

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAUDE

RICHARLISSON BORGES DE MORAIS

**QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO
DA NEFROPATIA DIABÉTICA E OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DO SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)**

Uberlândia - MG
2015

RICHARLISSON BORGES DE MORAIS

**QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO
DA NEFROPATIA DIABÉTICA E OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DO SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de mestre. Orientador: Prof. Dr. Sebastião Rodrigues Ferreira Filho. Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi.

Uberlândia - MG
2015

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

- M827q
2015
- Morais, Richarlisson Borges de, 1990
Quantificação de mastócitos envolvidos no desenvolvimento da nefropatia diabética e os efeitos da inibição do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) / Richarlisson Borges de Moraes. - 2015.
46 p. : il.
- Orientador: Sebastião Rodrigues Ferreira Filho.
Coorientadora: Ana Paula Coelho Balbi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.
1. Ciências Médicas - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Mastócitos - Teses. 4. Sistema renina-angiotensina - Teses. I. Ferreira Filho, Sebastião Rodrigues. II. Balbi, Ana Paula Coelho. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.
-

RICHARLISSON BORGES DE MORAIS

**QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA DIABÉTICA E OS EFEITOS DA
INIBIÇÃO DO SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de mestre. Orientador: Prof. Dr. Sebastião Rodrigues Ferreira Filho. Coorientadora: Profª. Dra. Ana Paula Coelho Balbi.

Uberlândia, 14 de Dezembro de 2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sebastião Rodrigues Ferreira Filho
Universidade Federal de Uberlândia

Profª. Dra. Ana Paula Coelho Balbi
Universidade Federal de Uberlândia

Profª. Dra. Samara Urban de Oliva
Centro Universitário São Camilo
Universidade Federal de São Paulo

*Aos meus pais, à minha irmã, e aos meus sobrinhos,
pelo amor incondicional e por compreenderem minhas ausências.
À Karen, pelo eterno amor sincero, companheirismo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela força que tem me dado ao longo da caminhada para a realização de mais este sonho.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e por compreenderem as ausências necessárias durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, à Faculdade de Medicina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos neste período.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, especialmente à Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS), por viabilizar a execução deste trabalho disponibilizando o espaço físico e o material necessários.

Aos funcionários do ARFIS pela convivência diária e colaboração no trato dos animais e nas técnicas laboratoriais.

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

Ao Prof Dr Sebastião Rodrigues Ferreira Filho pela orientação, por acreditar no meu potencial, pela confiança depositada e pelo exemplo de pesquisador e ética profissional.

Agradecimento especial à Profª Dra Ana Paula Coelho Balbi pela coorientação e supervisão do protocolo experimental deste trabalho, pela amizade e cumplicidade construídas desde a iniciação científica. Obrigado pelas lições diárias de profissionalismo, ética e dedicação à pesquisa, fazendo com que eu me tornasse o profissional e o ser humano que sou hoje. Agradeço por assumir o papel de “mãe” em alguns momentos, ouvindo meus anseios e inseguranças, e mais, fazendo dos meus sonhos, os seus! Muito obrigado!

À Profª Dra Samara Urban de Oliva por aceitar participar da avaliação deste trabalho.

Ao Prof Dr Luiz Borges Bispo da Silva pela amizade, pelo exemplo de dedicação e pelas imensuráveis contribuições à este trabalho.

À Professora Dra Celina Monteiro da Cruz Lotufo por participar da minha banca de

qualificação. Agradeço todas as considerações e sugestões.

Ao graduando em biomedicina Víctor Pereira do Couto Muniz pelo companheirismo na execução dos protocolos experimentais, pela ajuda sem a qual nada disso seria possível.

Por fim, agradeço a cada animal que foi necessário para o desenvolvimento deste trabalho, por cederem a vida em prol da pesquisa.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é um distúrbio metabólico caracterizado por elevados níveis glicêmicos, resultante de defeitos na secreção da insulina. A hiperglicemia estimula uma produção aumentada de renina renal e conseqüentemente, diante dos efeitos da ação tecidual da Angiotensina II, tem-se um importante mediador das alterações fisiopatológicas da Nefropatia Diabética (ND). A inibição farmacológica do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) tem sido amplamente estudada e vem se mostrando como um aliado ao tratamento da ND. Há indícios de que os mastócitos, células originalmente envolvidas nas reações alérgicas, liberem inúmeros mediadores e citocinas que estejam também relacionados a ND. Utilizou-se ratos Wistar divididos em seis grupos experimentais: Controle (C) - sem diabetes; Sham (S) - sem diabetes com simulação de tratamento; Controle Diabético (CD) - com DM; Enalapril (EN) - diabéticos tratados com enalapril; Losartan (LO) - diabéticos tratados com losartan; Alisquereno (AL) - diabéticos tratados com alisquereno. Após 90 dias de tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta de urina e, posteriormente, de sangue, para análises bioquímicas e de função renal, em seguida sacrificados e seus rins coletados para estudos morfológicos e histoquímicos. A glicemia pós-indução e final dos animais diabéticos, bem como o volume urinário, foram significativamente maiores que os valores apresentados pelos não-diabéticos. Não houve alterações significativas nos níveis de sódio e potássio plasmáticos, mas todos animais diabéticos apresentaram aumento de uréia plasmática e aumento da relação entre peso do rim e peso do corpo (com exceção do AL), em relação aos grupos C e S. A porcentagem de colágeno cortical foi maior nos grupo CD, quando comparado aos grupos C e S, e EN, em relação ao grupo S. Os bloqueadores do SRAA preveniram ou minimizaram alterações em parâmetros como áreas do corpúsculo renal (EN), tufo glomerular (EN) e espaço capsular, além da TFG (AL) e EUA (EN). O tratamento com AL preveniu o aumento no número de mastócitos íntegros e degranulados, alteração constatada nos rins dos demais animais diabéticos. Constatou-se que o tratamento com bloqueadores do SRAA preserva a função renal (AL) e reduz a EUA (EN) em diabéticos, por minimizarem determinadas mudanças estruturais glomerulares induzidas pelo diabetes, além de reduzirem (AL) o número de mastócitos no parênquima renal, sugerindo que essas células possam estar envolvidas na fisiopatogenia da ND.

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus Experimental; Mastócitos; Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is a metabolic disorder characterized by high blood glucose levels resulting from insulin secretion defects. Hyperglycemia stimulates an increased production of renal renin and consequently, due the tissue action effects of Angiotensin II, there is an important mediator of the DN pathophysiological changes. Pharmacological inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) has been widely studied and is proving to be an ally to DN treatment. There is evidence that mast cells, originally cells involved in allergic reactions, release a number of mediators and cytokines that are also related to DN. Wistar rats were divided into six groups: control (C) - without DM; Sham (S) – without DM with dummy treatment; Diabetic control (CD) – with DM; Enalapril (EN) – diabetics treated with enalapril; Losartan (LO) – diabetics treated with losartan; Aliskiren (AL) – diabetics treated with aliskiren. After 90 days of treatment, animals were placed in metabolic cages during 24 hours for urine collection and later, blood collection for biochemical analysis and renal function. Then the kidneys were removed for morphological and histochemical studies and the animals were euthanized. Post-induction and final glycemia in diabetic animals were significantly higher than the values presented by non-diabetic animals. There were no significant changes in sodium and potassium plasma levels, but all diabetic animals showed increased plasma urea and increased kidney weight and body weight ratio (except AL) compared to C and S groups. The cortical collagen percentage was higher in CD group when compared to C and S groups, and EN group compared to S group. RAAS blockers prevented or minimized parameters changes such as areas of the renal corpuscle (EN), renal glomerulus (EN) and capsular space, also GFR (AL) and AUE (EN). Treatment with AL prevented the increase in the number of intact, degranulated and total mast cells, alteration observed in the kidneys of diabetic animals. It was found that treatment with RAAS blockers preserve renal function (AL) and reduces AUE (EN) in diabetics by minimizing some glomerular structural changes induced by DM, in addition to reducing (AL) the mast cells number in renal parenchyma, suggesting that these cells may be involved in the pathogenesis of DN.

Keywords: Experimental Diabetes Mellitus; Mast cells; Renin-Angiotensin-Aldosterone System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Gráfico de valores médios de glicemia pós-indução de DM apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	24
Figura 02 – Gráfico dos valores médios de glicemia final apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	24
Figura 03 – Gráfico da uréia plasmática apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	25
Figura 04 – Gráfico de sódio plasmático apresentado pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	25
Figura 05 – Gráfico de potássio plasmático apresentado pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	26
Figura 06 – Corte histológico de rim corado com PAS.....	27
Figura 07 – Gráficos das áreas dos corpúsculos renais referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	28
Figura 08 – Gráfico das áreas dos tufo glomerulares referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	28
Figura 09 – Gráfico das áreas dos espaços capsulares referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	29
Figura 10 - Gráfico das médias das espessuras das membranas basais referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	29
Figura 11 - Gráfico das médias da relação entre peso do rim e peso do corpo referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	30
Figura 12 – Corte histológico de rim corado com Picrosirius Red.....	30

Figura 13 - Gráfico da porcentagem de colágeno cortical dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	31
Figura 14 – Gráfico da TFG apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	32
Figura 15 – Gráfico da EUA apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	32
Figura 16 – Corte histológico de rim corado com Azul de Toluidina.....	33
Figura 17 - Gráfico da quantificação de mastócitos íntegros por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	34
Figura 18 - Gráfico da quantificação de mastócitos degranulados por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	34
Figura 19 - Gráfico da quantificação de mastócitos totais por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Valores médios de glicemia pós-indução do DM, glicemia final e análise bioquímica (uréia, sódio e potássio plasmáticos), apresentados pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquireno).....	26
Tabela 02 – Valores da relação entre peso do rim e peso do corpo referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquireno).....	31
Tabela 03 – Valores funcionais da TFG e EUA apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquireno).....	33
Tabela 04 – Tabela da quantificação de mastócitos íntegros, mastócitos degranulados e mastócitos totais por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquireno).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DCV – Doenças Cardiovasculares

ND – Nefropatia Diabética

EUA – Excreção Urinária de Albumina

SRRA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

AngII – Angiotensina II

AT1 – Receptor de Angiotensina I

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

C – Grupo de Ratos Controle

CD – Grupo de Ratos Controle Diabético

S – Grupo de Ratos Sham

EN – Grupos de Ratos Diabéticos tratados com Enalapril

LO – Grupo de Ratos Diabéticos tratados com Losartan

AL – Grupo de Ratos Diabéticos tratados com Alisquereno

iECA – Inibidor de Enzima Conversora de Angiotensina

BRA – Antagonista de receptores AT 1 de Angiotensina II

IR – Inibidor de renina

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

ECA 2 – Enzima Conversora derivada de Angiotensina II

AT 2 – Receptor de Angiotensina II

MEC – Matriz Extracelular

MBG – Membrana Basal Glomerular

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

PAS – *Ácido Periódico-Reativo de Schiff*

STZ – Estreptozotocina

IGF – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

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

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

MAP – Mitogenic Activated Protein Kinases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Considerações Éticas	20
3.2 Animais	20
3.3 Indução de Diabetes Mellitus	20
3.4 Grupos de Estudo	20
3.5 Estudos de Função Renal	21
3.6 Quantificação de Albumina nas Amostras de Urina	21
3.7 Quantificação de Uréia nas Amostras de Sangue	22
3.8 Quantificação de Sódio e Potássio nas Amostras de Sangue	22
3.9 Análise Histoquímica	22
3.9.1 Azul de Toluidina	22
3.9.2 Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS)	22
3.9.3 Picrosirius Red	23
3.10 Análise Histomorfométrica	23
3.11 Análise Estatística	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Glicemia	24
4.2 Dados Bioquímicos	25
4.3 Análise Histomorfométrica	27
4.4 Relação Peso do Rim/Peso do Corpo	29
4.5 Colágeno Cortical	30
4.6 Função Renal	31
4.7 Quantificação de Mastócitos	33
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 Introdução

O diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizados por elevados níveis glicêmicos, que podem resultar de defeitos na secreção de insulina (DM1), na ação deste hormônio (DM2), ou em ambos mecanismos (ADA, 2015).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas da doença: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Ainda existem duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a *glicemia de jejum alterada* e a *tolerância à glicose diminuída*. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares (DCV) (ADA, 2015; DIB & CHACRA, 2007; ZECCHIN & SAAD, 2007).

O DM tipo 1, forma presente em 5% - 10% dos casos, é resultado da destruição das células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. Na maioria dos casos, essa destruição é mediada por auto-imunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo auto-imune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM1. O DM2 é a forma presente em 90% - 95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina. Em geral ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém, pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade e a cetoacidose raramente desenvolve-se espontaneamente, ocorrendo apenas quando associada a outras condições clínicas, como infecções (ADA, 2015).

Em 1985, estimava-se que existissem 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões no ano 2030. Cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem nos países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (WILD, 2004).

Quantificar a prevalência de DM e o número de pessoas diabéticas, no presente e no futuro, é importante para permitir uma forma racional de planejamento e alocação de recursos destinados às políticas públicas para prevenção e tratamento eficazes (SBD, 2006).

O DM é uma causa considerável de morbimortalidade e também um problema de saúde pública, visto que pode resultar em inúmeras complicações micro e macrovasculares. Dentre as principais complicações microvasculares estão: retinopatia, neuropatia e nefropatia diabéticas (ND); enquanto que as macrovasculares são: Acidente vascular encefálico, infarto

agudo do miocárdio, etc. Com relação a ND, aproximadamente 35% dos pacientes com DM1 desenvolvem este tipo de complicação, caracterizada por lesões estruturais e funcionais dos rins, com níveis aumentados de excreção urinária de albumina (EUA), progressivamente de microalbuminúria a macroalbuminúria, podendo evoluir até a insuficiência renal crônica terminal, sendo inclusive um preditor de mortalidade nesta população. Nos pacientes com DM2, sua prevalência varia de 10 a 40%, estando associada a um aumento da mortalidade de aproximadamente 5 vezes (RIELLA, 2002; LYRA & CAVALCANTI, 2005; GRAF et al., 2009; ADA, 2015).

A hiperglicemia, no nível tecidual renal, estimula uma produção de renina elevada e conseqüentemente, diante dos efeitos da ação tecidual da Angiotensina II (Ang II), tem-se um importante mediador das alterações fisiopatológicas da ND (O'DONNELL, et al., 1998; ZATZ, 2000; VIDOTTI et al., 2004; DURVASULA & SHANKLAND, 2008). Em condições fisiológicas, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), relacionado com a manutenção da estabilidade hemodinâmica, é regulado pela renina, enzima de ação hormonal, produzida e armazenada no aparelho justaglomerular. Ao ser liberada por estímulos hemodinâmicos, favorece a quebra do angiotensinogênio existente no plasma, em angiotensina I, a qual é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) no metabólito (hormônio) ativo - AngII. Esta produção de AngII ocorre tanto a nível sistêmico quanto tecidual. A AngII, principalmente através de seus receptores AT1 (biologicamente mais importante), estimula o sistema nervoso simpático, a excreção de potássio, reabsorção de sódio e água (intensificada pelo aumento da produção de aldosterona e do hormônio anti-diurético, produzidos na glândula supra-renal e na neuro-hipófise, respectivamente), promove vasoconstrição arteriolar e aumenta a filtração glomerular (como resultado da vasoconstrição da arteríola eferente) (ZATZ, 2000; RIELLA, 2002).

Além do efeito hemodinâmico, Ang II interage com alguns tipos de receptores para desempenhar outras funções. A partir da sua interação com AT1 em nível celular, atua sobre mecanismos de proliferação e reparo celular e expansão da matriz extracelular (MEC), gerando hipertrofia ou hiperplasia renal ou cardíaca, inflamação e fibrose tecidual, através da liberação de fatores do crescimento e estresse oxidativo. Com o estímulo em receptores AT2, promove a liberação de outras substâncias vasoativas, a exemplo de prostaglandinas e óxido nítrico, causando efeito vasodilatador. Além disso, tem ação anti-apoptótica e anti-proliferativa. No entanto, existem outros 2 receptores, AT3, cuja função ainda é desconhecida e AT4, cuja função consiste na modulação da função do endotélio. E, ainda se sabe pela

literatura, que Ang II é degradada a angiotensina III, cuja função é de estimular processos inflamatórios e fibrose tecidual e angiotensina IV, que através de amino e carboxipeptidases podem ativar AT4 (ATLAS, 2007; GRACIANO & NORONHA, 2010; KAGAMI, 2012; CROWLEY, 2012).

A vasta literatura relacionada ao SRAA estabelece claramente o papel dominante do eixo ECA – Ang II – AT1R para a manutenção da pressão sanguínea, através de processos hemodinâmico e tubulares. A ativação deste eixo também está diretamente relacionada às condições patológicas, incluindo a hipertensão, diabetes e sensibilidade ao sal, contribuindo assim, para a progressão da lesão renal. Por isso, o bloqueio da ECA ou do receptor AT1 são terapias efetivas para diminuir o dano renal bem como, regular a pressão sanguínea. Entretanto, estas abordagens terapêuticas, podem resultar na ativação dos componentes da via não clássica do SRAA, a qual pode se opor às vias estimuladas pelo eixo relacionado à Ang II e receptores AT1. É evidente na literatura que a expressão significativa do receptor para ANG (1-7), diferente dos subtipos AT1 e AT2, e discutivelmente, uma enzima conversora de ANG (1-7) específica, como a ECA2 de múltiplas espécies, fortalece o papel fisiológico do eixo ECA2 – Ang (1-7) - AT7R, tanto no rim quanto em outros tecidos. Assim, existe a possibilidade para novas abordagens terapêuticas, que tem como alvo esta via em conjunção à via clássica. De fato, a nova abordagem experimental, para a superexpressão de ECA2 ou a administração da forma ativa desta enzima, estabeleceu o benefício cardiovascular do aumento da relação hormonal entre Ang (1-7) e Ang II (CHAPPELL, 2012; GRACIANO & NORONHA, 2010; KAGAMI, 2012; CROWLEY, 2012).

Portanto, a ativação de outros metabólitos derivados da Ang II, através da ação enzimática da ECA2, produz Ang (1-7), culminando em um efeito contrário à via clássica, promovendo vasodilatação, natriurese e efeitos anti-proliferativos. No entanto, há também a presença de receptores teciduais específicos para renina e pró-renina (renal e vascular), sinalizando a ativação tecidual de toda uma cascata de efeitos pró-fibróticos (ATLAS, 2007; GRACIANO & NORONHA, 2010; KAGAMI, 2012; CROWLEY, 2012).

Devido à importância dos componentes do SRAA para o desenvolvimento da ND e o fato de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e DM serem condições clínicas frequentemente associadas, vários estudos foram realizados utilizando-se fármacos capazes de interferir no funcionamento desse sistema, entre eles os inibidores da ECA (iECA), bloqueadores ou antagonistas dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA) e os inibidores diretos da renina (IR).

Os fármacos iECA bloqueiam a transformação da Ang I em II no sangue e nos tecidos,

por isso são eficazes no tratamento da HAS, reduzindo a morbidade e a mortalidade cardiovasculares em pacientes hipertensos, portadores de insuficiência cardíaca e pós-infarto agudo do miocárdio; atuam na prevenção secundária do acidente vascular encefálico; reduzem a EUA, retardando o declínio da função renal em pacientes com ND (CAREY, 2008).

Os BRA antagonizam a ação da Ang II por meio do bloqueio específico de seus receptores. São eficazes no tratamento da HAS; proporcionam redução da morbidade e mortalidade cardiovascular, mostrando também um efeito benéfico em insuficiência cardíaca congestiva, prevenção do acidente vascular cerebral e nefroproteção em pacientes com DM2, pois reduzem a EUA (CHAN et al., 2004; CAREY, 2008).

O Alisquereno é o único representante da classe de IR disponível atualmente para uso clínico, promove uma inibição direta da ação da renina com conseqüente diminuição da formação de Ang II. Tem eficácia anti-hipertensiva e efeito benéfico na redução de morbidade cardiovascular e renal, influenciando na hipertrofia de ventrículo esquerdo e proteinúria (POOL, 2007; CAREY, 2008; FELDMAN et al., 2008; DELEA et al., 2009; TRIMARCH, 2011).

A ND vem sendo cada vez mais considerada uma doença inflamatória, com modulação imune tanto no seu desenvolvimento quanto em sua progressão, assim como em inúmeras outras doenças renais, entre elas a glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial. Há relatos na literatura de infiltrado de células imunes, incluindo macrófagos, células T, células B e mastócitos no tecido renal exposto ao ambiente hiperglicêmico. Portanto, atualmente há vários estudos em desenvolvimento com a finalidade de investigar a ampla gama de possibilidades terapêuticas envolvendo a modulação imune e a patogênese da ND (FIONNUALA, 2013).

Os mastócitos são células do sistema imunológico de origem hematopoiética (PATEL et al, 2013), derivam de células pluripotenciais da medula óssea que expressam o antígeno CD34 (GOLKAR; BERNHARD, 1997 e KATSAMBAS et al., 1999, apud RECH, GRAÇA, 2006) e iniciam sua diferenciação sob a influência do fator de células tronco (stem cell factor–SCF) e da IL-3 (ROBBIE-RYAN; BROWN, 2002, apud RECH, GRAÇA, 2006) de uma linhagem distinta dos monócitos e macrófagos e dos precursores dos granulócitos (SCOTT; STOCKHAM, 2000, apud RECH, GRAÇA, 2006).

A origem dos mastócitos tem sido motivo de muitas discussões. Acredita-se que esses tipos celulares sejam produtos finais da diferenciação de outras células, ou seja, resultado de divisões mitóticas em suas variadas formas granulares (SANTOS et al., 2010). Normalmente

não amadurecem ao deixar a medula óssea e, então, passam a circular pelo sistema vascular como progenitoras imaturas e completam seu desenvolvimento periféricamente nos tecidos conjuntivos e na mucosa localizando-se próximos a vasos sanguíneos, linfáticos e nervos periféricos (OKAYAMA; KAWAKAMI, 2006). São observados também na medula óssea de indivíduos saudáveis quase sempre em contato com as travessias ósseas (DUARTE et al., 1999). Seu estado funcional é representado pela degranulação mastocitária, que acontece em resposta a vários estímulos, o que inclui estímulos medicamentosos e químicos, que são a base para a sua atividade biológica (HUANG; CHEN, 2012).

Essas células desempenham um papel central nas reações alérgicas por meio de alta afinidade com receptor de IgE (OKAYAMA; KAWAKAMI, 2006). São ativados por ligações cruzadas do antígeno específico de IgE ligado com alta afinidade ao receptor de membrana (FceRI) (HUANG; CHEN, 2012). Além disso, liberam inúmeros mediadores, incluindo histamina, heparina, fator de ativação plaquetária, triptase, quimase, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas (CHIAPPETTA; GRUBER, 2006).

Os mastócitos também participam da síntese de metabólitos, ácido araquidônico e várias citocinas e quimiocinas. Além destas funções clássicas, estudos recentes têm expandido o papel destas células que parecem também desempenhar um papel crítico na imunidade inata e adaptativa durante infecções bacterianas (OKAYAMA; KAWAKAMI, 2006; HUANG; CHEN, 2012).

Em modelo experimental de DM, utilizando-se ratos da linhagem Wistar, após sete semanas de tratamento com Cetotifeno, droga conhecida como agente estabilizador de mastócitos, e Lisinopril (iECA), observou-se melhora na função renal, na expressão de colágeno intersticial, assim como diminuição na expressão de mastócitos no interstício renal, nos grupos tratados com estes medicamentos, ao serem comparados ao grupo diabético. Quando comparados ao grupo de animais diabéticos tratados com composto 48/80, o qual estimula a degranulação de mastócitos, notou-se melhora ainda mais significativa dos parâmetros analisados. Portanto, infere-se que em situações de hiperglicemia, o Cetotifeno exerce efeito renoprotetor, possivelmente, através da inibição da degranulação mastocitária (KHURANA et al., 2011).

Diante da importância epidemiológica da DM, com sua morbi-mortalidade e complicações, com possível desfecho em doença renal terminal, aumentando, por sua vez, o número de pacientes que necessitam de terapia renal substitutiva, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de se estabelecer vias fisiopatológicas desconhecidas no desenvolvimento da ND e conseqüentemente novas possibilidades terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o número de mastócitos presentes ao longo do desenvolvimento da ND e se o tratamento monoterápico com drogas que interferem na atividade do SRAA pode influenciar na quantidade destas células no tecido renal.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o número de mastócitos íntegros, degranulados e totais presentes no tecido renal de ratos Wistar diabéticos tratados com iECA, BRA e IR;
- Determinar a área do corpúsculo renal, área do tufo glomerular e área do espaço capsular de ratos Wistar diabéticos tratados com iECA, BRA e IR;
- Mensurar a espessura da membrana basal glomerular de ratos Wistar diabéticos tratados com com iECA, BRA e IR;
- Determinar a porcentagem de colágeno no córtex renal de ratos Wistar diabéticos tratados com com iECA, BRA e IR;
- Determinar a TFG, pelo clearance de creatinina, de ratos Wistar diabéticos tratados com iECA, BRA e IR;
- Analisar a excreção urinária de albumina de ratos Wistar diabéticos tratados com iECA, BRA e IR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

O estudo foi desenvolvido em respeito às considerações éticas com experimentação em animais, tendo sido submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 122/11.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, com peso entre 200 e 300g, mantidos no depósito de animais em estantes climatizadas à temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas.

3.3 Indução de Diabetes Mellitus

A indução do DM foi realizada com a administração de aloxano (Sigma-Aldrich), um análogo tóxico da glicose o qual é captado pelo transportador de glicose do tipo GLUT-2 presente nas células beta pancreáticas, causando a necrose destas e, conseqüentemente, induzindo um modelo de DM1.

Após o período de jejum absoluto de 24 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália) solução a 2,5%, na dosagem de até 25 mg/Kg, administrado por via peritoneal. O controle da sedação foi efetuado avaliando-se o reflexo de retirada da pata ao estímulo doloroso. Posteriormente, o aloxano foi administrado por via endovenosa através de punção da veia peniana, na dosagem de 50 mg/kg de peso corporal, diluído em solução salina à 0,9%. A glicemia capilar foi aferida 24 horas após a indução utilizando-se um glicosímetro (Accu Check Active, Roche), considerando-se diabéticos aqueles animais que apresentavam glicemia maior que 200 mg/dL. Uma vez diabéticos, a insulino terapia foi realizada com insulina NPH (Humulin N[®], Lilly) com dosagem de uma unidade subcutânea, em dias alternados, a fim de manter os animais em quadro hiperglicêmico, porém, minimizando a mortalidade causada pela exacerbação deste quadro.

3.4 Grupos de Estudo

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- 1) *Controle* (C) - sem diabetes (N = 06);

2) *Sham* (S) - sem diabetes com simulação do tratamento proposto (N = 07);

3) *Controle diabético* (CD) – com DM sem tratamento (N = 07);

4) *Enalapril* (EN) - com DM tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina (iECA - 20 mg/L - diluído em água, oferecido *ad libitum*) (VOLPINI et al., 2003) (N = 07);

5) *Losartan* (LO) - com DM tratados com bloqueador de receptor AT1 (BRA - 50 mg/L – diluído em água, oferecido *ad libitum*) (VOLPINI et al., 2003) (N = 06);

6) *Alisquereno* (AL) - com DM tratados com inibidor de renina (IR - 50 mg/Kg/dia, administrado por gavagem) (MARTINS-OLIVEIRA et al., 2012) (N = 08).

Após 90 dias de tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para coleta de urina e, posteriormente, de sangue, para análise bioquímica. Realizada a coleta de material biológico para os exames laboratoriais, os animais foram anestesiados com Halotano (Cristália) e seus rins retirados - rim esquerdo por padronização, pesados, fixados em methacarn e incluídos em parafina para análises morfológicas. Após a coleta dos rins, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia.

3.5 Estudos de Função Renal

A função renal dos animais dos 6 grupos propostos foi avaliada através da dosagem de creatinina plasmática e urinária, por colorimetria, com o auxílio do ácido pícrico (Labtest Diagnostica). Para isso, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e toda a urina de 24 horas foi devidamente coletada; posteriormente, uma amostra de sangue foi retirada da cauda dos animais. A creatinina das amostras reage com o ácido pícrico formando picrato de creatinina, composto que desenvolve cor amarelada. A absorbância obtida pela leitura das amostras, utilizando espectrofotômetro, estava relacionada à concentração de creatinina na amostra. A TFG foi calculada, em seguida, pela fórmula:

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

onde Ucr = creatinina urinária, V = fluxo urinário e Pcr = creatinina plasmática.

3.6 Quantificação de Albumina nas Amostras de Urina

A excreção de albumina urinária dos animais dos 6 grupos propostos foi determinada por colorimetria com o auxílio do vermelho de pirogalol (Labtest Diagnostica). Esta substância reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado

com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul. A absorvância resultante obtida pela leitura das amostras em espectrofotômetro será diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

3.7 Quantificação de Uréia nas Amostras de Sangue

A quantificação de uréia plasmática dos animais dos 6 grupos propostos foi determinada por colorimetria. A uréia é hidrolisada pela urease à íons amônio e CO₂ (Labtest Diagnostica). Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A absorvância resultante obtida pela leitura das amostras em espectrofotômetro será diretamente proporcional à quantidade de uréia na amostra.

3.8 Quantificação de Sódio e Potássio nas Amostras de Sangue

A quantificação de íons sódio e potássio plasmáticos dos animais dos 6 grupos propostos foi realizada pela técnica de eletrodo de íon seletivo, através do analisador de íons seletivos AVL Roche 9180. Os potenciais de membrana são gerados pela permeabilidade de certos tipos de membranas a ânions ou cátions selecionados. Essas membranas são utilizadas para fabricar eletrodos seletivos para íons, que seletivamente interagem com uma única espécie iônica. O potencial produzido na interface da solução membrana-amostra é proporcional ao logaritmo da atividade iônica ou concentração do íon em questão.

3.9 Análise Histoquímica

Foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura, a partir dos rins emblocados em parafina e submetidos às seguintes colorações:

3.9.1 Azul de Toluidina

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

3.9.2 Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS)

O corante ácido periódico-reativo de Schiff (PAS) reage com carboidratos e

macromoléculas de carboidratos como o glicogênio, as glicoproteínas e proteoglicanos, gerando uma coloração magenta. Como a membrana basal (junção de duas lâminas basais) possui compostos ricos em carboidratos, evidencia-se facilmente pela coloração de PAS, possibilitando assim, a identificação dos limites das estruturas renais, como o tufo glomerular, a membrana basal da cápsula de Bowman, e os túbulos renais, favorecendo assim, a realização de estudos histomorfométricos.

3.9.3 Picrosirius Red

A coloração com picrosirius red é o método mais utilizado para evidenciar a presença de fibras colágenas no tecido, especialmente colágeno tipo I e tipo III. As lâminas coradas com Picrosirius Red foram analisadas utilizando o software Image J (Versão 1.4) para análise da porcentagem de colágeno cortical.

3.10 Análise Histomorfométrica

As análises histomorfométricas foram realizadas utilizando-se as lâminas coradas com PAS para mensuração da área do corpúsculo renal, do tufo glomerular, e área do espaço capsular, além da medida da espessura da membrana basal. Com o auxílio de um microscópio (Leica ICC50), avaliou-se os cortes histológicos em toda a sua extensão e foram selecionados, aleatoriamente, trinta (30) glomérulos de cada corte para realizar a análise proposta. As imagens foram capturadas por uma vídeo-câmera e transmitidas ao computador para realizar a avaliação morfométrica através do software HL Image 97 ++ (Western Vision, Salt Lake City, UT, USA).

3.11 Análise Estatística

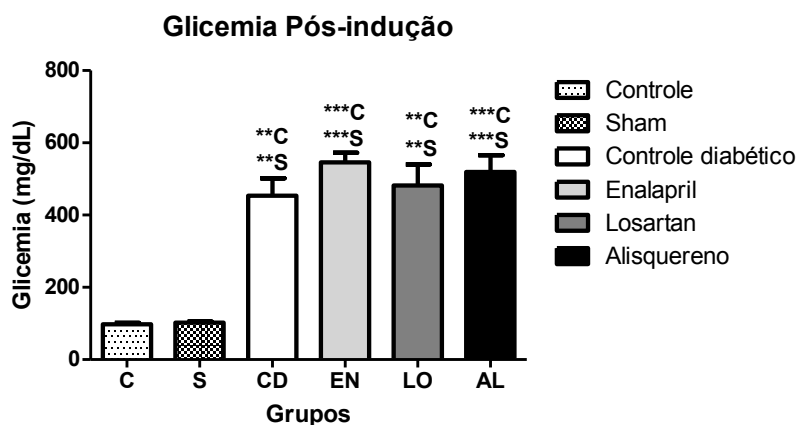
Para todos os parâmetros analisados utilizou-se o software *GraphPad Prism Version 5.00*, empregando o teste de Kolmogorov-Sminorv para identificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal (Gaussiana). Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi realizado o teste de Tukey, para os que não apresentaram, utilizou-se o teste Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Glicemia

A glicemia dos animais de todos os grupos estudados foi verificada 24 horas pós-indução do quadro DM (**Figura 01; Tabela 01**) e 90 dias após o início dos tratamentos – glicemia final (**Figura 02; Tabela 01**), evidenciando que nos animais diabéticos (CD, EN, LO e AL) a glicemia foi significativamente maior que a apresentada pelos animais dos grupos Controle (C) e Sham (S).

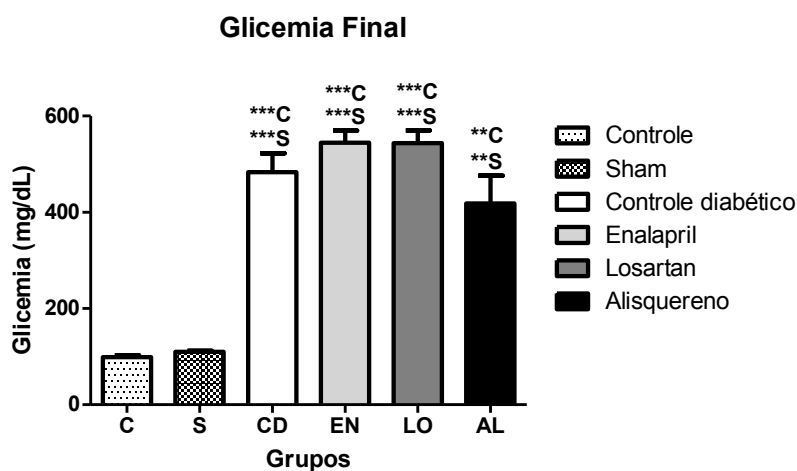
Figura 01 – Gráfico de valores médios de glicemia pós-indução de DM apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: $p < 0,001$ versus C; **C: $p < 0,01$ versus C; ***S: $p < 0,001$ versus S; **S: $p < 0,01$ versus S. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 02 – Gráfico dos valores médios de glicemia final apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

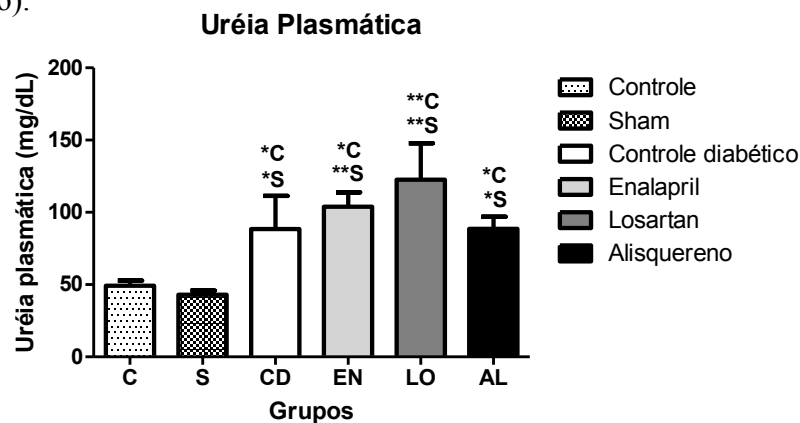
Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: $p < 0,001$ versus C; **C: $p < 0,01$ versus C; ***S: $p < 0,001$ versus S; **S: $p < 0,01$ versus S. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

4.2 Dados Bioquímicos

Ao analisar as dosagens de uréia plasmática dos grupos em estudo (**Figura 03; Tabela 01**), observou-se aumento deste parâmetro nos grupos diabéticos CD, EN, LO e AL quando comparados aos grupos não diabéticos (C e S).

Não houve diferenças significativas, entre os grupos estudados, para as dosagens plasmáticas de sódio (**Figura 04; Tabela 01**) e potássio (**Figura 05; Tabela 01**). No entanto, o grupo AL apresentou certa tendência à hipercalemia, em relação aos demais grupos.

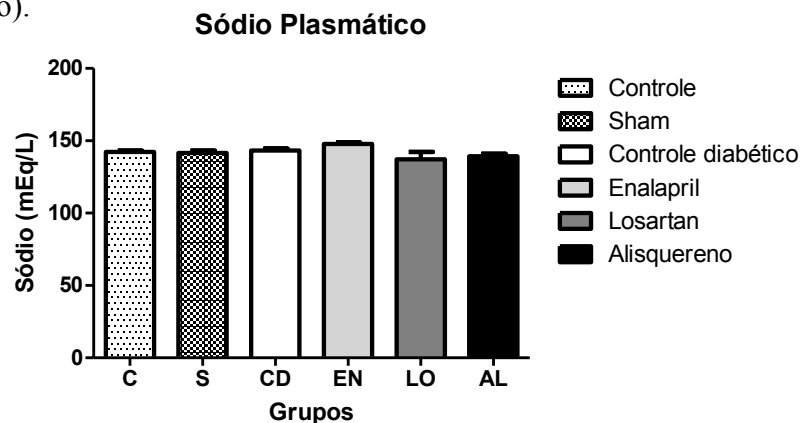
Figura 03 – Gráfico dos níveis plasmáticos de uréia apresentados pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. **C: p<0,01 versus C; *C: p<0,05 versus C; **S: p<0,01 versus S; *S: p<0,05 versus S. Teste de Tukey.

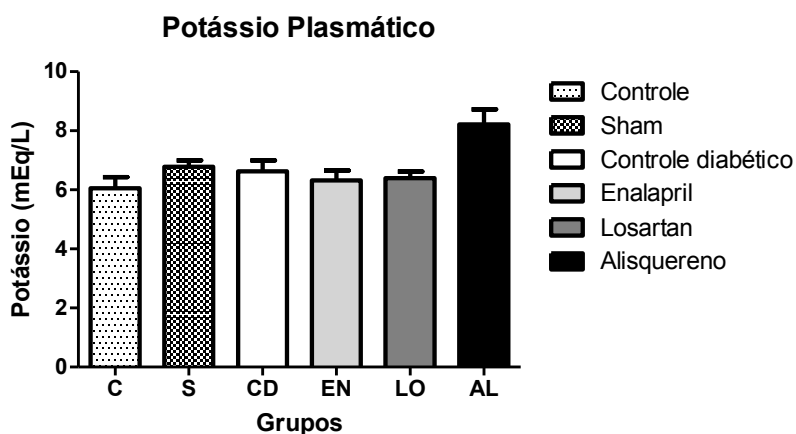
Figura 04 – Gráfico dos níveis plasmáticos de sódio apresentados pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. Teste de Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 05 – Gráfico dos níveis plasmáticos de potássio apresentados pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Tabela 01 – Valores médios de glicemia pós-indução do DM, glicemia final e análise bioquímica (uréia, sódio e potássio plasmáticos), apresentados pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).

	C	S	CD	EN	LO	AL
Glicemia Pós-indução (mg/dL)	97,33 ± 4,624	102,4 ± 2,810	453,9 ^{***C***S} ± 47,60	545,4 ^{***C***S} ± 27,10	481,5 ^{**C***S} ± 58,65	519,3 ^{***C***S} ± 46,4
Glicemia Final (mg/dL)	98,83 ± 4,126	109,7 ± 2,706	483,1 ^{***C***S} ± 39,74	544,7 ^{***C***S} ± 24,96	543,8 ^{***C***S} ± 26,65	418,4 ^{**C***S} ± 57,85
Uréia Plasmática (mg/dL)	49,17 ± 3,603	42,96 ± 2,737	88,35 ^{*C*S} ± 23,10	104,0 ^{*C**S} ± 9,748	122,5 ^{**C***S} ± 25,27	88,50 ^{*C*S} ± 8,441
Sódio Plasmático (mEq/L)	142,2 ± 0,9379	141,6 ± 1,458	143,3 ± 1,244	147,3 ± 0,5154	139,3 ± 2,388	139,3 ± 1,797
Potássio Plasmático (mEq/L)	6,056 ± 0,3742	6,780 ± 0,2144	6,633 ± 0,3644	6,320 ± 0,3355	6,396 ± 0,2234	8,210 ± 0,5070

Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

4.3 Análise Histomorfométrica

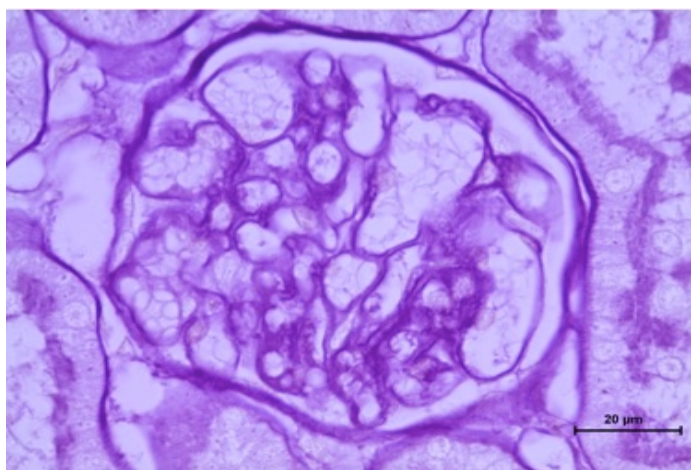
A coloração das lâminas de tecido renal com PAS (**Figura 06**) permitiu a avaliação morfométrica dos parâmetros: áreas do corpúsculo renal, tufo glomerular, espaço capsular e espessura da membrana basal. Ao analisar a **Figura 07** observa-se que a área do corpúsculo renal foi maior nos animais do grupo CD quando comparados aos grupos C e S, uma evidência de que os animais diabéticos apresentaram hipertrofia glomerular. O grupo EN apresentou menor área do corpúsculo renal quando comparado ao CD. Já os grupos LO e AL apresentaram maior área do corpúsculo renal em relação ao grupo S e aos grupos C, S e EN, respectivamente, no entanto não foram diferentes do grupo CD.

Em relação à análise da área do tufo glomerular, percebe-se que o grupo CD apresentou maior área do tufo glomerular quando comparado ao grupo S. O grupo EN apresentou menor área do tufo glomerular em comparação ao grupo CD enquanto que no grupo AL, este parâmetro foi maior do que nos grupos S e EN, conforme evidenciado na **Figura 08**.

Quanto às áreas dos espaços capsulares (**Figura 09**), nos animais dos grupos CD, EN, LO e AL esta área foi maior que a apresentada pelos grupos C e S.

Ao analisar a espessura da membrana basal dos glomérulos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (**Figura 10**).

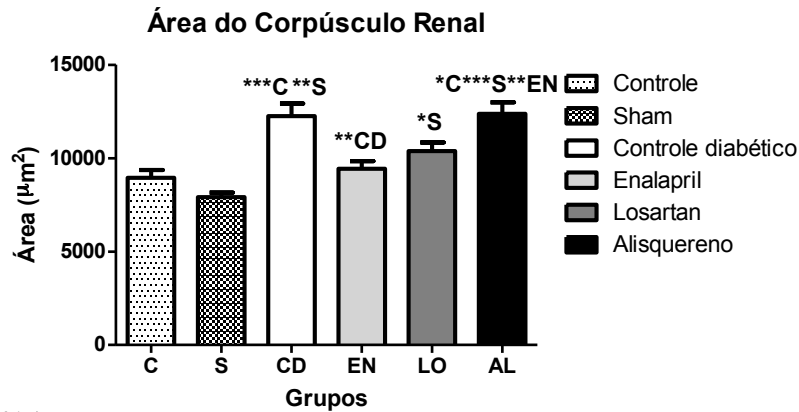
Figura 06 – Corte histológico de rim corado com PAS



Fonte: O Autor (2015).

Membrana basal evidenciada pela cor magenta, o que possibilitou a realização da análise histomorfométrica.

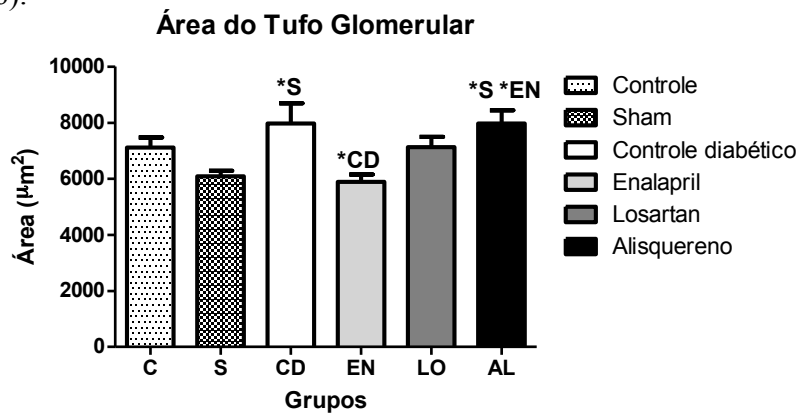
Figura 07 – Gráficos das áreas dos corpúsculos renais referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: p<0,001 versus C; **C: p<0,01 versus C; *C: p<0,05 versus C; ***S: p<0,001 versus S; **S: p<0,01 versus S; *S: p<0,05 versus S; **CD: p<0,01 versus CD; **EN: p<0,01 versus EN. Teste de Tukey.

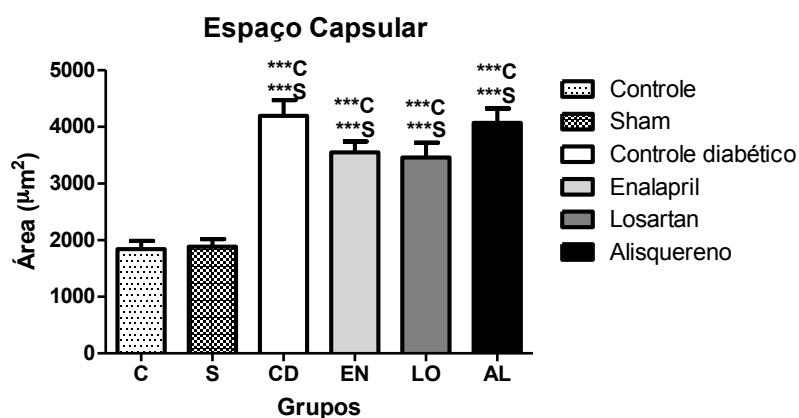
Figura 08 – Gráfico das áreas dos tufo glomerular referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. *S: p<0,05 versus S; *CD: p<0,05 versus CD; *EN: p<0,05 versus EN. Teste de Tukey.

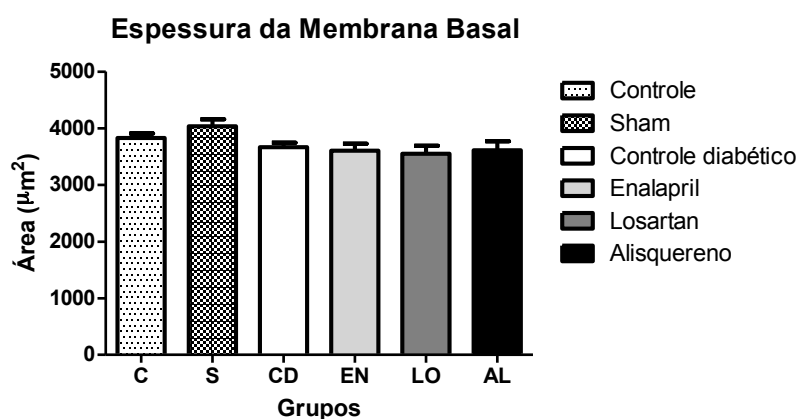
Figura 09 – Gráfico das áreas dos espaços capsulares referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: p<0,001 versus C; ***S: p<0,001 versus S. Teste de Tukey.

Figura 10 - Gráfico da espessura das membranas basais referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



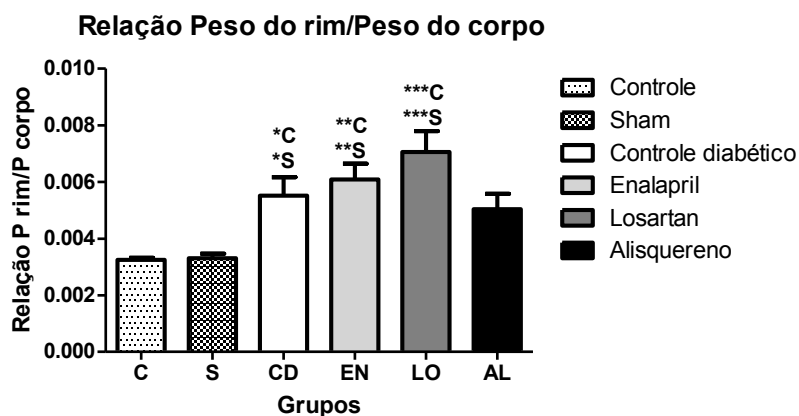
Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média ±EPM. Teste de Tukey.

4.4 Relação Peso do Rim/Peso do corpo

Ao analisar o peso do rim/peso do corpo, nota-se que todos os grupos de animais diabéticos CD, EN, LO (com exceção do alisquereno) apresentam aumento neste parâmetro quando comparados aos animais não diabéticos (**Figura 11; Tabela 02**).

Figura 11 - Gráfico das médias da relação entre peso do rim e peso do corpo referentes aos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



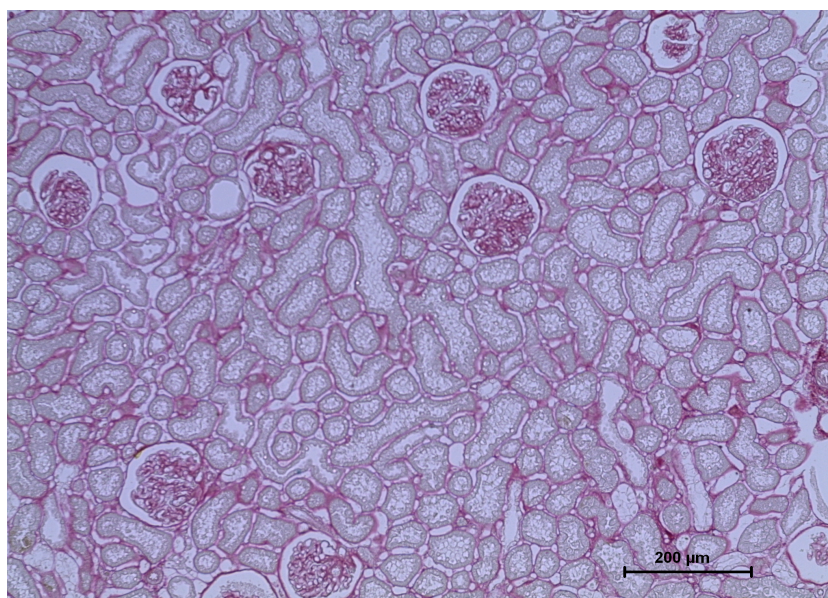
Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: $p < 0,001$ versus C; **C: $p < 0,01$ versus C; *C: $p < 0,05$ versus C; ***S: $p < 0,001$ versus S; **S: $p < 0,01$ versus S; *S: $p < 0,05$ versus S. Teste de Tukey.

4.5 Colágeno Cortical

A coloração das lâminas de tecido renal com Picrosirius Red (**Figura 12**) permitiu a avaliação da porcentagem de colágeno cortical renal de cada grupo estudado. Os animais diabéticos dos grupos CD e EN apresentaram aumento de colágeno cortical em relação aos grupos C e S, e somente ao grupo S, respectivamente. Já os grupos LO e AL mostraram redução da porcentagem de colágeno cortical (**Figura 13; Tabela 02**).

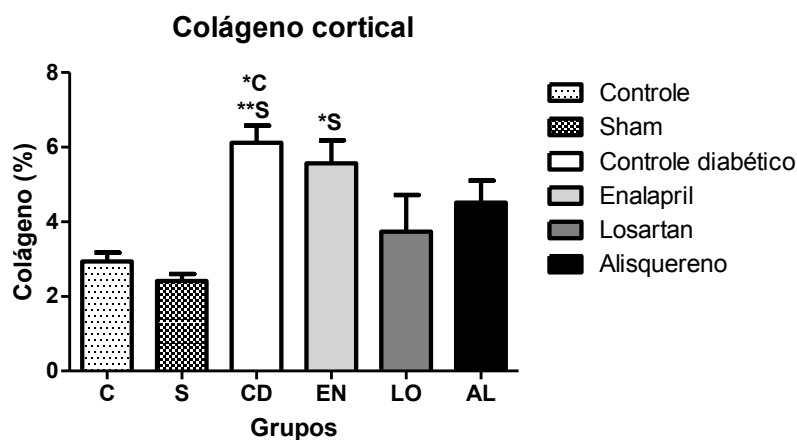
Figura 12 – Corte histológico de rim corado com Picrosirius Red.



Fonte: O Autor (2015).

Fibras colágenas evidenciadas pela coloração avermelhada, o que possibilitou a análise da porcentagem de colágeno ao transformar em imagem binária utilizando o Software Image J (1.4).

Figura 13 - Gráfico da porcentagem de colágeno cortical dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. *C: p<0,05 versus C; **S: p<0,01 versus S; *S: p<0,05 versus S. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Tabela 02 – Valores da relação entre peso do rim e peso do corpo e porcentagem de colágeno cortical dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).

Valores médios	C	S	CD	EM	LO	AL
Relação Peso do Rim/Peso do Corpo	0,003243 ± 0,0001122	0,003303 ± 0,0001599	0,005508 ± 0,0006519	0,006086 ± 0,0005573	0,007054 ± 0,0007440	0,005041 ± 0,0005387
Colágeno Cortical	2,934 ± 0,2435	2,418 ± 0,1870	6,118 ± 0,4609	5,569 ± 0,6164	3,736 ± 0,9788	4,514 ± 0,5858

Fonte: O Autor (2015).

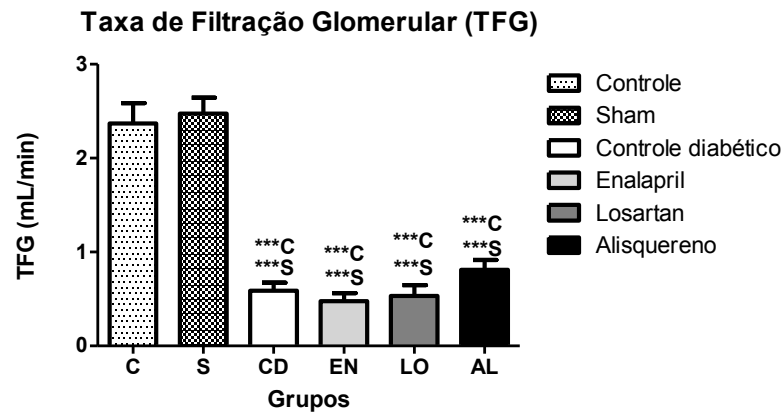
Os valores são expressos como Média ±EPM. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn para Colágeno cortical. Teste de Tukey para Relação Peso do Rim/Peso do Corpo.

4.6 Função Renal

Os animais dos grupos CD, EN, LO e AL apresentaram TFG menor que a dos animais C e S. Apesar de não existir diferenças significativas entre os grupos de diabéticos, percebe-se uma tendência à preservação da função renal nos animais do grupo AL quando comparados aos grupos EN (**Figura 14; Tabela 03**).

A dosagem de EUA mostrou que os animais diabéticos do grupo CD apresentaram maior perda de albumina urinária quando comparados aos dos grupos C e S, assim como os animais do grupo AL (**Figura 15; Tabela 03**). Percebe-se que os tratamentos com EN e LO resultaram em redução da excreção de albumina urinária.

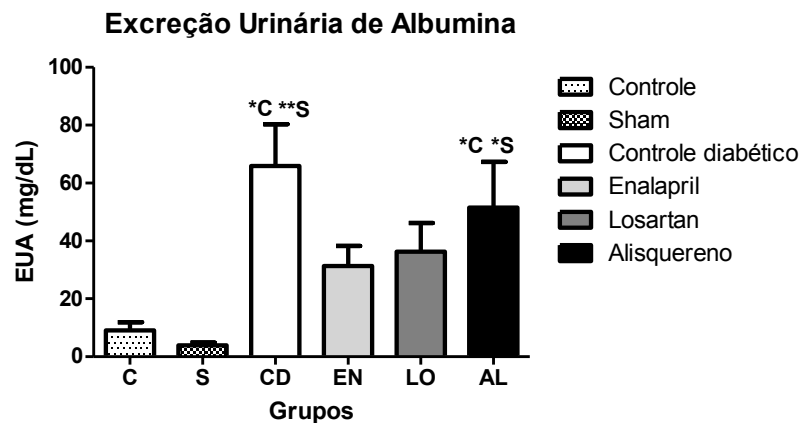
Figura 14 – Gráfico da TFG apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: $p < 0,001$ versus C; ***S: $p < 0,001$ versus S. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 15 – Gráfico da EUA apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média ±EPM. *C: $p < 0,05$ versus C, **S: $p < 0,01$ versus S, *S: $p < 0,05$ versus S. Teste de Tukey.

Tabela 03 – Valores da TFG e EUA apresentada pelos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).

Valores médios	C	S	CD	EN	LO	AL
Taxa de Filtração Glomerular(mL/min)	2,368 ± 0,2173	2,473± 0,1701	0,5880 ^{***C***S} ± 0,08476	0,4759 ^{***C***S} ± 0,08569	0,5306 ^{***C} ^{***S} ± 0,1173	0,8122 ^{***C***S} ± 0,1039
Excreção Urinária de Albumina	9,067 ± 2,828	3,850 ± 0,9262	65,90 ^{*C***S} ± 14,46	31,25 ± 7,071	36,30 ± 9,891	51,50 ^{*C*S} ± 15,80

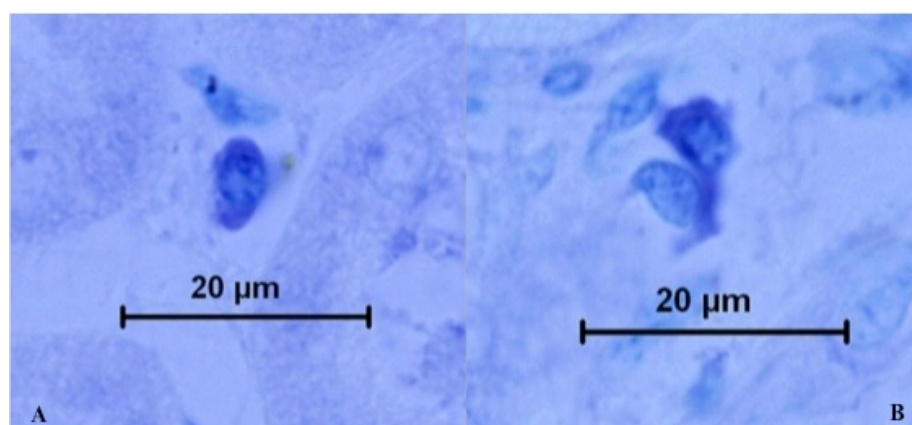
Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média ±EPM. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn para Taxa de Filtração Glomerular. Teste de Tukey para Excreção Urinária de Albumina.

4.7 Quantificação de Mastócitos

A coloração das lâminas de tecido renal com Azul de Toluidina permitiu a quantificação de mastócitos íntegros e degranulados (**Figura 16**) presentes no rim dos animais estudados. Ao analisar a quantificação de mastócitos (íntegros, degranulados e totais) por área de secção renal, nota-se considerável aumento destas células nos grupos de animais diabéticos (CD, EN e LO) quando comparados aos grupos C e S. Comparando o grupo AL aos outros grupos diabéticos (CD, EN e LO) observa-se significativa diminuição de mastócitos íntegros, degranulados e totais, aproximando-o dos animais não diabéticos (C e S) (**Figuras 17, 18 e 19; Tabela 04**).

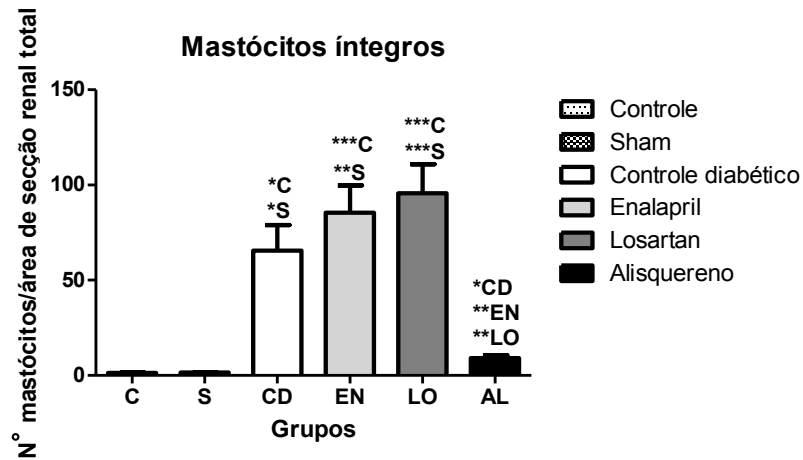
Figura 16 – Corte histológico de rim corado com Azul de Toluidina.



Fonte: O Autor (2015).

A: Mastócito íntegro presente no interstício renal. **B:** Mastócito desgranulado presente no interstício renal. Imagens de microscópio de luz, aumento 1000x. Note a característica metacromática dos grânulos desta célula.

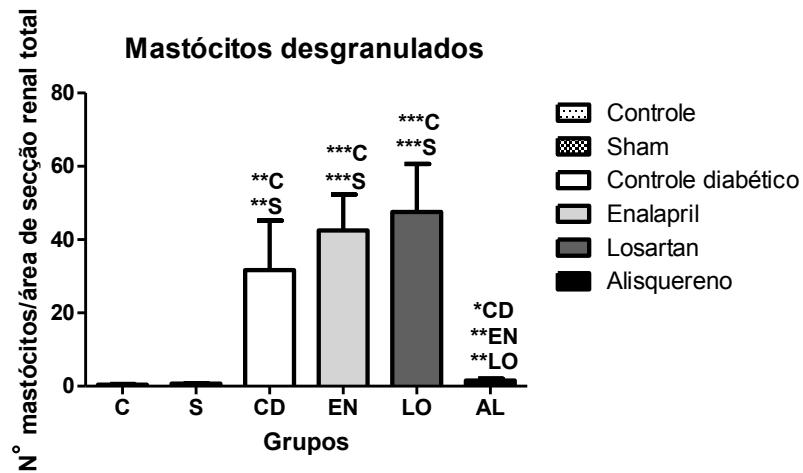
Figura 17 - Gráfico da quantificação de mastócitos íntegros por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: $p < 0,001$ versus C; *C: $p < 0,005$ versus C; ***S: $p < 0,001$ versus S; **S: $p < 0,01$ versus S; *S: $p < 0,05$ versus S; **EN: $p < 0,01$ versus EN; **LO: $p < 0,01$ versus LO; *CD: $p < 0,05$ versus CD. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

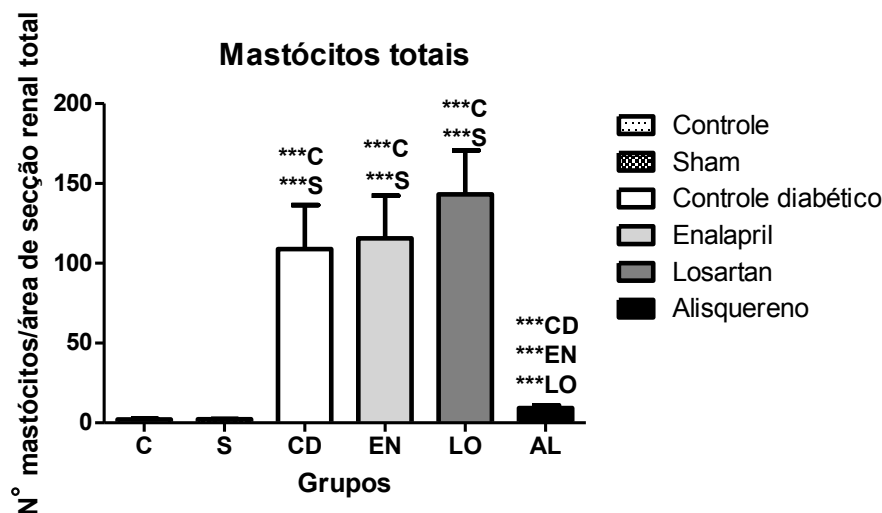
Figura 18 - Gráfico da quantificação de mastócitos degranulados por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015)

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: $p < 0,001$ versus C; **C: $p < 0,01$ versus C; *C: $p < 0,05$ versus C; ***S: $p < 0,001$ versus S; **S: $p < 0,01$ versus S; *CD: $p < 0,05$ versus CD; **EN: $p < 0,01$ versus EN; **LO: $p < 0,01$ versus LO;. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Figura 19 - Gráfico da quantificação de mastócitos totais por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).



Fonte: O Autor (2015)

Os valores são expressos como Média±EPM. ***C: p<0,001 versus C; ***S: p<0,001 versus S; ***CD: p<0,001 versus CD; ***EN: p<0,001 versus EN; ***LO: p<0,001 versus LO;. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

Tabela 04 – Tabela da quantificação de mastócitos íntegros, degranulados e totais por área de secção renal total dos animais dos grupos C (controle); S (Sham); CD (controle diabético); EN (enalapril), LO (losartan) e AL (alisquereno).

Valores médios	C	S	CD	EN	LO	AL
Mastócitos Íntegros por Área de Secção Renal	1,282 ± 0,2381	1,550 ± 0,1597	65,50 ^{*C *S} ± 13,44	85,48 ^{***C **S} ± 14,40	95,64 ^{***C ***S} ± 15,36	9,020 ^{*CD **EN **LO} ± 1,578
Mastócitos Degranulados por Área de Secção Renal	0,4515 ± 0,1171	0,6794 ± 0,05874	31,70 ^{**C ***S} ± 13,47	42,49 ^{***C ***S} ± 9,791	47,58 ^{***C ***S} ± 13,03	1,576 ^{*CD **EN **LO} ± 0,4867
Mastócitos Totais por Área de Secção Renal	2,059±0,5564	2,2330±0,1869	109,0±27,43 ^{***C} ***S	115,60±26,75 ^{***C} ***S	143,2±27,60 ^{***C} ***S	9,199±1,767 ^{***C} ***EN ***LO

Fonte: O Autor (2015).

Os valores são expressos como Média±EPM. Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

5 DISCUSSÃO

Apesar de inúmeros trabalhos na literatura utilizarem a estreptozotocina (STZ) como indutor de DM1, neste estudo optou-se pela aloxana, droga que promove a destruição das células beta pancreáticas, constituindo-se um modelo de indução bastante satisfatório (sucesso de 90%) que resultou em níveis glicêmicos maiores que 400mg/dL, permitindo a instalação de uma lesão renal diabética inicial.

Além da hiperglicemia, foram constatadas poliúria, polidipsia e perda de peso (embora não-quantificadas), que são sinais clássicos do quadro de DM. Em relação ao débito urinário, notou-se que todos os grupos de animais diabéticos (CD, EN, LO e AL) apresentaram aumento considerável neste parâmetro quando comparados aos animais não-diabéticos. Quanto aos grupos C e S, vale ressaltar que não houve diferenças significativas entre eles, para cada um dos parâmetros analisados, evidenciando que as alterações encontradas foram decorrentes do próprio quadro de diabetes e dos respectivos tratamentos e não do estresse possivelmente causado pela manipulação dos animais.

Dados da literatura asseguram que a glomerulopatia diabética é caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC), síntese de membrana basal glomerular (MBG) e matriz mesangial, particularmente colágeno, também significativamente aumentado (BROWNLEE, SPIRO, 1979). Neste estudo, avaliando-se a porcentagem de colágeno em todo o córtex renal, e não somente glomerular, foi constatado que os animais diabéticos dos grupos CD e EN, apresentaram maior expressão de colágeno que os animais não-diabéticos dos grupos C e S, enquanto que nos grupos LO e AL esta porcentagem foi menor, reforçando assim, a instalação da lesão através da substituição do parênquima renal por tecido cicatricial. Alguns trabalhos mostraram ainda, que além do aumento da síntese de colágeno, existem evidências da redução de sua degradação (ZIYADEH et al., 2000), o que poderia resultar em aumento do diâmetro glomerular.

A área do tufo glomerular e espaço capsular foram maiores nos animais diabéticos quando comparados aos animais C e S. O tratamento com EN foi responsável por conter esse aumento em comparação tanto ao grupo CD quanto ao grupo AL. Provavelmente a reduzida produção de Ang II, resultante da inibição de ECA, deve ter restringido a expansão do tufo glomerular, uma vez que estudos com cultura de células mesangiais constataram que a alta concentração de glicose estimulou a atividade de renina intracelular e a geração de Ang II, promovendo o crescimento celular, proliferação da MEC e inibindo a sua degradação (VIDOTTI et al., 2004), o que resultaria em aumento não só do tufo glomerular em si, mas do

corpúsculo renal como um todo. Além disso, a inibição da ECA foi mais efetiva que o antagonismo de receptores AT 1 e a inibição direta de renina para este parâmetro. Tem sido sugerido que alterações hipertróficas presentes em rins diabéticos possam preceder as alterações funcionais. Alguns autores atribuem essas alterações hipertróficas ao estímulo aumentado de fatores de crescimento como IGF (BACH et al., 2000). Apesar do EN ter contido a expansão corpuscular renal, ele não foi efetivo em reduzir a porcentagem de colágeno cortical, ou seja, a droga em questão pode ter minimizado o conteúdo glomerular de colágeno, mas não o fez em outras regiões renais.

As hipertrofias renal e glomerular são alterações frequentemente observadas em fases iniciais do DM (WOLF; ZIYADEH, 1999). Pode-se observar, inclusive, que os animais diabéticos, com exceção do grupo AL, apresentaram maior relação entre o peso do rim e o peso do corpo quando comparados aos não-diabéticos, caracterizando a hipertrofia renal. Vale lembrar que os grupos CD e EN também apresentaram a maior porcentagem de colágeno cortical.

SHAO e colaboradores (2008) utilizando modelo de animais diabéticos induzidos por STZ verificaram que a administração crônica de Ang (1-7) resultou em aceleração da progressão da ND, embora esta substância tenha sido relacionada a efeitos opostos aos mediados pela Ang II. A ativação da via não-clássica do SRA poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento de colágeno cortical e consequente prejuízo da função renal dos animais diabéticos mesmo após o bloqueio do SRAA com as drogas iECA e BRA.

A integridade da barreira de filtração depende das três camadas que a compõe: o endotélio vascular, a MBG e a camada de podócitos. O diafragma podocitário é a estrutura mais complexa e parece ter o papel mais importante na filtração glomerular (HARALDSSON, NISTROM, DEEN, 2008). Com relação à espessura da membrana basal, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados, mostrando que o diabetes e os tratamentos não interferiram neste parâmetro, nas condições desse estudo e no tempo de diabetes a que os animais foram expostos. Sabe-se que o glicosaminoglicano, componente não-colágeno da MBG, contribui com 90% do total de carboidratos desta membrana. O principal glicosaminoglicano é o sulfato de heparan, que juntamente com o ácido siálico, contribui para a eletronegatividade da parede do capilar glomerular e consequentemente para a seletividade da barreira de filtração dependente da carga (KANWAR et al., 1983). Em estudos de DM1 humano e experimental foi constatada menor síntese de sulfato de heparan e no conteúdo de glicosaminoglicano total, tanto no glomérulo quanto na MBG, além de redução do ácido siálico, alterações que ocorrem em paralelo ao aumento de colágeno na MBG

(SHIMOMURA, SPIRO, 1987). No entanto, as alterações na síntese e/ou degradação de componentes da membrana basal, neste modelo, podem não ter resultado em modificações na sua espessura até o estágio da doença analisado.

Sabe-se que os podócitos constituem alvo importante de lesão mediada pela Ang II e que a perda podocitária está presente em muitas glomerulopatias, como é o caso da ND (CAMPBELL, RAIJ, MUNDEL, 2011). No entanto, alterações em qualquer um dos componentes da barreira glomerular pode originar proteinúria glomerular, fazendo com que haja uma maior passagem de albumina e proteínas de alto peso molecular através da barreira de filtração (D'AMICO, BAZZI, 2003). De fato, constatou-se que a EUA estava aumentada nos grupos diabéticos, principalmente em CD e AL, quando comparados aos não-diabéticos, enquanto que o EN e LO reduziram esta perda. O efeito antiproteinúrico de iECA e BRA, os fazem drogas de primeira escolha para pacientes hipertensos, diabéticos com ND, promovendo a redução da proteinúria e prevenindo a progressão da nefropatia (KEANE & LYLE, 2003; HOOGWERF, 2010; SHLIPAK, 2010; KOBORI et al., 2013).

No entanto, de acordo com a literatura, a aldosterona pode produzir lesão renal através de efeitos hemodinâmicos como a vasoconstrição, e não hemodinâmicos como a disfunção endotelial e aumento de fatores pró-ateroscleróticos. Um fator que pode limitar o efeito benéfico dos fármacos IECA e BRA é o “escape de aldosterona”, caracterizado pelo aumento deste mineralocorticoide após o uso contínuo de bloqueadores do SRAA por dois ou três meses. Com o objetivo de se opor a este mecanismo, há os antagonistas de aldosterona, como a Espironolactona e a Epleronona (SCHJOEDT, 2011). Em revisão sistemática da literatura, SAPUNAR et al., (2013) relatam que a Espironolactona mostra-se eficiente diminuindo a albuminúria em pacientes diabéticos, no entanto, em relação à função renal, este fármaco não apresenta efeitos protetores, e sim, leve diminuição na função renal. Enquanto que a Epleronona não apresenta resultados conclusivos para nenhuma destas variáveis. De qualquer maneira, os inibidores de aldosterona não foram utilizados nesse estudo.

Verificou-se também que os animais diabéticos dos grupos CD, EN, LO e AL apresentaram TFG menor que a dos animais C e S, mostrando que o quadro de DM comprometeu a função renal desses animais. A hipertrofia e hiperfiltração glomerulares, já comentadas, além do aumentado Fluxo Plasmático Renal, são eventos relatados nos estágios iniciais do DM em humanos e, logo após a indução, em animais experimentais (VORA, ANDERSON, BRENNER, 1994; WOLF, ZIYADEH, 1999). Apesar disso, o aumento da pressão intraglomerular, pelo estresse mecânico, pode danificar o endotélio, alterar a estrutura normal da barreira de filtração e, eventualmente, resultar em aumento da MEC. Há evidências

de que essas alterações glomerulares estejam envolvidas no desenvolvimento e progressão da ND (ZATZ et al., 1985; ZATZ et al., 1986), que resulta em perda progressiva de função renal. Neste estudo, a TFG foi verificada 90 dias após a indução do DM e, provavelmente, devido ao tempo da doença, encontrava-se em fase de declínio.

Embora, não tenham sido identificadas diferenças significativas entre os grupos de diabéticos, percebeu-se uma tendência a preservação de função renal nos animais do grupo AL quando comparados aos demais grupos diabéticos. Os fármacos que atuam no SRAA têm mais efeitos benéficos sobre a função renal de pacientes com DM do que outros anti-hipertensivos (BARNETT, 2004). Em estudo recente, avaliou-se a classe dos inibidores diretos de renina, como o alisquereno, no tratamento da ND, cujo uso associado com BRA, foi responsável por uma maior redução da albuminúria do que o uso isolado desses medicamentos em pacientes com DM (PARVING et al., 2008). Entretanto, foi observado que a associação de alisquereno com losartan aparentemente possui um efeito antiproteinúrico benéfico semelhante nos diversos estágios de doença renal, porém com maior hipercalemia quando a TFG é < 60 ml/ min (BODDANA et al., 2009; PERSSON et al., 2010). Aliás, um dos efeitos colaterais do tratamento com alisquereno encontrado neste estudo foi a tendência a hipercalemia, quando comparado as outras drogas. Além disso, todos os animais diabéticos apresentaram aumento de uréia plasmática, quando comparados aos não-diabéticos, reforçando o comprometimento renal nesses animais. Também foram realizadas as dosagens plasmáticas de sódio, para as quais não houve alterações significativas entre os grupos estudados.

Os dados obtidos com o tratamento com LO sugerem que a estimulação de receptores AT1 participa, ao menos parcialmente, da instalação das alterações renais relacionadas ao diabetes (no aumento da área do corpúsculo renal, tufo glomerular e EUA). Contudo, o tratamento com AL não reverteu as alterações associadas ao diabetes, o que contrasta com a sugestão anterior da participação de receptores AT1. Essa discrepância pode ser resultado de uma inibição incompleta da renina, de maneira que haja quantidades suficientes de AI disponíveis para geração de Ang II, a qual induziria os efeitos deletérios via estimulação de AT1. Corroborando com essa hipótese, os efeitos do AL sobre a TFG evidenciaram uma tendência em aumentar esse parâmetro (ou minimizar a perda de função), o que pode ser explicado pela ação vasoconstritora preferencial da Ang II na arteríola eferente, aumentando assim o gradiente de pressão e a TFG. De fato, esperar-se-ia que tratamentos que diminuíssem a estimulação de AT1 e/ou a geração de Ang II causassem redução da TFG, como observado

após o tratamento com o LO e EN. Cabe salientar que essa hipótese, apesar de explicar o conjunto de dados, ainda permanece por ser testada.

Com relação a quantificação de mastócitos no parênquima renal, observou-se que tanto células íntegras quanto degranuladas e totais, por área de secção renal, estavam aumentadas nos animais diabéticos (CD, EN e LO) quando comparados aos animais dos grupos C e S, o que evidencia uma possível atuação destas células na fisiopatogenia da ND, provavelmente através de um processo inflamatório local e desenvolvimento de fibrose. No entanto, os animais diabéticos do grupo AL apresentaram número de mastócitos íntegros, degranulados e totais mais próximo ao dos grupos C e S. Estas evidências sugerem uma possível influência do tratamento com alisquereno no padrão inflamatório da ND e, possivelmente, melhor prognóstico no que tange à participação dos mastócitos no desenvolvimento desta patologia.

ZHENG et al., (2012) avaliaram oitenta pacientes em diferentes estágios da ND e verificaram que, com a progressão da doença, ocorre um aumento do número de mastócitos e do nível de degranulação dessas células. Esses achados estavam significativamente correlacionados com a injúria tubulointersticial. Os autores verificaram ainda a expressão imuno-histoquímica de triptase, quimase, renina, TGF- β 1 e TNF- α , mediadores inflamatórios liberados por mastócitos degranulados, sugerindo que tais células poderiam promover inflamação renal e fibrose, e assim, contribuir para o quadro de ND.

Células mesangiais e de músculo liso das arteríolas glomerulares expressam receptores para renina (NGUYEN et al., 2002). A ligação da renina a seus receptores desencadeia ativação de MAP quinases (ERK1 e ERK2) que culmina, dentre outras coisas, com aumentos na síntese de TGF- β 1 (fator de transformação do crescimento- β 1) e de colágeno (HUANG et al., 2006). É importante ressaltar que ambos os efeitos são independentes da formação de Ang II (Huang et al., 2006), sugerindo, portanto, uma ação direta da renina, via receptor de renina, na deposição de fibras de colágeno na MEC, bem como na produção renal de TGF- β 1. Ainda, a literatura relata que o TGF- β 1 é um dos mais potentes quimioatratadores para mastócitos (GRUBER; MARCHESE; KEW; 1994). Apesar do tratamento com alisquereno não ser capaz de bloquear a ativação da via das MAP quinases (FELDT et al., 2008) induzida por renina, o mesmo se mostrou efetivo em reverter completamente o aumento na expressão de TGF- β 1 em animais que superexpressam renina (KAVVADAS et al., 2013). Dessa forma, alterações nos níveis de TGF- β 1 induzidas pelo tratamento com alisquereno poderiam explicar a diminuição na densidade mastocitária associada a esse inibidor de renina, bem como parte de seu efeito antifibrótico. O fato da Ang II ser capaz de inibir a síntese e secreção de renina pelo aparelho justaglomerular, via estimulação de receptores AT1 (KURTZ; WAGNER; 1999), poderia

explicar o porquê do tratamento com LO não ter sido associado com diminuições na densidade mastocitária. De fato, o bloqueio de receptores AT1 presumivelmente elevaria os níveis de renina, a qual induziria maior liberação de TGF- β 1 pelos rins mantendo a quimiotaxia mastocitária, a despeito dos efeitos benéfico do tratamento com LO na ND. O mesmo raciocínio pode ser utilizado para o tratamento com o iECA.

A hipótese para explicar os efeitos do tratamento com AL sobre a densidade mastocitária pode parecer contraditória àquela aventada para TFG, contudo cabe ressaltar que a mesma considera efeitos independentes de receptores AT1 e da formação de Ang II para ativação mastocitária, representando fenômenos distintos, isto é, formação de TGF-beta 1, de forma AT1 independente.

Ainda há poucas evidências científicas sobre a função dos mastócitos na doença renal, porém alguns estudos sugerem uma possível atuação fibrótica destas células. Em estudo experimental com ratos, após nefrectomia 5/6, mastócitos foram localizados predominantemente nas regiões de fibrose peritubular, correlacionando-se positivamente com fibrose intersticial e negativamente com a função renal dos animais estudados (RANGAN, 2003; HARM PETER, 2007).

6 CONCLUSÃO

Constatou-se que o tratamento com bloqueadores do SRAA reduz (AL) o número de mastócitos no parênquima renal de animais diabéticos, sugerindo que estas células possam estar envolvidas na fisiopatologia da ND. Além disso, preserva, ao menos parcialmente, a função renal (AL) e diminui a EUA (EN e LO), possivelmente por minimizarem determinadas mudanças estruturais glomerulares induzidas pelo diabetes, como área de corpúsculo renal e área de tufo glomerular (EN).

Com relação aos demais parâmetros analisados, espessura da membrana basal, área do espaço capsular e porcentagem de colágeno cortical, não foram observadas diferenças.

REFERÊNCIAS

American Diabetes Association (ADA). **Classification and Diagnosis of diabetes.** Diabetes Care, New York, v. 38, supplement 1, p. S8-S16, 2015.

ATLAS, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, Alexandria, v. 13, n. 8, supplement, p. S9-S20, 2007.

BACH, L.A.; DEAN, R.; YOUSSEF, S. COOPER, M.E. Aminoguanidine ameliorates changes in the IGF system in experimental diabetic nephropathy. *Nephrology Dial and Transplantation*. 15:347-354, 2000.

BARNETT, A.H.; BAIN, S.C.; BOUTER, P.; KARLBERG, B.; MADSBAD, S.; JERVELL, J. et al. Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. **N Engl J Med**. Nov 4;351(19):1952-61, 2004.

BODDANA, P.; CASKEY, M. F.; CASULA, M. A.; ANSELL, D. UK Renal Registry 11th Annual Report (December 2008): Chapter 14 UK Renal Registry and international comparisons. **Nephron Clin Pract.**;111 Suppl 1:c269-76, 2009.

BROWLEE, M.; SPIRO, MG. Glomerular basement membrane metabolism in the diabetic rats. *In vivo* studies. **Diabetes**. 28: 121-125, 1979.

CAMPBELL, K.N.; RAIJ, L.; MUNDEL, P. Role of angiotensin II in the development of nephropathy and podocytopathy of diabetes. **Curr Diabetes Rev**. 7(1):3-7, 2011.

CHAPPELL, M,C. The Non-Classical Renin-Angiotensin System and Renal Function. **Compr Physiol**. 2(4): 2733–2752, 2012.

CHRISTINA, J. et.al. Cardiac mast cell–derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. **J. Clin. Invest**. 116:1063–1070 (2006). doi:10.1172/JCI25713.

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

D'AMICO, G.; BAZZI, C. Pathophysiology of proteinuria. **Kidney Int**. 63(3):809-25, 2003.

DURVASULA, R.V., Shankland, S.J. Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. 2008; 294: F830-F839.

FELDT, S.; BATENBURG, W.W.; et al. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase ½ activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. **Hypertension**. Mar;51(3):682-8, 2008.

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

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

GRUBER, B.L.; MARCHESE, M.J.; KEW, R.R. Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. **J Immunol**. Jun 15;152(12):5860-7, 1994.

HARALDSSON, B.; NYSTRÖM, J.; DEEN, W.M. Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. **Physiological Reviews**. 88(2):451-87, 2008.

HARM, P.; THOMAS U. Mast cells and the power of local RAS activation. **Nephrol Dial Transplant** (2007) 22: 40–42 doi:10.1093/ndt/gfl544.

HIROMURA, K.; KUROSAWA, M.; YANO, S.; et al. Tubulointerstitial mast cell infiltration in glomerulonephritis. **Am J Kidney Dis** 32:593–599. (1998) doi:10. 1016/S0272-6386(98)70022-8

HOOGWERF, B.J. Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. **The American Journal of Cardiology**, New York, v.105,n.1, supplement, p.30A-35A, 2010.

HUANG, Y.; et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. **Kidney Int**. Jan;69(1):105-13, 2006.

KURTZ, A.; WAGNER, C. Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. **J Am Soc Nephrol**. Jan;10 Suppl 11:S162-8, 1999.

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

KANWAR, Y.S.; ROSENZWEIG, L.J.; LINKER, A.; JAKUBOWSKI, M.L. Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: biochemical and autoradiographic evidence. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 80(8):2272-5, 1983.

KAVVADAS, P.; WEIS, L.; et al. Renin inhibition reverses renal disease in transgenic mice by shifting the balance between profibrotic and antifibrotic agents. **Hypertension**. Apr;61(4):901-7, 2013.

KEANE, W.F.; LYLE, P.A. Recent advances in management of type 2 diabetes and nephropathy: Lessons from the RENAAL study. **American Journal of Kidney Diseases**, Philadelphia, v. 41, n.3, supplement, p. S22-S25, 2003.

KOBORI, H. et al. Angiotensin II blockade and renal protection. **Current Pharmaceutical Design**, Schipol, v.19, n.17, p.3033-3042, 2013.

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

NGUYEN, G.; DELARUE, F.; et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. **J Clin Invest.** Jun;109(11):1417-27, 2002.

O'DONNELL, M.P, et al. (1998). Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. **FJ Reviews.** 1998; 2: 2339-2347.

PARVING, H.H. et al. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.358, n.23, p. 2433-2446, 2008.

PATEL, S. D.; BRENNAN, G.; BRAZIN, J.; CIARDIELLO, A. J.; SILVER, R. B.; VANNUCCI, S. J. Mast Cell Isolation from the Immature Rat Brain. **Developmental Neurosci**, New York, v. 35, n. 2-3, p.1-8, mar. 2013.

PERSSON, F.; LEWIS, J.B.; LEWIS, E.J.; ROSSING, P.; HOLLENBERG, N.K.; PARVING, H.H. Impact of baseline renal function on the efficacy and safety of aliskiren added to losartan in patients with type 2 diabetes and nephropathy. **Diabetes Care.** Nov;33(11):2304-9, 2010.

RANGAN, G.K.; HARRIS, D.C.; A blast from the mast? **Kidney Int** 2003; 64: 1134–1135.

RAVID, M.; LANG, R.; RACHMANI, R.; LISHNER, M. Long-term renoprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin dependent diabetes mellitus. **Arch Intern Med.** 156: 286-9, 1996.

RIELLA, M.C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos.** Rio de Janeiro: 4^a.ed, Guanabara Koogan, 2002.

RUGER, B.M.; HASAN, Q.; GREENHILL, N.S.; et al. Mast cells and type VIII collagen in human diabetic nephropathy. **Diabetologia** (1996). 39:1215–1222. doi:10. 1007/BF02658509.

SAPUNAR, Jorge et al. Efecto de los antagonistas de aldosterona en nefropatía diabética. Revisión sistemática de la literatura. **Endocrinología y Diabetes**, p. 99, 2013.

SCHJOEDT, K. T. The rennin-angiotensin-aldosterone system and its blockade in diabetic nephropathy. **Dan Med Bull**, v. 58, n. 4, p. B4265, 2011.

SHAO, Y.; HE, M.; ZHOU, Li.; YAO, T.; HUANG, Yu.; LU, LI-MIM. Chronic angiotensin (1-7) injection accelerates STZ-induced diabetic renal injury. **Acta Pharmacol Sin.** Jul; 29 (7): 829–837, 2008.

SHIMOMURA, H.; SPIRO, R.G. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. **Diabetes.** 36(3):374-81, 1987.

SHLIPAK, M. Diabetes nephropathy: preventing progression. **Clinical Evidence**, p. 1-18, 2010.

TOTH, T.; TOTH-JAKATICS, R.; JIMI, S.; et al. Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis. **Am Soc Nephrol**. 10:1498–1505, 1999.

VIDOTTI, D.B. et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, Bethesda, v. 286, p. F1039- F1045, 2004.

VORA, J.P.; ANDERSON, S.; BRENNER, BM. Pathogenesis of diabetic glomerulopathy: the role of glomerular hemodynamic factors. In: Mogensen CE, ed. **The kidney and hypertension in diabetes mellitus**. 2nd edition. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p 223-232, 1994.

WELKER, P.; KRAMER, S.; GRONEBERG, D.A.; et al. Increased mast cell number in human hypertensive nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol** (2008). 295:F1103–F1109. doi:10.1152/ajprenal.00374, 2007.

WOLF, G.; ZIYADEH, FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. **Kidney International**. 56: 393-405, 1999.

ZATZ, R.; DUNN, B.R.; MEYER, T.W.; ANDERSEN, S.; RENNKE, H.G.; BRENNER, B.M. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. **J Clin Invest**. 77: 1925-30, 1986.

ZATZ, R.; DUNN, B.R.; MEYER, T.W.; ANDERSEN, S.; RENNKE, H.G.; BRENNER, B.M. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. **J Clin Invest**. 77: 1925-30, 1986.

ZATZ, R. **Série Fisiopatologia Clínica – Fisiologia Renal**, São Paulo: Editora Atheneu, vol.2, 2000.

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** (2012) 55:801–811. DOI 10.1007/s00125-011-2391-2.

ZIYADEH, F.N. Different roles for TGF-beta and VEGF in the pathogenesis of the cardinal features of diabetic nephropathy. **Diabetes Research and Clinical Practice**. Amsterdam, v.82, supplement, s38-s41, 1999.

ZIYADEH, F.N.; et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 97(14):8015-20, 2000.