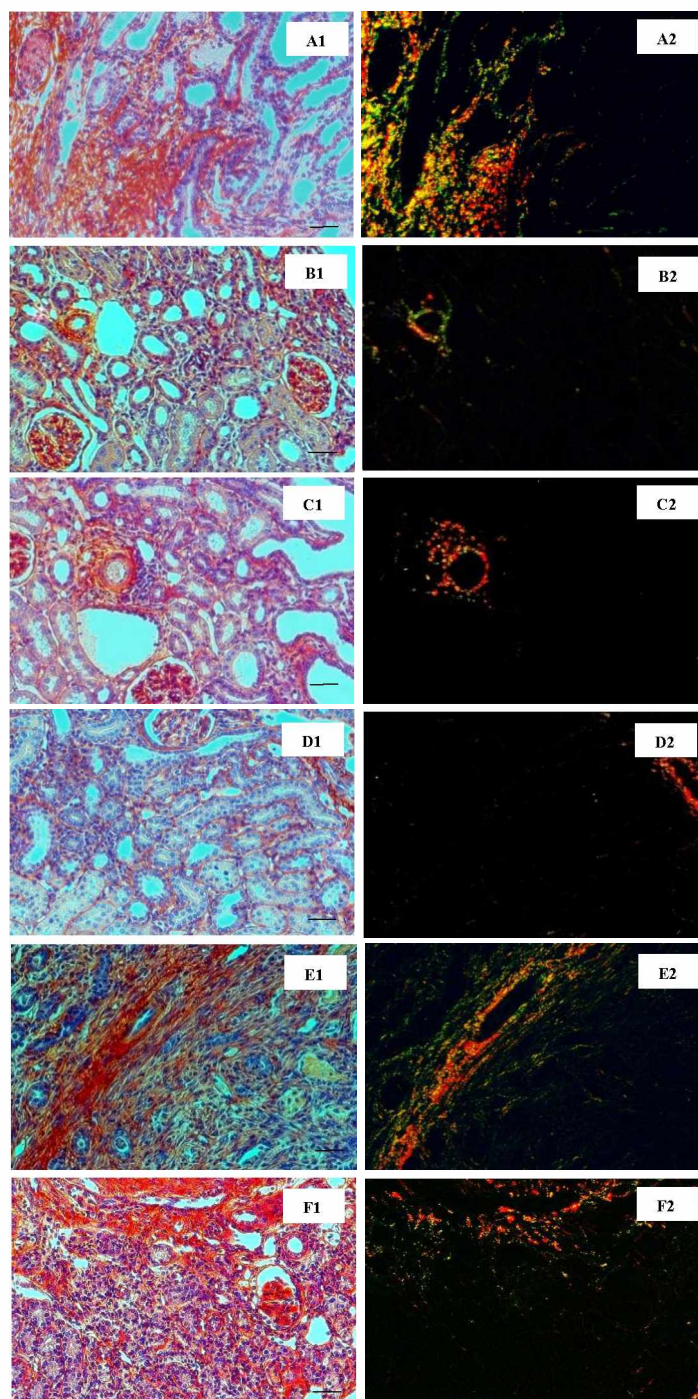
Figura 25- Imagens representativas das alterações induzidas pela obstrução ureteral sobre a deposição de fibras de colágeno no parênquima renal.



Fonte: A autora (2015).

Secções de tecido evidenciando a presença de fibras de colágeno no parênquima de rins oriundos de ratos falso-operados (A e B) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral (C e D). As secções foram coradas com Picrosirius red e observadas em microscópio de luz antes (A1- D1) ou após o uso de filtro polarizador (A2-D2). Note a distribuição difusa das fibras de colágeno no grupo submetido à obstrução ureteral, em contraste com a deposição quase que exclusivamente perivascular no grupo controle. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 20x. Escala = 50 μ m.

Figura 26- Imagens representativas das alterações induzidas pela obstrução ureteral sobre a deposição de fibras de colágeno no parênquima renal dos diferentes grupos experimentais.



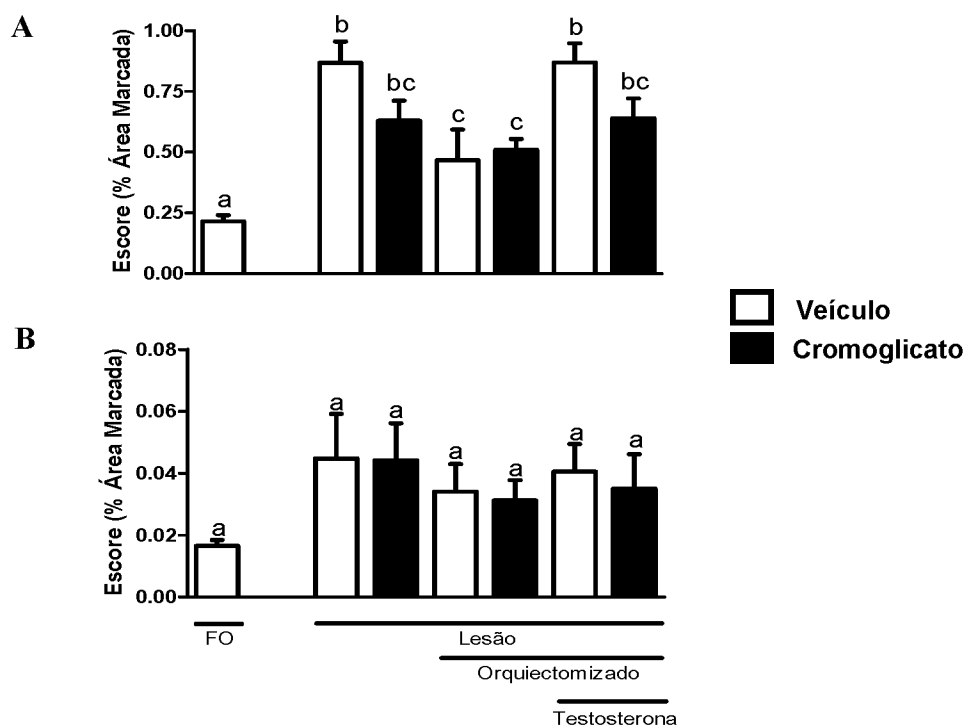
Fonte: A autora (2015).

Secções de tecido evidenciando a presença de fibras de colágeno no parênquima de rins oriundos de ratos submetidos à lesão renal através da amarração ureteral (A-F). Os efeitos do tratamento com cromoglicato (B), da orquiectomia (C), da reposição hormonal com testosterona (D), bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia (E) ou reposição hormonal (F) também foram avaliados. As secções foram coradas com Picrosirius red e observadas em microcópio de luz antes (A1-F1) ou após o uso de filtro polarizador (A2-F2). Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 20x. Escala = 50 µm.

4.5 Expressão Renal de α -actina

A obstrução ureteral aumentou a expressão renal de α -actina, na região túbulo-intersticial, e o tratamento com cromoglicato ou a orquiectomia (de forma mais evidente) bloquearam parcialmente esse efeito. A reposição de testosterona reverteu o efeito da orquiectomia sobre a expressão de α -actina e o tratamento concomitante com cromoglicato inibiu parcialmente o efeito da reposição hormonal. No entanto, o tratamento com cromoglicato não intensificou o efeito da orquiectomia (Figura 27A, Figura 28). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada com relação à expressão de α -actina glomerular (Figura 27B).

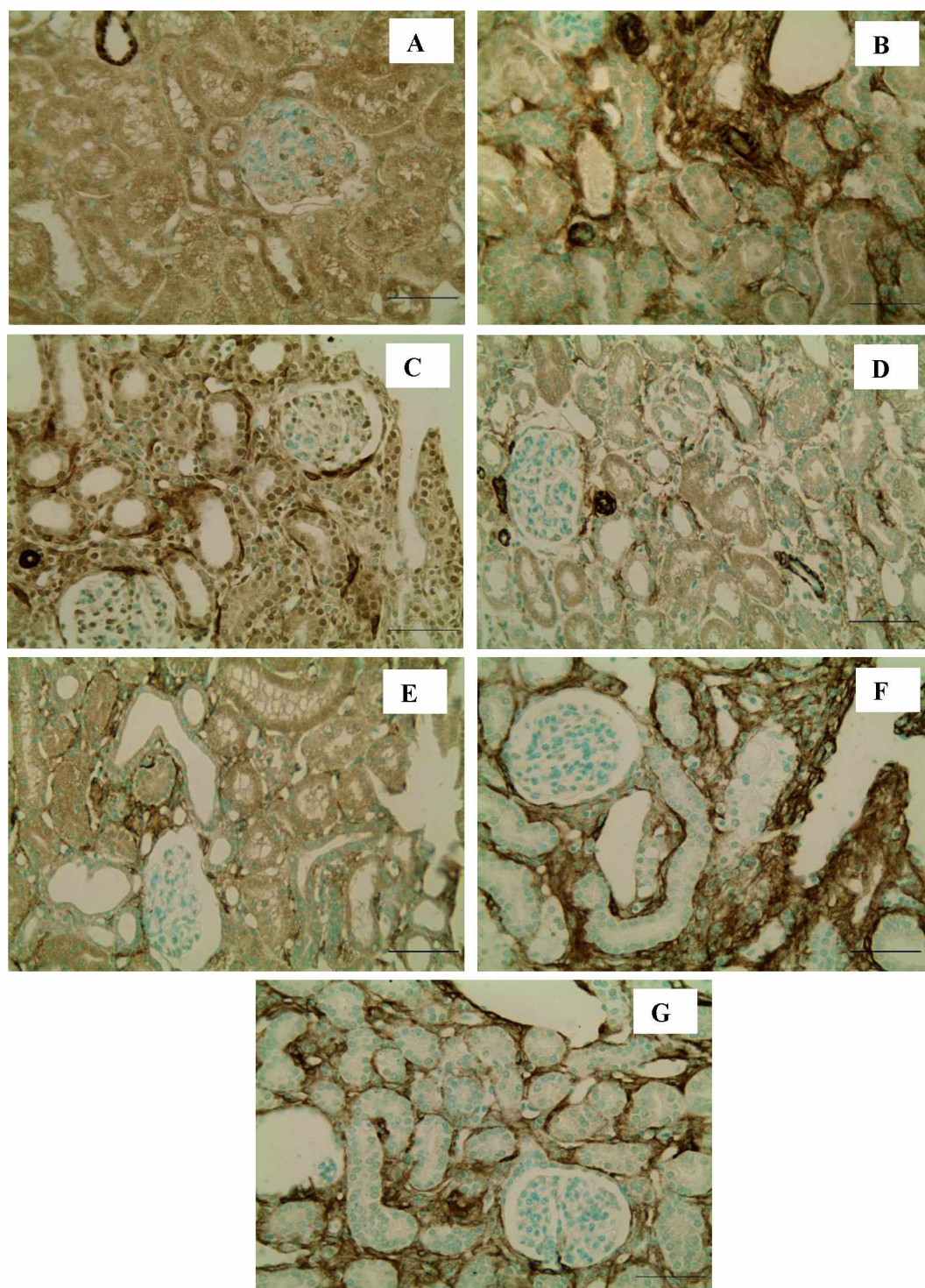
Figura 27 – Expressão túbulo-intersticial e glomerular de α -actina no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: A autora (2015).

Expressão de α -actina na região túbulo-intersticial (A) e glomerular (B) de rins oriundos de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral. Os efeitos do tratamento com cromoglicato, da orquiectomia, da reposição hormonal com testosterona, bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia ou reposição hormonal, foram avaliados em grupos de animais submetidos à obstrução ureteral. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5-6 animais. Grupos que compartilham o mesmo sobrescrito não diferem significativamente (ANOVA/Newman-Keuls).

Figura 28- Imagens representativas da expressão de α -actina em rins dos diferentes grupos experimentais.



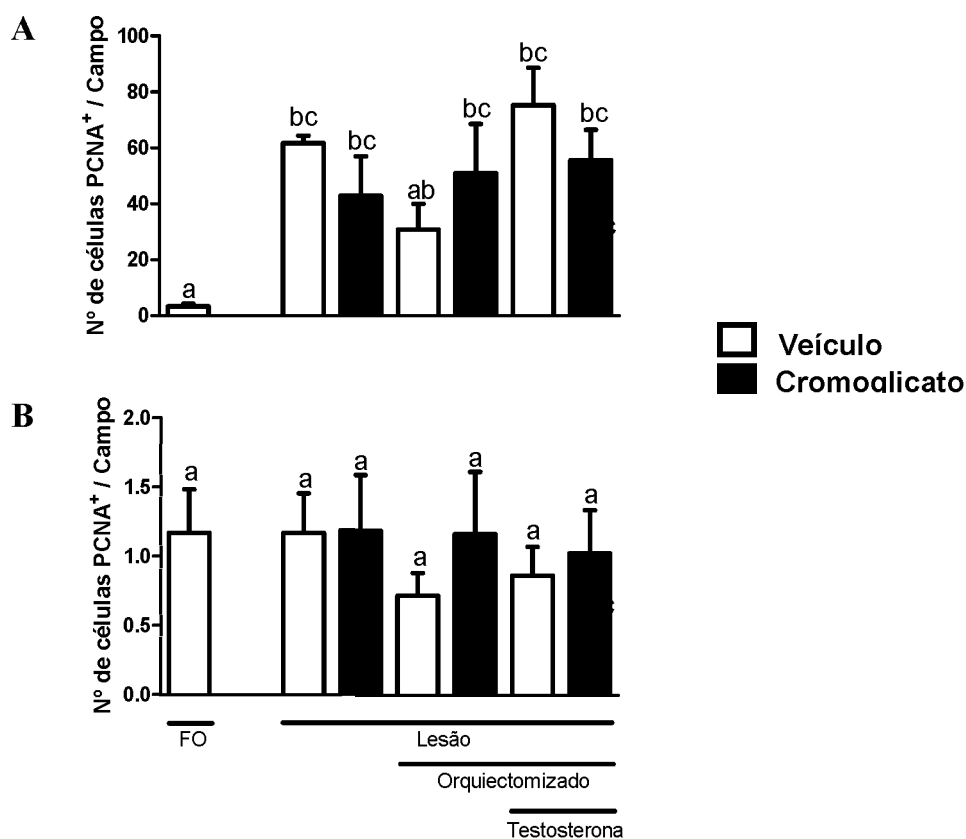
Fonte: A autora (2015).

Seções de tecido evidenciando a imunomarcagem para α -actina nos rins oriundos de ratos falso-operados (A) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral (B-G). Os efeitos do tratamento com cromoglicato (C), da orquiectomia (D), da reposição hormonal com testosterona (F), bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia (E) ou reposição hormonal (G) também foram avaliados. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 40x. Escala = 50 μ m.

4.6 Expressão Renal de PCNA

A obstrução ureteral aumentou a expressão renal de PCNA, na região túbulo-intersticial, e a orquiectomia, mas não o tratamento com cromoglicato, bloqueou parcialmente esse efeito. A reposição de testosterona reverteu o efeito da orquiectomia sobre a expressão de PCNA e o tratamento concomitante com cromoglicato não alterou o efeito da reposição hormonal. Ainda, o tratamento com cromoglicato não intensificou o efeito da orquiectomia (Figura 29A, Figura 30). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada com relação à expressão de PCNA glomerular (Figura 29 B).

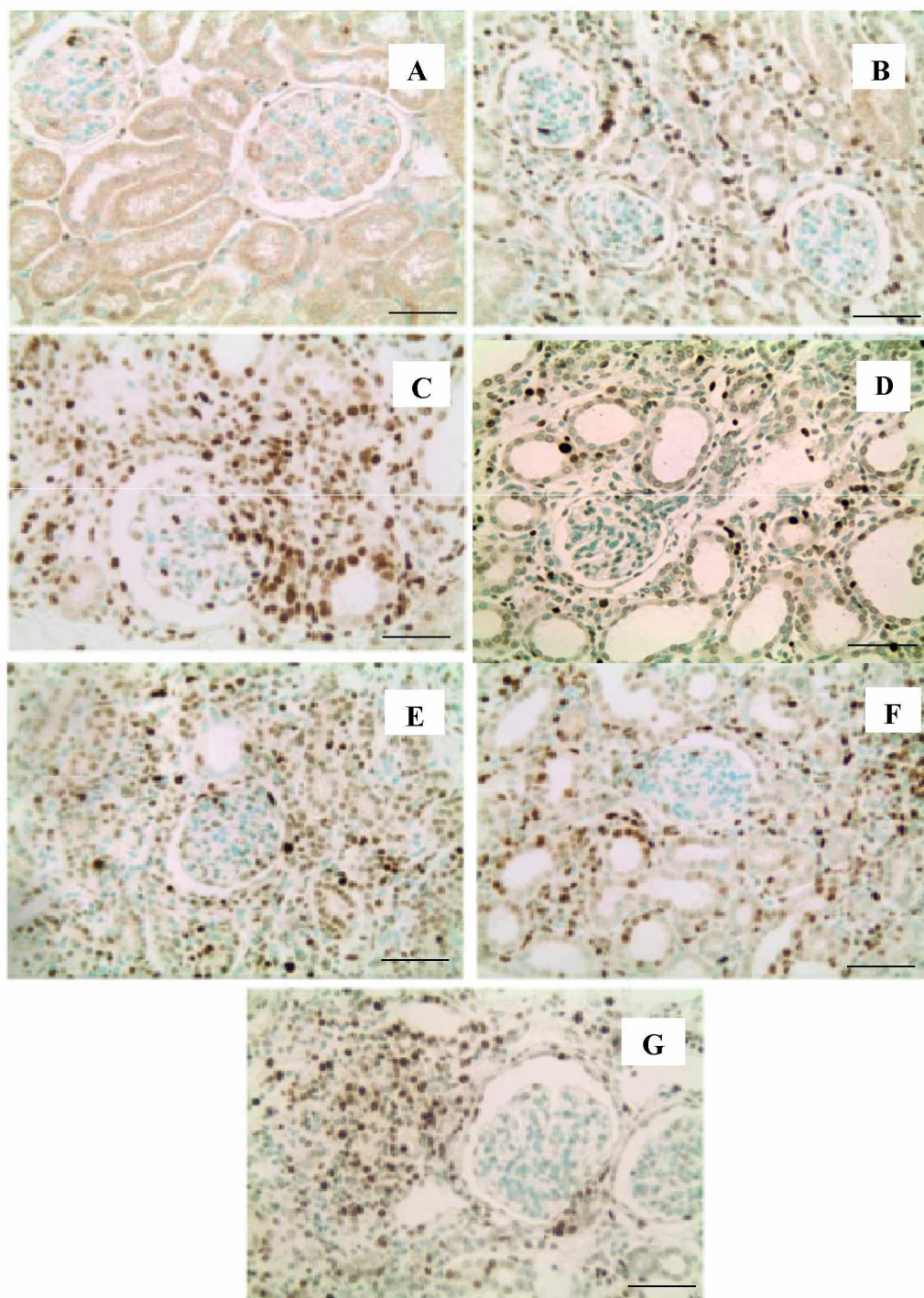
Figura 29- Número de células PCNA⁺ túbulo-intersticial e glomerular no tecido renal dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: A autora (2015).

Expressão de PCNA na região túbulo-intersticial (A) e glomerular (B) de rins oriundos de ratos falso-operados (FO) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral. Os efeitos do tratamento com cromoglicato, da orquiectomia, da reposição hormonal com testosterona, bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia ou reposição hormonal, foram avaliados em grupos de animais submetidos à obstrução ureteral. Os dados representam a média±EPM de 5-6 animais. Grupos que compartilham o mesmo subscrito não diferem significativamente (ANOVA/Newman-Keuls).

Figura 30- Imagens representativas da expressão de PCNA em rins dos diferentes grupos experimentais.



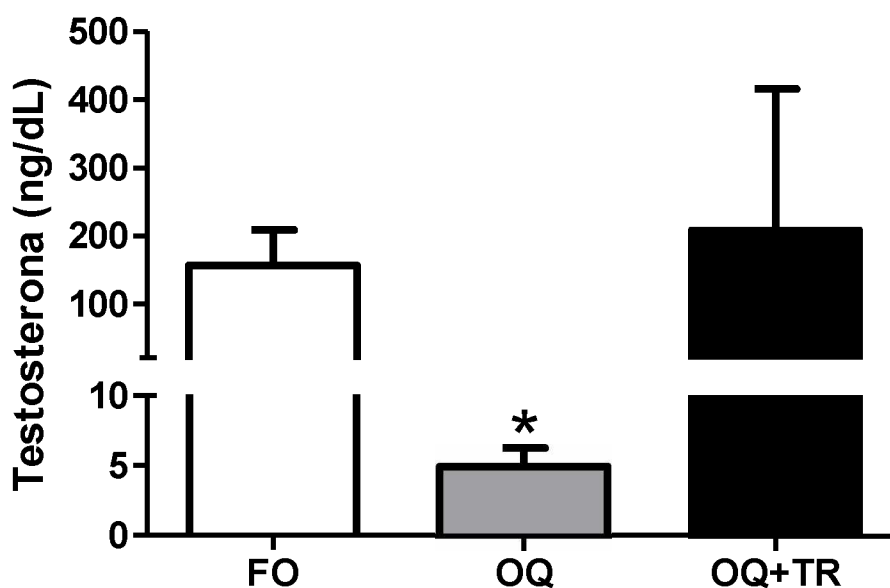
Fonte: A autora (2015).

Seções de tecido evidenciando a imunomarcação para PCNA nos rins oriundos de ratos falso-operados (A) ou submetidos à lesão renal através da amarração ureteral (B-G). Os efeitos do tratamento com cromoglicato (C), da orquiectomia (D), da reposição hormonal com testosterona (F), bem como da associação do tratamento com cromoglicato com orquiectomia (E) ou reposição hormonal (G) também foram avaliados. Fotomicrografias obtidas com a objetiva de 40x. Escala = 50 μ m.

4.7 Dosagem Sérica de Testosterona

A orquiectomia diminui significativamente os níveis plasmáticos de testosterona, os quais foram normalizados pelo protocolo de reposição hormonal utilizado no presente estudo (Figura 31).

Figura 31– Efeitos da orquiectomia e da reposição hormonal sobre os níveis séricos de testosterona.



Fonte: A autora (2015).

Valores séricos de testosterona em ratos falso-operados (FO), orquiectomizados (OQ), ou castrados submetidos ao tratado para reposição de testosterona (OQ+TR). Os dados representam a média±EPM de 5-6 animais. * $P < 0,05$ vs. FO (ANOVA/Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Nossos dados demonstraram que a obstrução ureteral mantida por 14 dias ocasionou uma reestruturação renal, caracterizada por achatamento do córtex e da medula associada à dilatação da pelve renal. Essas alterações já foram relatadas na literatura (COCHARANE, et al. 2005; HIATT et al. 2013) e decorrem do acúmulo progressivo de urina no ureter e na pelve. Com o passar do tempo, a pressão produzida pelo acúmulo de líquidos leva à compressão do tecido renal e à reestruturação tissular (HIATT et al., 2013). Além disso, encontramos áreas com características de inflamação aguda e crônica no mesmo tecido. A coexistência dos dois processos inflamatórios sugere que o tecido renal sofra mais de uma injúria e em momentos distintos; dessa forma, áreas cronicamente inflamadas representariam regiões lesionadas precocemente após a obstrução ureteral, enquanto que regiões danificadas mais tardiamente apresentariam características de inflamação aguda. Essa diferença cronológica na intensidade dos insultos lesivos encontra respaldo nas observações de Hiatt et al. (2013), os quais relatam que a medula renal sofre compressão mais intensamente do que o córtex. Observamos, por fim, um acúmulo de material amorfo acidófilo no interior dos túbulos, os quais possivelmente representam restos de células mortas. A presença de células descamadas na luz de alguns túbulos reforça essa hipótese. Em relação a função renal, Cocharane et al. (2005) sugeriram que a taxa de filtração glomerular pode ser compensada por uma hiperfiltração do rim contralateral fazendo com que a TFG não se altere após obstrução ureteral unilateral. Nossos dados corroboram com essa hipótese, já que não observamos alterações nas funções renais de animais submetidos à amarração do ureter esquerdo no 14º dia após a obstrução.

Os dados obtidos no presente estudo em rins de animais submetidos à amarração ureteral, os quais foram tratados com um inibidor da desgranulação mastocitária ou orquiectomizados, sugerem fortemente que tanto a atividade mastocitária quanto a testosterona contribuem para o desenvolvimento de fibrose nesse modelo. Nossas observações corroboram com dados recentemente descritos na literatura (CHO et al., 2012; VEERAPPAN et al., 2012). A observação de que a reposição hormonal reverteu o efeito protetor da orquiectomia, com relação à deposição de fibra de colágeno no referido modelo, associada à constatação de que os efeitos pró-fibróticos da testosterona foram parcialmente inibidos pelo cromoglicato, configuram fortes evidências de que os efeitos da testosterona com relação a esse particular requerem a atividade mastocitária. Essa interação entre efeitos pró-fibróticos da testosterona e atividade mastocitária configura a grande novidade do presente estudo. Na tentativa de

compreender os possíveis mecanismos celulares envolvidos na interação entre os efeitos pró-fibróticos da testosterona e os mastócitos, avaliamos, após amarração ureteral, a população renal de mastócitos, de células α -actina⁺, bem como de células PCNA⁺.

Observamos que a amarração ureteral aumentou tanto a população mastocitária renal quanto a atividade dessas células; ambas as alterações parecem depender tanto da atividade dos próprios mastócitos, quanto da testosterona. Cabe ressaltar que a literatura relata que a liberação de mediadores mastocitários participa na conversão de células precursoras residentes imaturas em mastócitos maduros, bem como na ativação dos próprios mastócitos, de acordo com o sugerido no presente estudo (JANICKI et al., 2006). Com relação à testosterona, os dados sugerem que o aumento na população e atividade mastocitária produzido por esse hormônio ocorre parcialmente ou totalmente, respectivamente, via ativação, direta ou indireta, de mastócitos residentes. Essas sugestões são baseadas na constatação de que o tratamento com cromoglicato reverteu parcialmente o efeito da testosterona sobre o aumento da densidade mastocitária, e reverteu totalmente o efeito desse androgênio sobre a desgranulação celular.

Veerappan et al. (2012) relataram aumentos na população e atividade mastocitária no parênquima renal após amarração ureteral; contudo, no presente estudo observamos que a amarração ureteral não determinou aumentos na densidade mastocitária parenquimatosa, de forma que as alterações observadas representam incrementos na densidade dessas células na região da pelve renal, a qual mostrou-se significativamente dilatada em nossas condições experimentais. Como não avaliamos o decurso temporal das alterações mastocitárias após amarração ureteral no parênquima renal, não podemos descartar a hipótese de que aumentos mais precoces na população mastocitária parenquimatosa contribuam para a instalação da fibrose renal. Contudo, essa hipótese parece pouco provável, já que estudos que avaliaram a progressão temporal da densidade mastocitária, no modelo de amarração ureteral, relatam um aumento progressivo a longo dos 14 dias que sucedem a amarração, sendo o valor máximo observado no último dia, i.e., no 14º dia (VEERAPPAN et al., 2012). Esses estudos serviram de base para a eleição do tempo pós-obstrução no qual as análises seriam conduzidas em nosso trabalho. Outra interpretação possível é a de que os mastócitos presentes na pelve renal possam orquestrar a deposição de fibras de colágeno no parênquima renal. A sugestão de uma modulação de longa distância é baseada no fato de que os mastócitos são células que secretam inúmeros mediadores, alguns dos quais podem deixar o sítio de deposição e se difundir por longas distâncias nos tecidos (MACKINS et al., 2006; BISPO-DA-SILVA et al., 2010). Nesse sentido, cabe salientar que a amarração do ureter determinou acúmulo de líquidos na pelve

renal, de forma que os mediadores liberados pelos mastócitos nessa região poderiam se acumular no interior do referido fluido pélvico ao longo do tempo. O contato direto desse líquido com o tecido renal forneceria uma rota para a exposição do parênquima aos mediadores dos mastócitos localizados no tecido que forma a parede da pelve renal.

A expressão de α -actina renal aumenta após amarração ureteral e a literatura sugere que a testosterona esteja envolvida nessa alteração (FU et al., 2006; METCALFE et al., 2007; CHO et al., 2011). De fato, nossos dados sugerem que a testosterona modula parcialmente o aumento da expressão celular de α -actina na região túbulo-intersticial de rins submetidos à obstrução ureteral; sugerem, também, que esse efeito da testosterona seja, em parte, dependente da atividade mastocitária. Os mastócitos são capazes de estimular a expressão de α -actina em fibroblatos mantidos em cultura (GAILIT et al., 2001), além de expressarem receptores para androgênios (CHEN et al., 2010), observações que possibilitam explicar a interação entre testosterona e mastócitos com relação à expressão de α -actina observada no presente estudo.

Diversas células renais podem expressar α -actina, como pericitos, células da musculatura lisa vascular e miofibroblastos (STRUTZ; ZEISBERG, 2006). Os miofibroblastos representam um fenótipo de fibroblastos envolvidos ativamente na deposição túbulo-intersticial de fibras de colágeno em condições que determinam fibrose renal (STRUTZ; ZEISBERG, 2006). De fato, LeBleu et al. (2013) elegantemente demonstraram que a inibição da proliferação de miofibroblastos reduz em 50% a fibrose intersticial renal observada após amarração ureteral. Esses autores sugerem que os miofibroblasto presentes no rim, após amarração ureteral, originam-se a partir de mecanismos proliferativos e não proliferativos. O mecanismo proliferativo aponta que 50% dos miofibroblastos são oriundos de fibroblatos residentes que se proliferam, o restante advém da diferenciação de precursores da medula óssea (35%), da diferenciação associada ao processo de reprogramação endotelial-mesenquimal (10%) ou epitelial-mesenquimal (5%), i.e., da diferenciação de células endoteliais e epiteliais renais em miofibroblastos. Desse modo, considerando o mecanismo proliferativo supracitado, podemos sugerir que parte das células PCNA⁺ observadas no presente estudo, as quais aumentaram no ambiente túbulo-intersticial após amarração ureteral, possa representar uma população de células em proliferação comprometida com a síntese de fibras de colágeno. Essa sugestão baseia-se no fato do PCNA ser uma proteína necessária para a replicação de DNA, manutenção do ciclo e da proliferação celulares (JASKULSKI et al., 1988). Ainda, a constatação de que a castração aboliu o aumento da fibrose renal no nosso modelo, mas apenas diminui a expressão de α -actina, sugere que outras células produtoras de fibras de colágeno, distintas dos

miofibroblastos, possam estar envolvidas. Nesse sentido, a literatura relata que nem toda célula produtora de fibras de colágeno (e envolvida no desenvolvimento de fibrose renal) expressa α -actina (OKADA et al., 2000).

Apesar da literatura relatar que a testosterona estimula vias de sinalização envolvidas com o processo apoptótico no tecido renal após amarração ureteral (METCALFE et al., 2007), nossos resultados sugerem que esse hormônio estimula, direta ou indiretamente, a proliferação celular nesse modelo. A observação de que a testosterona e seu metabólito mais potente, diidrotestosterona, não alteram a proliferação de fibroblatos *in vitro* (HARVEY; GRAHAM; PANAYI, 1976) advogam em favor de um efeito hormonal indireto. Com relação a isso, tem sido demonstrado que os níveis do fator transformador de crescimento beta-1 (TGF- β 1) aumenta precocemente no tecido renal após amarração ureteral e que a castração abole esse aumento (METCALFE et al., 2007); o TGF- β 1 é capaz de induzir tanto proliferação de fibroblastos renais (STRUTZ et al., 2001), quando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos *in vitro* (EVANS et al., 2003). Apesar da fonte do TGF- β 1 não ter sido investigada nesses estudos, tem sido relatado que os grânulos mastocitários possuem TGF- β 1 e que suas proteases podem ativar essa citocina através de clivagem proteolítica (HÜGLE, 2014); essa observação sugere que o efeito da testosterona sobre a população mastocitária, demonstrado no presente estudo, poderia ser umas das vias envolvidas no aumento precoce de TGF- β 1 descrito na literatura no tecido renal após amarração ureteral. Essa sugestão fornece uma possível explicação molecular para a interação entre testosterona, mastócitos e fibrose renal sugerida por nossos dados.

Em conjunto, nossos dados e aqueles descritos na literatura possibilitam sugerir que parte dos efeitos pró-fibróticos da testosterona nos rins envolva a estimulação da proliferação de células produtoras de matriz extracelular.

6. CONCLUSÕES

- A lesão renal induzida após obstrução ureteral ocasionou um aumento da densidade de mastócitos e da deposição de fibras de colágeno. Como também, aumento do número de células PCNA⁺ e da expressão de α -actina.
- O presente trabalho sugere que há uma interação entre mastócitos e testosterona no desenvolvimento de fibrose renal no modelo estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. Colaboração de Ana Maria de Lauro Castrucci et al. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 1032-1050.
- BERNSTEIN, G. T., et al. Ureteropelvic junction obstruction in the neonate. **Journal Urology**, Baltimore, p. 1216–1221, 1988.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**, 6^a. ed., Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2009, 864p.
- BLANK, U., et al. Mast cells and inflammatory kidney disease. **Immunol. Rev.**, [S.l], v. 217, p. 79–95, 2007.
- 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. **Vascul Pharmacol.**, New York, v.53, n.2, p.22-27, 2010.
- CHEN, W. et al. Human mast cells express androgen receptors but treatment with testosterone exerts no influence on IgE-independent mast cell degranulation elicited by neuromuscular blocking agents. **Exp Dermatol.**, [S.l], v. 19, n. 3, p.302-4, 2010.
- CHEVALIER, R. L., FORBES, M. S., THORNHILL, B. A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. **Kidney International**, New York, v.75, p.1145–1152, 2009.
- COCHRANE, A. L. et al. Renal structural and functional repair in a mouse model of reversal of ureteral obstruction. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v.16, n. 12, p. 3623-30, 2005.
- CHO, M. H. et al. Orchiectomy Attenuates Kidney Fibrosis after Ureteral Obstruction by Reduction of Oxidative Stress in Mice. **Am. J. Nephrol.**, Basel, v. 35, n.1, p. 7-16, 2012.
- COMBS, J. Maturation of rat mast cells. An electron microscope study. **J. Cell Biol.**, New York, v. 31, p. 563-575, 1966.
- DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2007. 800p.
- DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C., Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Baltimore, v. 62, n.10, p. 698–738, 2014.
- DVORAK, A.M. et al. Piecemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release in vivo by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. **Blood**, New York, v. 83, n. 12, p.3600-12, 1994.
- ELEAWA, S. M. et al. Effect of testosterone replacement therapy on cardiac performance and oxidative stress in orchidectomized rats. **Acta Physiol.**, Oxford, v.209, p.136–147, 2013.

EHARA T, SHIGEMATSU H. Contribution of mast cells to the tubulointerstitial lesions in IgA nephritis. **Kidney Int.**, New York, v.54, p. 1675–1683, 1998.

EHARA T, SHIGEMATSU H. Mast cells in the kidney. **Nephrology (Carlton)**, [S.l], v.8, p. 130–138, 2003.

EVANS, R. A. et al. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation- the role of Smad proteins. **Exp Cell Res.**, Orlando, v. 282, n.2, p. 90-100, 2003.

FRAGOGIANIIS, E. N. et al. Cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion, initiating the resident cardiac mast cell degranulate and release preformed TNF- α . **American Heart Association**, [S.l], v. 98, p. 699-710, 1998.

FU, P. et al. Signaling mechanism of renal fibrosis in unilateral ureteral obstructive kidney disease in ROCK1 knockout mice. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v.7, n. 11, p.3105-14, 2006.

GAILIT, J. et al. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. **J Invest Dermatol.**, Baltimore, v.117, n.5, p.1113-9, 2001.

GALLI, S.J., NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nat. Immunol.**, New York, v.6, n.2, p.135–142, 2005.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006, 1216 p.

HARVEY, W.; GRAHAME, R.; PANAYI, G.S. Effects of steroid hormones on human fibroblasts in vitro. II. Antagonism by androgens of cortisol-induced inhibition. **Ann. Rheum. Dis.** [S.l], v.35, n.2, p.148-51, 1976.

HEI, Z. Q. et al. Pretreatment of cromolyn sodium prior to reperfusion attenuates early reperfusion injury after the small intestine ischemia in rats. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v.13, n.38, p.5139–5146, 2007.

HIATT, M.J. et al. Urinary tract obstruction in the mouse: the kinetics of distal nephron injury. **Lab Invest.**, Baltimore, v. 93, p. 1012-23, 2013.

HIROMURA K, et al. Tubulointerstitial mast cell infiltration in glomerulonephritis. **Am. J. Kidney Dis.**, [S.l], v.32, p.593–599, 1998

HOLDSWORTH, S. R.; SUMMERS, S. A. Role of Mast Cells in Progressive Renal Diseases **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v.19, n. 12, p. 2254–2261, 2008.

HÜGLE, T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis. **Swiss Med Wkly.**, Basel, v. 3, n.44, 2014.

JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Origin, maturation and recruitment of mast cell Precursors. **Front.Biosci.**, [S.l], v. 3, p. 1390-1406, 2011.

JANICKI, J.S. et al. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related

ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. **Cardiovascular Research**, [S.l.], v.69, p.657 – 665, 2006.

JASKULSKI, D. et al. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA Cyclin. **SCIENCE**, [S.l.], v. 240, 1988.

JONES, S. E. et al. Mast cell infiltration and chemokine expression in progressive renal disease. **Kidney International**, New York, v. 64, n. 3, p. 906-13, 2003.

KIM, D.H. et al. Mast cells decrease renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. **Kidney Int.**, New York, v. 75, p. 1031–1038, 2009.

KLAHR, S. et. al. Increased expression of TGF- β 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. **Kidney International**, New York, v. 4, p. 313—321, 1993.

KLAHR, S.; ISHIDOYA, S.; MORRISSEY, J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. **Am. J. Kidney Dis.**, New York, v.26, n.1, p.141–146, 1995.

KLAHR, S.; MORRISSEY, J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 283, n. 5, p. 861–75, 2002.

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.

LEBLEU, V.S. et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Nat Med.**, New York, v. 19, n.8, p. 1047-5, 2013.

LEVICK, P. et al. Cardiac mast cells: the centerpiece in adverse myocardial remodeling. **Cardiovascular Research**, London, v.89, n.1, p.12-19, 2011.

MADJENE, L.C. et al. Mast cells in renal inflammation and fibrosis: lessons learnt from animal studies. **Mol Immunol.**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 86-93, 2015.

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

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEROKY, Y.A. Mast Cells. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.77, n. 4, p. 1033-79, 1997.

MIYAZAWA, S. et al. Role of mast cells in the development of renal fibrosis: use of mast cell-deficient rats. **Kidney International**, New York, v. 65, n. 6, p. 2228-37, 2004.

NAGLE, R.B. et al. Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit:I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 28, n.4, p.456–67, 1973.

NASCIMENTO, F. J., JULIO, A.D. Obstrução da Junção Ureteropielica. **Urologia Fundamental**, p. 342-6, 2010.

NEUGARTEN, J. et al. Selective estrogen receptor modulators suppress mesangial cell collagen synthesis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v.279, n. 2, p. 309-18, 2000.

NORRBY, K. Mast cell and angiogenesis. **APMIS**, [S.l], v. 110, n.5, p. 355-71, 2002.

OKADA, H. et al. Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. **Kidney Int.**, New York, v.58, n. 2, p.587-97, 2000.

OVERED-SAYER, C. et al. Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? **Front. Pharmacol.**, Lausanne v.4,n. 174, 2014.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Braz. J. morphol. Sci.**, [S.l], v. 22, n.2, p.97-104, 2005.

ROBERTS, I.S.; BRENCHELEY, P.E. Mast cells: The forgotten cells of renal fibrosis. **J. Clin. Pathol.**, London, v.53, n.11, p. 858–62, 2000.

SHARMA, A.K. et al. Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **Kidney International**, New York, v.44, n. 4, p.774–788, 1993.

SHARMA, R. et al. Chymase increases glomerular albumin permeability protease-activated receptor-2. **Mol. Cell Biochem.**, The Hague, v. 297, n.2, p. 161-9, 2007.

SILVER, R.B. et al. Mast cells: a unique source of renin. **Proc. Natl. Acad. Sci. New York**, v.101, n. 37, p. 13607-12, 2004.

SHIMIZU, Y.; TSUCHIYA, K.; HORRI, Y. Demonstration of chymotryptic and tryptic activities in mast cells of rodents: comparison of 17 species of the family Muriadae. **J. Comp. Pathol.**, London, v.125, n.1, p.76-79, 2001.

STRUTZ, F. et al. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). **Kidney Int.**, New York, v.59, n.2, p.579-92,2001.

STRUTZ, F.; ZEISBERG, M. Renal Fibroblasts and Myofibroblasts in Chronic Kidney Disease. **American Society of Nephrology**, Baltimore, v.1, p. 2992–2998, 2006.

SUMMERS, S. A. et al. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction. **Kidney International**, New York, v. 82, n. 6, p. 676-85, 2012.

VEERAPPAN, A. et al. Mast cells are required for the development of renal fibrosis in the rodent unilateral ureteral obstruction model. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 302, n. 1, p.192-204, 2012.

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**, Berlin, v. 55, n. 3, p. 801-11, 2012.

YONG, L.C. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. **Exp. Toxicol. Pathol.**, New York, v. 49, n. 6, p. 409-24, 1997.

WANG Y, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. **Kidney International**, v.58, p. 1797–1804, 2000.

WILGUS, T.; WULFF, B. **Mast cells in Chronic Inflammation**. In: ROY, S. BAGCHI, D. **Chronic Inflammation: Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions**, California, CRC Press, p. 35-45, 2012.

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 011/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 132/13

Projeto Pesquisa: "Participação da testosterona e do estradiol na proteção das lesões renais induzidas por sobrecarga de volume em ratos: contribuição mastocitária".

Pesquisador Responsável: Luiz Borges Bispo da Silva

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

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 20 de Março de 2014.

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

ANEXO B**Protocolo de coloração por hematoxilina e eosina – Laboratório de Histologia**
Universidade Federal de Uberlândia

XIOL III- 15 minutos

XIOL II- 15 minutos

XIOL I- 15 minutos

Álcool absoluto III – 1 minuto

Álcool absoluto II – 1 minuto

Álcool absoluto I- 1 minuto

Álcool 95%- 1 minuto

Álcool 85% - 1 minuto

Álcool 70%- 1 minuto

Água corrente- 20 minutos

Água destilada- 5 minutos

Hematoxilina – 30” a 2’

Água corrente- 20 minutos

Eosina- Floxina- 1’30 a 2’

4 mergulhadas na água corrente para tirar o excesso

Álcool 70%- 1’

Álcool 85%- 1’

Álcool 95% - 1’

Álcool absoluto I – 1’

Álcool absoluto II– 1’

Álcool absoluto III – 1’

Xilol I- 10’

Xilol II- 10’

Xilol III- 10’

Colar a Laminula com Entellan ou Goma de Damar

ANEXO C**Protocolo de coloração por azul de toluidina – Laboratório de Histologia Universidade Federal de Uberlândia**

XILOL III- 15 minutos

XILOL II- 15 minutos

XILOL I- 15 minutos

Álcool absoluto III – 1 minuto

Álcool absoluto II – 1 minuto

Álcool absoluto I- 1 minuto

Álcool 95%- 1 minuto

Álcool 85% - 1 minuto

Álcool 70%- 1 minuto

Água corrente- 10 minutos

Água destilada- 5 minutos

Tampão Fosfato Citrato Ph 3,0 – 5'

Azul de Toluidina – 3'

Enxaguar com Tampão

Álcool 95% - 2''

Álcool absoluto I – 2''

Álcool absoluto II– 2''

Álcool absoluto III – 2''

Xilol I- 10'

Xilol II- 10'

Xilol III- 10'

Colar a Lamínula com Entellan ou Goma de Damar

ANEXO D**Protocolo de coloração por picrosirius – Laboratório de Histologia Universidade Federal de Uberlândia**

XILOL III- 15 minutos

XILOL II- 15 minutos

XILOL I- 15 minutos

Álcool absoluto III – 1 minuto

Álcool absoluto II – 1 minuto

Álcool absoluto I- 1 minuto

Álcool 95%- 1 minuto

Álcool 85% - 1 minuto

Álcool 70%- 1 minuto

Água corrente- 20 minutos

Água destilada- 5 minutos

Picrosirius red – 1 hora

Água corrente- 15 minutos

Água destilada- 5 minutos

Hematoxilina- 30''

Água corrente- 10 minutos

Água destilada- 5 minutos

Álcool 70%- 1'

Álcool 85%- 1'

Álcool 95% - 1'

Álcool absoluto I – 1'

Álcool absoluto II– 1'

Álcool absoluto III – 1'

Xilol I- 10'

Xilol II- 10'

Xilol III- 10'

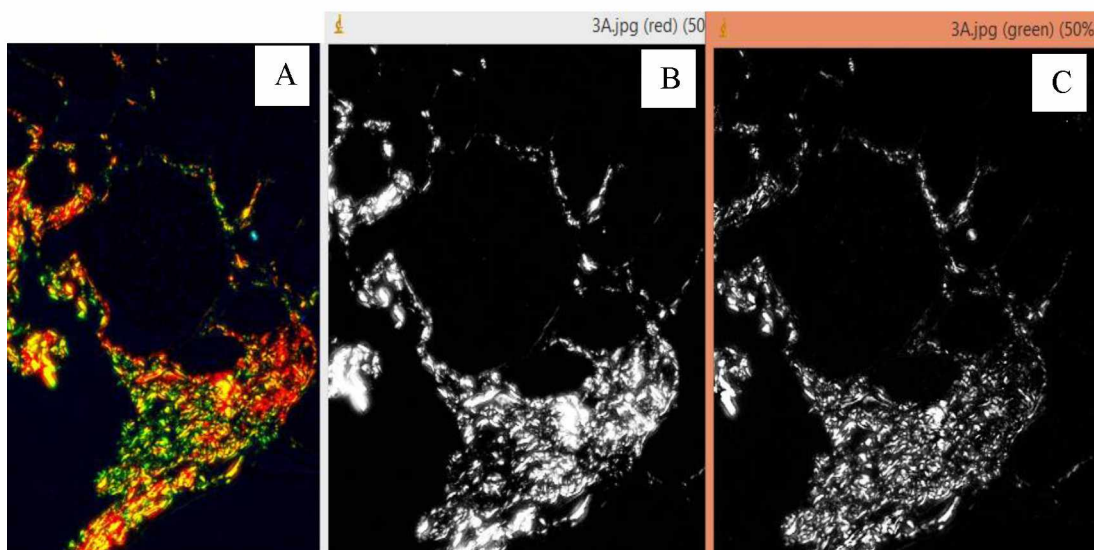
Colar a Lamínula com Entellan ou Goma de Damar

ANEXO E

Foi utilizado o programa Image J para diferenciação das fibras de colágeno na lâmina corada com Picrosirius red (Figura 32).

1. Abrir a Imagem
2. Clicar em Image > Color> Split Channels
3. Deixar a Aba escrito Red
4. Clicar em Image > Adjust > Thrsheld
5. Regular o Thrsheld de acordo com a imagem original
6. O resultado final é apresentado como porcentagem de área marcada em vermelho
7. Clicar na Aba escrito Green
8. Clicar em Image > Adjust > Thrsheld
9. Regular o Thrsheld de acordo com a imagem original
10. Somatória da área verde com a vermelha, resultando na área total.

Figura 32 - Imagem representando a análise das fibras de colágeno.



Fonte: A autora (2015).

Imagem representativa da quantificação das fibras de colágeno no rim pelo Programa Image J. (A) Imagem original, (B) Canal vermelho, (C) Canal Verde.

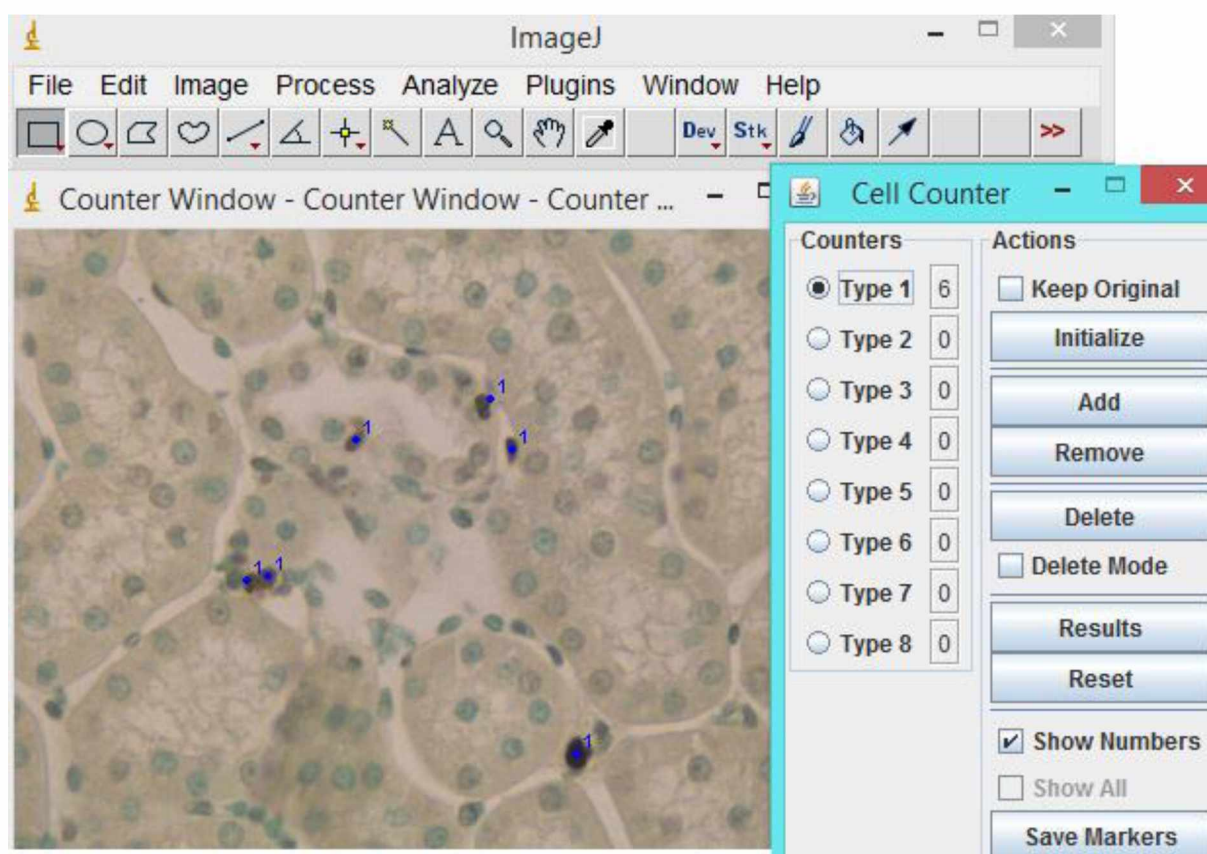
ANEXO F

Foi utilizado o programa Image J para quantificação de células PCNA⁺ (Figura 33).

Passos para a quantificação:

1. Abrir a Imagem
2. Clicar em Plugins > Jars> Cell Counter
3. Clicar em Initialize e clicar nas células PCNA⁺
4. Anotar o número de células marcadas

Figura 33 - Imagem representativa da quantificação de células PCNA⁺ no rim pelo programa Image J.



Fonte: A autora (2015).

Janela representativa do Programa Image J, utilizado para quantificação de células PCNA⁺.