

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

PÂMELA HENRIQUE SILVA

**MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS E DOENÇA RENAL
ASSOCIADOS EM CAMUNDONGOS**

CAMPO GRANDE
2022

PÂMELA HENRIQUE SILVA

**MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS E DOENÇA RENAL
ASSOCIADOS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Modelo Animal de Doença.

Orientador: Prof. Dr. Josivaldo Godoy da Silva

CAMPO GRANDE
2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

PÂMELA HENRIQUE SILVA

MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS E DOENÇA RENAL ASSOCIADOS EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Modelo Animal de Doença.

Orientador: Prof. Dr. Josivaldo Godoy da Silva

Banca examinadora:

Nota/Conceito

AVALIAÇÃO FINAL: () Aprovada

() Reprovada

Dedico este trabalho de pesquisa primeiramente à Deus e Nossa Senhora Aparecida, que me capacitaram e me deram sabedoria para cumprir minha meta.

Em segundo lugar, à minha família, sobretudo, meus pais e minha irmã, por terem sido meus exemplos, incentivo para seguir em frente e nunca desistir, mesmo durante os momentos mais difíceis.

Ao meu orientador por todo apoio, ensinamento, ajuda e por toda confiança depositada.

AGRADECIMENTOS

Primordialmente à Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela vida, por permitir que meus sonhos sejam moldados, à sua maneira, por todas as oportunidades que me foram concedidas, por todas as pessoas que colocastes em meu caminho, por me permitirem aprender com meus próprios erros, por todas as oportunidades e graças concedidas.

À minha irmã, Patrícia Henrique Silva, por sempre acreditar em mim, e nunca me deixar desistir, por todas as vezes que me ajudou e ajuda inúmeras vezes, por todo apoio e confiança, por viver comigo meus sonhos, acreditar que são possíveis e sempre estar comigo, sem você eu não conseguiria e nada disso seria possível. Sou eternamente grata a ti.

Aos meus pais, João Henrique da Silva e Maria Aparecida da Silva, que sempre me apoiaram e me incentivaram, sempre acreditaram em mim e sempre estavam ao meu lado me apoiando e me mostrando que há tempo para tudo, que tudo ocorre no momento certo. Não tenho palavras para expressar minha gratidão e o quanto amo vocês. Sou eternamente grata, obrigada.

Aos meus avós, tios, tias e primos, que sempre torceram e torcem por mim, comemorando comigo cada passo, me apoiando em cada processo. Obrigada por existirem e estarem comigo sempre.

Ao meu orientador Professor Doutor Josivaldo Godoy da Silva por todo apoio e ajuda durante esta jornada. Obrigada.

À minha querida Professora Doutora Iandara Schettert Silva, por toda confiança e apoio, por toda dedicação durante toda esta jornada, por todo incentivo e por me mostrar o caminho a se percorrer. Obrigada por todo ensinamento.

Ao Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, através de seus professores e funcionários, que possibilitaram a realização deste sonho.

Ao apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, oferecido pelos órgãos de Fomento: CAPES e FINEP pela bolsa de mestrado.

“Neste mundo não existe verdade universal. Uma mesma verdade pode apresentar diferentes fisionomias. Tudo depende das decifrações feitas através de nossos prismas intelectuais, filosóficos, culturais e religiosos”.

(Dalai Lama)

RESUMO

SILVA, P. H. **Modelo experimental de diabetes mellitus e doença renal associados em camundongos**. Campo Grande; 2022. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

As doenças crônicas não transmissíveis, como a Diabetes Mellitus (DM), acometem uma parcela importante da população. A DM trata-se de uma desordem metabólica lipoproteica, caracterizada pela hiperglicemia, decorrente da resposta secretória insuficiente ou deficiente do hormônio insulina, sendo ainda uma das principais causas para a Doença Renal (DR). Diante da gravidade das complicações microvasculares causadas pela DM, assim como cardiomiopatia, encefalopatia, retinopatia, neuropatia e nefropatia, justificou-se a realização deste estudo. O objetivo deste estudo foi associar modelos de DM e DR em camundongos. Foram utilizados 64 camundongos (*Mus musculus*), adultos, fêmeas, da linhagem Swiss, pesando em média 20 g, distribuídos em grupos: G1, controle (n=32) e G2, doença associada (n=32). Primeiramente, foram induzidos à estenose arteriovenosa (isquemia, 10 minutos e reperfusão) do rim esquerdo os animais do G2, sendo observados por 14 dias, antes de receberem estreptozotocina (STZ) e dieta. Após esse período foi administrado STZ, na dose de 150 mg/kg, via intraperitoneal, e solução aquosa de glicose (10%), por 24 horas, seguida de dieta hiperlipídica por 7 dias. A evolução da DR foi observada utilizando-se tira teste de análise urinária e da DM por meio da análise de glicemia em monitor digital glicêmico. Foi constatada a isquemia e reperfusão, mediante observação das alterações de coloração, durante a cirurgia, volume e tamanho do rim esquerdo, quando comparado ao rim contralateral. Observou-se alterações renais iniciais em G2, nos primeiros 14 dias, aumento da densidade urinária, alteração do pH, presença de glicose, proteínas e leucócitos, quando comparados ao G1. A DM foi constatada pela presença de hiperglicemia, a partir de 200 mg/dL, no 7º dia da indução. Os animais do G2 apresentaram perda constante de peso, quando comparados ao G1. Foi possível induzir e confirmar DM e DR associados, com baixa mortalidade e fácil execução.

Descritores: Diabetes, nefropatia, estreptozotocina, lesão isquêmica e reperfusão renal.

ABSTRACT

SILVA, P. H. **Experimental model of associated diabetes mellitus and kidney disease in mice**. Campo Grande; 2022. [Dissertation – Federal University of Mato Grosso do Sul].

Chronic non-communicable diseases such as Diabetes Mellitus (DM), affect an important part of the population. DM is a lipoprotein metabolic disorder, characterized by hyperglycemia, resulting from an insufficient or deficient secretory response of the hormone insulin, and is still one of the main causes of Kidney Disease (KD). Given the severity of the microvascular complications caused by DM, as well as, cardiomyopathy, encephalopathy, retinopathy, neuropathy and nephropathy, this study was justified. The aim of this study was to associate the models of DM and KD in mice. Sixty-four adult female mice (*Mus musculus*) of the Swiss strain were used, weighing approximately 20 g, were divided groups: G1, control (n=32) and G2, associated diseases (n=32). First the G2 animals were induced to arteriovenous stenosis (ischemia, 10 minutes and reperfusion) of the left kidney, being observed for 14 days, before receiving streptozotocin (STZ and diet. After this period, STZ was administered at a dose of 150 mg/kg, intraperitoneally, and aqueous glucose solution (10%), for 24 hours, followed by a high-fat diet for 7 days. The evolution of KD was observed using a urine analysis test strip and DM by analyzing blood glucose on a digital glucose monitor. Ischemia and reperfusion were verified by observing changes in color during surgery, volume and size of the left kidney, when compared to the contralateral kidney. Initial renal alterations were observed in G2, in the first 14 days, increased urinary density, pH alteration, presence of glucose, proteins and leukocytes, when compared to G1. DM was confirmed by the presence of hyperglycemia, starting at 200 mg/dL, on the 7th day of induction. G2 animals showed constant weight loss when compared to G1. It was possible to induce and confirm associated DM and KD, with low mortality and easy execution.

Descriptors: Diabetes, nephropathy, streptozotocin, ischemic injury and renal reperfusion.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Figura 1 – Fase de aclimação e acondicionamento dos animais em microisoladores individuais	26
Figura 2 – Distribuição randomizada dos animais em grupos.	27
Figura 3 – Fluxograma experimental da distribuição dos animais para indução da diabetes tipo 1 por estreptozotocina (STZ) e doença renal	28
Figura 4 – Fotografia mostrando os diferentes momentos da indução do modelo renal	29
Figura 5 – Teste para urina de 10 parâmetros Uri-Color Check	30
Figura 6 – Representação da Análise Urinária. Gráfico comparativo entre grupos em uma amostra de 10 animais. Valores expressos em média $\pm$ DP.	34
Figura 7 – Representação dos níveis glicêmicos semanais (mg/dL). Gráfico comparativo entre grupos em quatro tempos (T0, T1, T2 e T3). Valores expressos em média $\pm$ DP	35
Figura 8 – Peso corporal (g). Gráfico comparativo entre grupos em quatro tempos (T0, T1, T2 e T3). Valores expressos em média $\pm$ DP.	36

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Valores dos parâmetros de análise urinária pela fita expressos em média $\pm$ DP, analisados intergrupo e intragrupo em uma amostra de 10 animais.	33
Tabela 2 – Níveis glicêmicos semanais. Valores expressos em média $\pm$ DP.....	34
Tabela 3 – Peso Corporal. Valores expressos em média $\pm$ DP	35

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetros

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBCA – Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos e de Ensino

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DP – Desvio Padrão

DR – Doença Renal

DRC – Doença Renal Crônica

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

ERO's – Espécies Reativas de Oxigênio

FAMED – Faculdade de Medicina

g – Grama

G1 – Grupo Controle sem Doença

G2 – Grupo com Doença

h - Horas

i.p. – Intraperitoneal

I/R – Isquemia e Reperfusão

LMED – Laboratório de Modelos Animais de Doença

LRA – Lesão Renal Aguda

M - Mol

MA – Microalbuminúria

MEC – Matriz Extracelular

mg/dL – Miligrama por decilitro

mg/kg – Miligrama por quilograma

n – Número da amostra

ND – Nefropatia Diabética

pH – Potencial Hidrogeniônico

PR – Pedículo Renal

STZ – Estreptozotocina

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

T0 – Tempo 0

T1 – Tempo 1

T2 – Tempo 2

T3 – Tempo 3

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

°C – Escala Celsius (grau Celsius)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Modelo Animal de Doença	18
2.2 Diabetes Mellitus.....	19
2.3 Nefropatia Diabética	21
2.4 Doença Renal Crônica.....	22
2.5 Isquemia e Reperusão	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4 MÉTODOS	25
4.1 Tipo de Estudo	25
4.2 Amostra	25
4.3 Delineamento	27
4.3.1 Distribuição dos Grupos.....	28
4.4 Procedimentos	28
4.4.1 Cirurgia e indução isquêmica da doença renal.....	28
4.4.2 Indução do diabetes nos animais submetidos a cirurgia de indução isquêmica da doença renal.....	30
4.5 Eutanásia	31
4.6 Análise Estatística	31
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – Artigo submetido para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Autorial)	47
ANEXO B – Artigo submetido para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Segunda Autora)	67
ANEXO C – Confirmação de submissão de Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Autorial).....	80

ANEXO D – Confirmação de submissão de Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Segunda Autora)	81
ANEXO E – Confirmação de aceite de Artigo para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Autorial)	82
ANEXO F – Confirmação de aceite de Artigo para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Segunda Autora)	82
ANEXO G – Confirmação de aceite de Artigo para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira com volume e iss do artigo (Segunda Autora).....	83

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico dos carboidratos, lipídios e proteínas, devido à resposta secretória defeituosa ou insuficiente do hormônio insulina, que resulta em hiperglicemia, hipoinsulinemia, cetoacidose, polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso (CARVALHO *et al.*, 2016).

Dentre as inúmeras complicações do DM, encontram-se alterações microvasculares, cardiomiopatia, encefalopatia, retinopatia, neuropatia e nefropatia. A retinopatia diabética leva a problemas visuais, risco de quedas e cegueira, em últimos casos. Em países subdesenvolvidos, a nefropatia diabética, em grande parte doença glomerular, é reconhecida como uma das principais causas para o surgimento e evolução da doença renal crônica (DRC). Por sua vez, a DRC tem se mostrado uma das maiores causas de morbimortalidade em pacientes diabéticos (ALPERS; HUDKINS, 2011; AZUSHIMA *et al.*, 2018; BURMEISTER *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2016; GLASTRAS *et al.*, 2016; VALENCIA; FLOREZ, 2017).

A hiperglicemia permanente, promove diversas alterações metabólicas, o que, por eventos moleculares específicos e precisos, levam a nefropatia diabética, com alterações morfológicas de origem da síntese do colágeno, levando a complicações de cicatrização (DENADAI *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2008; KARAMI *et al.*, 2020).

A ativação da proteína C quinase, é uma delas, que consequentemente leva à produção do óxido nítrico, promovendo estresse oxidativo, aumentando a formação dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO'S), repercutindo em lesão isquêmica dos tecidos (DENADAI *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2016).

Os modelos experimentais de isquemia renal têm sido descritos com frequência na literatura, em várias espécies e linhagens. São caracterizados de forma morfológica e celular, assim como com testes bioquímicos. A oclusão do pedículo renal causa os maiores níveis de danos histológicos renais, juntamente com a congestão hemorrágica generalizada. A congestão vascular renal e o edema diminuem na reperfusão, mas a lesão epitelial tubular não muda significativamente. Sendo assim, há dano no tecido renal, pela isquemia em associação com suas disfunções hemodinâmicas renais, excretoras e de concentração de urina proporcionalmente desenvolvidas (RAMESH; RANGANATHAN, 2014).

As complicações microvasculares decorrentes do quadro clínico dos pacientes diabéticos, decorrentes da persistência do quadro hiperglicêmico oriundo das diversas alterações metabólicas, as quais tornam-se um grande desafio na vida dos profissionais da saúde, que lidam e fazem uso de diversos recursos terapêuticos, com objetivo de melhorar a

qualidade de vida de seus pacientes, minimizando os danos provocados pelas comorbidades, associado a escassez de estudos a respeito da temática, torna fundamental o desenvolvimento do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelo Animal de Doença

O uso de modelo animal em pesquisas científicas, para estudo de anatomia, fisiologia, patologia e farmacologia animal e humana, tem contribuído fortemente para o desenvolvimento da ciência e biotecnologia ao longo dos anos. Permitindo alavancar e aprimorar estudos a respeito de mecanismos etiológicos e fisiopatológicos das mais diversas doenças, assim como das modalidades terapêuticas que possam ser aplicadas à espécie humana, corroborando para o desenvolvimento de vacinas, antibióticos, dentre outros meios de tratamento (ANDERSEN; WINTER, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2009; ROBINSON *et al.*, 2019; SILVA, 2015).

A relação entre humanos e variadas espécies animais segue-se ao longo da história. Anualmente, milhares de animais são empregados em estudos experimentais, em condições favoráveis às alterações fisiológicas observadas nas doenças em humanos, buscando assim enfatizar e justificar a aplicabilidade e semelhança do modelo animal aos humanos. Historicamente, os animais foram utilizados para o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas notadamente utilizadas até o presente, como a traqueostomia e laparoscopia (CAVALCANTI *et al.*, 2009; FAGUNDES; TAHA, 2004; ROBINSON *et al.*, 2019).

O engajamento das pesquisas envolvendo animais se dá, dentre outros motivos, às limitações na investigação das doenças humanas, as quais envolvem igualmente aspectos éticos, inerentes à própria doença e ainda ao modo de investigação. Uma vez que pesquisas envolvendo seres humanos exigem uma série de requisitos a fim de preservar a integridade física e psicoemocional do indivíduo durante a experimentação e apresentam ainda uma série de limitações, dentre elas, a dificuldade de estabelecer de forma fidedigna resultados sem a interferência dos voluntários (FAGUNDES, TAHA, 2004).

Um bom modelo animal deve apresentar determinadas características para viabilização dos estudos e apresentação de resultados confiáveis, sendo destacadas os seguintes marcos: concessão ao estudo de fenômenos biológicos ou comportamental animal; investigação de processos patológicos, e máxima semelhança e identificação com os quadros clínicos das doenças humanas, além de contar com um grupo controle para acompanhamento. A qualidade sanitária do animal também é muito importante para o pesquisador, devendo respeitar as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (ANDERSEN; WINTER, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2009; ROBINSON *et al.*, 2019).

Outro ponto forte da experimentação animal, em especial com o uso de animais de pequeno porte, como camundongo, rato, hamster, coelhos e coobaia, se dá em vista dos custos, viabilidade, manuseio e facilidade na execução técnica dos procedimentos, principalmente, em condições laboratoriais, infraestrutura disponível e princípios metodológicos científicos, os quais permitem a reprodução científica dos determinantes patológicos (MONTEIRO *et al.*, 2009; SILVA, 2015).

Dos estudos, envolvendo animais, o padrão-ouro de pesquisa clínica é o estudo controlado randomizado, o qual conta com grupos distribuídos de forma aleatório, os quais sofrerão intervenção de acordo com a metodologia pré-estabelecida previamente, respeitando o estado de duplo-cego dos investigadores, evitando conflito de interesses e indução dos resultados (ROBINSON *et al.*, 2019).

No entanto à medida que as pesquisas experimentais crescem, o compromisso com a necessidade de redução, refinamento e até substituição dos animais aumenta proporcionalmente. É importante, não expor os animais à estudos desnecessários. A partir disto, já se inicia nos laboratórios simulação e habilidades cirúrgicas por meio da realidade virtual (ROBINSON *et al.*, 2019).

2.2 Diabetes Mellitus

O DM é um termo global para distúrbios metabólicos díspares, tendo como principal sinal clínico a hiperglicemia crônica. Sendo assim, é reconhecido por uma síndrome metabólica crônica dos carboidratos, lipídios e proteínas, devido à resposta secretória defeituosa ou insuficiente do hormônio insulina ou, geralmente, ambos, resultando desta forma nos seguintes achados clínicos: hiperglicemia, hipoinsulinemia, cetoacidose, polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso (PETERSMANN *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2016).

O DM tipo 1 (DM1) é compreendido como uma forma autoimune dos quadros típicos de diabetes, determinado pela destruição progressiva das células beta pancreáticas, proporcionando uma total deficiência do hormônio insulina. A perda das células betas e de função são fatores também fundamentais para o desenvolvimento do DM tipo 2 (DM2), o qual varia entre um predomínio da relativa deficiência de insulina a um vasto defeito secretório associado à resistência insulínica. Onde o DM2 e os distúrbios renais associados, estão em crescente aumento, impulsionado pelo aumento exponencial da obesidade (GLASTRAS *et al.*, 2016; PETERSMANN *et al.*, 2019).

O Diabetes, reconhecido como doença socioeconômica mundial, é a principal causa para o aparecimento da Doença Renal Crônica (DRC) nos países, em todo o mundo, desde os ocidentais até os de baixa e média renda. Este pode acarretar inúmeras complicações, desde retardo no processo de reparação tecidual decorrente de alterações bioquímicas, assim como cardiomiopatias, encefalopatias, neuropatias e nefropatias. A nefropatia diabética (ND) é a complicação mais importante e a maior causa para o surgimento da DR no mundo, a qual pode ainda levar a óbito os seus portadores (BRAGA *et al.*, 2016; BURMEISTER *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2016; GLASTRAS *et al.*, 2016; PETERSMANN *et al.*, 2019).

Os valores de glicose plasmática característicos de quadro hiperglicêmico nos animais são valores igual ou maior que 200 mg/dL, os quais definem o estado diabético. Já valores entre 80 a 150 mg/dL, são compreendidos como estado não diabético, também denominados níveis glicêmicos normais e, por sua vez, os valores compreendidos de 150 a 199 mg/dL, entende-se como estado pré-diabético. Atualmente, o padrão-ouro para mensuração dos níveis glicêmicos e diagnóstico de diabetes em modelos experimentais, se dá através da mensuração dos níveis de glicose no plasma venoso. Em humanos, de acordo com a Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes entende-se como estado diabético valores acima 125 mg/dL em jejum, considerando um período igual ou superior a 8 horas. Já valores entre 100 a 125 mg/dL compreende-se como quadro pré-diabético, e valores inferiores a 100 mg/dL entende-se como glicose sanguínea normal ou não diabético (COBAS *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2018; PETERSMANN *et al.*, 2019).

Os elevados índices de glicose sanguínea, denominados hiperglicemia, provocam diversas alterações metabólicas, o que afeta a vascularização dos tecidos, estando associado à falência de múltiplos órgãos a longo prazo. A ativação da proteína C quinase aumenta a produção das ERO'S, devido a superprodução de óxido nítrico na cadeia mitocondrial, gerando o estresse oxidativo. Este processo origina então, uma resposta inflamatória, diante do aumento de radicais livres, que repercutem em lesão isquêmica, uma vez que há redução das defesas antioxidantes (DENADAI *et al.*, 2015; PETERSMANN *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2016).

O primeiro estudo datando a descoberta da insulina para o tratamento de DM, ocorreu em 1920, em camundongos geneticamente modificados. A STZ é um composto natural amplamente utilizado para induzir a DM1, através da interrupção seletiva da função das células beta (β) pancreáticas das ilhotas de Langerhans dos animais ou por alquilação intracelular do DNA destas e consequente necrose celular, enquanto em camundongos db/db, geneticamente propensos a diabétes associado a deficiência de leptina, é capaz de produzir neste modelo clássico a DM2. O estresse oxidativo, proteína C quinase e o processo inflamatório estão dentre

os mecanismos com importante papel na patogênese da ND (GLASTRAS *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2021).

Em estudo experimental, He *et al.* (2019), administraram injeção intraperitoneal de estreptozotocina na dose única de 120 mg/kg, em 20 camundongos, sendo que 17 destes animais apresentaram aumento dos níveis glicêmicos, sendo considerados diabéticos e assim adequados para o experimento.

A DRC grave está atrelada a um grande fardo pessoal, visto que o transplante renal e a diálise são as únicas opções em estágios tardios da doença. A terapia de substituição renal é um procedimento de alto custo para a saúde. Diante disto, uma maior compreensão da doença e suas correlações clínicas, pode auxiliar em melhores estratégias diagnósticas e terapêuticas a fim de prevenir e tratar a evolução da DRC (GLASTRAS *et al.*, 2016).

2.3 Nefropatia Diabética

A ND é uma complicação microvascular grave do diabetes, caracterizada por proteinúria e declínio progressivo da função renal, sendo a principal causa de doença renal terminal. As características patológicas da ND envolvem acúmulo de matriz extracelular (MEC) dentro dos glomérulos e túbulo intersticial, morte celular glomerular e tubular, contribuindo para o desenvolvimento de glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial. Níveis elevados de glicose sérica, alterações hemodinâmicas, fatores de crescimento local, distúrbios metabólicos e síntese de hormônios são apontados na patogênese desta complicação (JIANG *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2021; SAMSU, 2021).

Quadros de hiperglicemia e dislipidemia, em diabéticos, geram estresse oxidativo, aumentando os níveis de proteínas pró-inflamatórias devido a infiltração de macrófagos, secretando citocinas inflamatórias, provocando inflamação local e sistêmica, induzindo a nefrite. Diversos estudos têm relacionado que a produção de citocinas pró-inflamatórias e ERO estão intimamente associados ao risco de surgimento da ND. Esta é uma das complicações mais graves do DM, estando associada às altas taxas de morbidade e mortalidade, dentre os principais fatores para seu surgimento destacam-se hiperglicemia, hipertensão obesidade, dislipidemia, idade, tabagismo, gênero e fatores genéticos (JIANG *et al.*, 2021; SAMSU, 2021).

O diagnóstico da ND é incerto, uma vez que não segue um padrão clássico. Um dos maiores problemas enfrentados, está no diagnóstico de ND não associado a retinopatia, que apresenta prevalência 40% dos casos. Habitualmente, a triagem e diagnóstico desta, se dá pela avaliação de albuminúria. Em pacientes portadores de DM1, a prevalência de microalbuminúria

chega a 18%, enquanto no DM2, 7%. Ao ser detectado macro ou microalbuminúria, deve-se investigar a associação de comorbidades, excepcionalmente, retinopatia e doença macrovascular (SAMSU, 2021).

O tratamento da ND ainda é um desafio. O controle rigoroso dos níveis glicêmicos e da pressão arterial, sobretudo dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e dos bloqueadores dos receptores da angiotensina II, são fatores importantes no retardo evolutivo da doença e da regressão da albuminúria. Acredita-se que a redução dos níveis de albuminúria, em indivíduos diabéticos, favoreçam melhores resultados no retardo dos índices de doenças renais e cardiovasculares (JIANG *et al.*, 2021; SAMSU, 2021).

Desta forma a ND é compreendida como uma síndrome clínica, que acomete pacientes com DM, caracterizada pelo declínio da função renal, retinopatia diabética, proteinúria e redução da taxa de filtração glomerular (TFG). Em alguns casos, pode haver comprometimento da função renal sem presença de proteinúria, comum em pacientes com DM e DRC. No entanto, a albuminúria é apontada como o principal causador do declínio da TFG (SAMSU, 2021).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é o principal mediador inflamatório, desse modo, valores elevados deste, podem provocar alterações nos vasos sanguíneos renais e danos nos rins (SAMSU, 2021).

2.4 Doença Renal Crônica

A DRC é uma epidemia, considerada um dos maiores e mais importantes problema de saúde do mundo, associada às altas taxa de morbidade e mortalidade mundial, sendo explicada pelo aumento crescente da prevalência de DM, doenças cardiovasculares e expectativa de vida (TOGOE *et al.*, 2014).

A DRC tem suas características histopatológicas, tipicamente associada à ND, apresentando espessamento mesangial difuso, espessamento da membrana basal glomerular e fibrose tubulointersticial. A obesidade também tem sido vista como importante fator originador e complicador para os quadros renais (GLASTRAS *et al.*, 2016).

A microalbuminúria (MA) tem sido considerada o principal achado diagnóstico indicador de pacientes com DM1 em risco de disfunção renal progressiva. No entanto, ainda há controversas, uma vez que apenas 20% dos pacientes com MA evoluem para proteinúria, muitos reverterem o quadro para normoalbuminúria e, em alguns casos, portadores de DM1 apresentam redução progressiva da função renal, antes ou com o início da MA (MERCHANT *et al.*, 2013).

A avaliação da progressão da insuficiência renal é baseada nos sinais, sintomas e história clínica do paciente. Suas manifestações clínicas são incipientes e silenciosas, podendo ser facilmente confundidas com outras comorbidades, frequentemente observados em exames laboratoriais de rotina, como uréia e creatinina (TOGOE, 2014).

2.5 Isquemia e Reperusão

A lesão por isquemia e reperusão (I/R) pode ser definida como toda alteração em decorrência da privação de oxigênio e nutrientes aos tecidos. Este fenômeno envolve não apenas alterações intracelulares como também uma lesão inflamatória. Estudos em modelos animais tem mostrado que as consequências de I/R, variam de acordo com a duração da mesma, sendo passível de ocorrer alterações bioquímicas e até mesmo necrose (TOGOE, 2014).

Esta lesão é inevitável no transplante renal resultando em lesão renal aguda (LRA), onde por sua vez, sofre agravo em decorrência da presença de ERO'S, infiltração de neutrófilos, peptídeos vasoativos e depleção de adenosina trifosfato (ATP). Deste modo a I/R provoca desequilíbrio na síntese de radicais livres de oxigênio e antioxidante, produzindo inflamação renal. Outro fator importante, é que os hormônios sexuais influenciam diretamente no processo inflamatório (BAREKAT *et al.*, 2018).

Durante a isquemia, há redução do fluxo sanguíneo desuniformemente, notadamente mais intenso na região medular. Este mecanismo, leva ao aumento na produção de ERO'S, provocando redução maior ainda do fluxo sanguíneo medular, levando a lesão endotelial durante a reperusão, seguida de resposta inflamatória da região (BAREKAT *et al.*, 2018; TOGOE, 2014).

Comumente, a LRA é a maior e mais comum complicação da I/R, levando a formação de radicais livres e danos às células tubulares renais. A produção de radicais livres, por sua vez, lesa a via renal por peroxidação de lipídios e proteínas. Em contrapartida, a lesão renal favorece o aumento da cascata inflamatória via liberação de ERO'S, citocinas e ativação de leucócitos (BAREKAT *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Induzir modelo experimental de diabetes mellitus e doença renal associados em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Induzir e confirmar modelo experimental de diabetes mellitus e doença renal associados em animais.
- b) Mensurar os níveis glicêmicos e peso corporal dos animais a fim de verificar a evolução do quadro clínico das doenças.
- c) Analisar a função renal por meio de exame químico urinário.

4 MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

O presente estudo trata-se de uma pesquisa experimental em modelos animais. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) (Protocolo CEUA/UFMS No. 1.065/2019).

4.2 Amostra

Foram utilizados neste estudo 64 camundongos (*Mus musculus*), fêmeas, adultos, da linhagem *Swiss*, pesando, aproximadamente, 20 g, com idade média de 50 dias, provenientes do Biotério Central da UFMS.

O experimento foi realizado no Laboratório de Modelos Animais de Doença (LMED) da Faculdade de Medicina (FAMED) da UFMS. Toda a rotina de limpeza dos ambientes e manutenção dos animais foram realizados e monitorados por uma Médica Veterinária, assim como os procedimentos experimentais realizados. Atendendo aos padrões operacionais estabelecidos pelo Biotério Central, de acordo com a Lei No 11.794, de 8 de outubro de 2008, a Instrução Normativa do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e as Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Uso de Animais para Fins Científicos e de Ensino (DBCA).

O experimento foi desenvolvido com os animais apresentando cerca de 45 a 60 dias de idade. Os animais foram acondicionados em rack ventilado (estante) com microisoladores individuais de policarbonato transparente, medindo 20x23x30 cm (Figura 1). Confeccionado em aço inoxidável AISI 304 e policarbonato, sem portas, com injeção direta de ar nos microisoladores através de válvulas de aço inoxidável que possuem fechamento automático. O equipamento possui ductos para retirada de odores e sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar, proporcionando assim baixo índice de infecções, eliminando odores provenientes de excreções como urina e fezes, e diminuindo o volume de ruídos que possam estressar os animais, assim proporcionando uma melhor qualidade de bem-estar ao animal, aumentando a qualidade da pesquisa e do padrão sanitário e diminuindo ainda o estresse causado ao animal que ainda será submetido à procedimentos.

Figura 1 – Fase de aclimação e acondicionamento dos animais em microisoladores individuais



Fonte: Próprio autor.

Os animais foram mantidos, durante todo o experimento, em sala climatizada com condições ambientais controladas de temperatura, ciclo claro/escuro e umidade, com uso de exaustores e ares-condicionados, respeitando o ciclo diário dos roedores, ou seja, 12 horas/dia e 12 horas/noite. Eles foram alimentados com dieta comercial balanceada de CR-1 Nuvital/Nuvilab®, específico para a espécie, e acesso a água *ad libitum*.

O grupo controle (G1) recebeu dieta comercial balanceada de CR-1 Nuvital/Nuvilab®, específico para a espécie, durante todo o período experimental. O grupo experimental (G2) recebeu a mesma dieta do grupo controle durante os procedimentos de indução isquêmica da doença renal. Após o 14º dia da cirurgia da indução de modelo renal, os animais do grupo G2 foram induzidos a diabetes e receberam dieta Rhoster hiperlipídica por 7 dias para auxiliar no processo de indução do DM e após este período voltaram a receber dieta padrão até o final do experimento. Onde a dieta balanceou-se a partir da dieta AIN 93-M modificada com aproximadamente 35% de banha de porco, 5% sacarose e celulose microcristalina 0,5%, todos os ingredientes foram misturados em bateria industrial, fracionados em cerca de 500g e armazenados à tempera de -20°C até o uso do mesmo. Todos os animais tiveram acesso a água *ad libitum* (BORBA *et al.*, 2011).

O estudo foi feito com base em procedimentos prévios realizados anteriormente no laboratório, adaptados e ajustados por meio de estudos atuais visando um estudo inovador, que buscasse caracterizar um duplo modelo animal (BAREKAT *et al.*, 2018; BAZZANO *et al.*, 2015; TOGOE *et al.*, 2014).

O experimento durou 35 dias, sendo que os camundongos ficaram em aclimação por 1 semana (7 dias), durante este período receberam dieta padrão CR-1 Nuvital/Nuvilab e água *ad libitum*. Após a fase de aclimação, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com $n = 32$ cada.

Todos os animais foram pesados durante o período experimental. Assim como tiveram a mensuração semanal dos níveis séricos de glicose sanguínea em monitor digital glicêmico.

4.3 Delineamento

Os animais foram distribuídos de forma randomizada em dois grupos: Grupo 1 (G1), controle sem doença, $n = 32$, e Grupo 2 (G2), com doença diabetes mellitus associada a doença renal, $n = 32$, como mostra a figura 2. Todos os animais foram mantidos em rack ventilado com microisoladores individuais, em sala climatizada com condições ambientais controladas e ciclo 12 h claro/escuro.

Figura 2 – Distribuição randomizada dos animais em grupos.



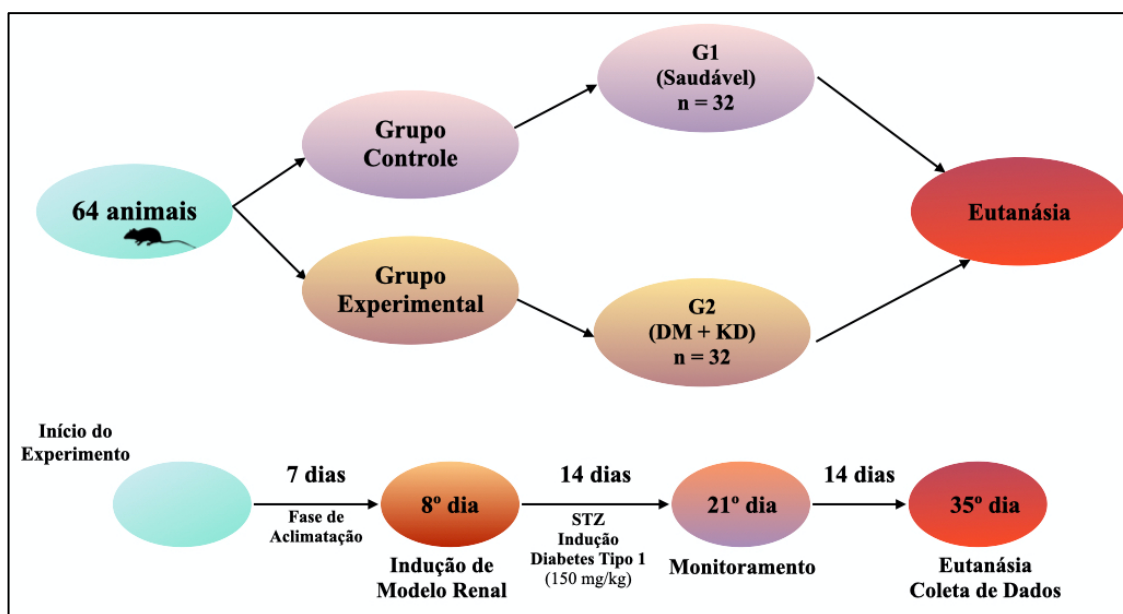
Fonte: Próprio autor.

O grupo G2 foi composto pelos animais que apresentaram, doença renal e diabetes. Os animais que não apresentaram quadro hiperglicêmico, ou seja, níveis glicêmicos iguais ou superiores a 200 miligramas por decilitro (mg/dL) sem jejum, foram excluídos do grupo (ALAWNEH *et al.*, 2021).

4.3.1 Distribuição dos Grupos

A distribuição dos grupos e esquema do período experimental respeitou a organização e randomização aleatória, como representado na figura 3.

Figura 3 – Fluxograma experimental da distribuição dos animais para indução da diabetes tipo 1 por estreptozotocina (STZ) e doença renal.



Fonte: Próprio autor.

4.4 Procedimentos

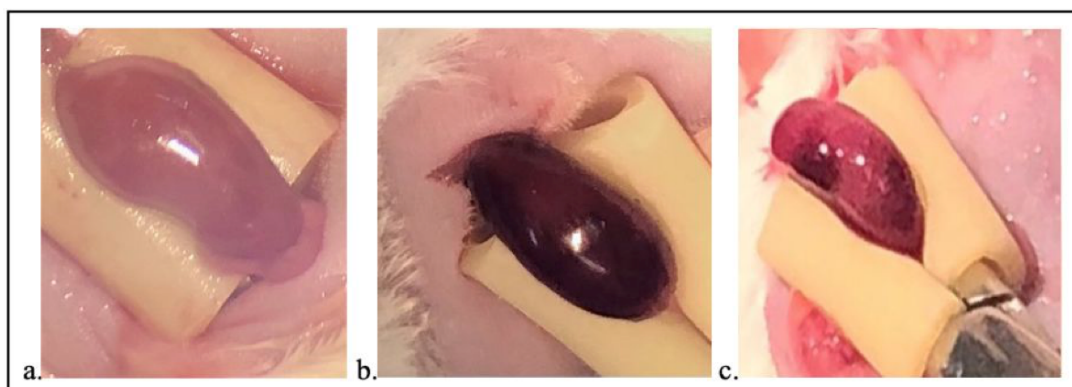
4.4.1 Cirurgia e indução isquêmica da doença renal

Os animais foram acondicionados e mantidos previamente em microisoladores individuais, para serem preparados para a realização do procedimento cirúrgico para indução do modelo renal.

O protocolo cirúrgico de modelo de doença renal por isquemia e reperfusão arteriovenosa, foi realizado sob técnica asséptica, conforme protocolo de Bazzano *et al.* (2015); Togoe *et al.* (2014) e Togoe *et al.* (2019). Os animais foram retirados da microisoladora contidos e colocados na mesa cirúrgica. Como método de contenção e protocolo anestésico, foi utilizada uma combinação de anestésicos de cetamina a 10% via intraperitoneal (50-100 mg/kg) e xilazina (1-5 mg/kg), pelo qual os animais foram anestesiados.

A seguir, os animais foram submetidos à laparotomia do flanco esquerdo, com exposição da cavidade abdominal, para acesso ao rim esquerdo e isolamento do pedículo renal (PR). Após isolamento do PR, a artéria e veia renais foram pinçadas com pinça atraumática isolada por um tubo de látex, visando minimizar os possíveis danos à camada adventícia, por 10 minutos e, nesse período, a isquemia foi confirmada visualmente por mudança de coloração do órgão, passando de um vermelho de tom mais vivo para um vermelho de tom mais escuro. Após a liberação da pinça, ocorreu reperfusão renal, confirmada visualmente pelo retorno da coloração inicial e natural do órgão (Figura 4). Após verificação da homeostase renal, o rim foi reposicionado e a incisão foi fechada em planos com fio mononylon 4-0. Ao término do procedimento de I/R, todos os animais receberam analgesia e foram monitorados até sua recuperação total. Posteriormente, retornaram para os microisoladores individuais, permanecendo em monitoramento por 14 dias.

Figura 4 – Fotografia mostrando os diferentes momentos da indução do modelo renal.



Legenda: (a) apresenta o órgão com coloração normal; (b) traz a mudança de coloração durante a realização da isquemia e, (c) mostra o rim em processo de reperfusão. **Fonte:** Próprio autor.

O acompanhamento dos animais submetidos a cirurgia de I/R, foi realizado através da tira-teste de análise urinária de 10 parâmetros Uri-Color Check Wama Diagnóstica, para detecção das alterações renais de forma semiquantitativa (Figura 5). Para tanto o animal foi contido manualmente, retirado da microisoladora individual e posicionado na bancada,

aguardou-se a micção espontânea e gotas de urina foram depositadas na tira-teste. Os dados coletados foram analisados do seguinte modo: uma análise única de 10 animais de ambos os grupos no 14º dia após a realização do procedimento cirúrgico, afim de confirmar o estabelecimento do modelo renal. Os dados do grupo G1 foram utilizados como parâmetro comparativo e de normalidade para o presente estudo, enquanto os achados do grupo G2, foram utilizados como meio de confirmação do sucesso do modelo renal de I/R, como descrito anteriormente na literatura (BAZZANO *et al.*, 2015; TOGOE *et al.*, 2014; TOGOE *et al.*, 2019).

Figura 5 – Teste para urina de 10 parâmetros Uri-Color Check.



Fonte: Próprio autor.

4.4.2 Indução do diabetes nos animais submetidos a cirurgia de indução isquêmica da doença renal

Após 14 dias da cirurgia para indução da doença renal, os animais do grupo G2 foram submetidos a jejum alimentar por 12 horas, com fornecimento de água *ad libitum*, para preparação da indução do protocolo de DM.

Para indução do DM, foi administrada injeção via i.p. em dose alta única de 150 mg/kg de estreptozotocina (STZ, Sigma®, St. Louis), diluída em tampão citrato 0,1 M (pH 4,5), após 12 horas de jejum alimentar, devido à maior suscetibilidade dos animais à droga diabetogênica nestas condições. Animais do G1 receberam injeção única de tampão citrato 0,1 M (pH 4,5), a fim de submetê-los ao mesmo procedimento. Após o procedimento, os animais foram acondicionados novamente na rack estante ventilada. Decorrido 2 horas do período de indução, os animais então receberam oferta *ad libitum* de solução aquosa de glicose (10%), por 24 horas,

e dieta Rhoster hiperlipídica, por 7 dias. Transcorrido este período e após confirmação do quadro hiperglicêmico, voltaram a dieta padrão com oferta *ad libitum* de ração e água.

O monitoramento dos níveis glicêmicos para confirmação do quadro diabético foi realizado mediante aferição da glicemia em quatro tempos: tempo 0 (T0) – antes da indução; tempo 1 (T1) – após 7 dias do período de indução; tempo 2 (T2) no 14º dia pós indução e tempo 3 (T3) – 21º dia pós indução, ao fim do experimento. Os animais que apresentaram valores glicêmicos superiores ou iguais a 200 miligramas por decilitro de sangue (mg/dL) foram considerados diabéticos e incluídos no experimento. São considerados valores glicêmicos normais para animais saudáveis sem comorbidades, de 80 a 150 mg/dL em jejum (KLUEH *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2018).

Os níveis glicêmicos foram analisados durante o experimento por monitor digital de glicemia Accu-Check® Active, por meio da punção da cauda e perfuração da veia caudal com agulha hipodérmica, e depósito de uma gota de sangue na tira reagente do monitor de glicemia, causando o mínimo de estresse e dor ao animal.

4.5 Eutanásia

Ao final de um período de 35 dias do experimento, a eutanásia dos animais foi realizada mediante dose letal da associação de anestésicos, Xilazina (20mg/kg) e Cetamina (20mg/kg), administrados via intraperitoneal.

4.6 Análise Estatística

Todos os dados foram tabulados e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Após a caracterização das variáveis da função renal, a partir da análise urinária, procedeu-se o estudo descritivo dos achados encontrados, além de verificação das possíveis relações entre as variáveis. Desta forma foi realizada uma análise semiquantitativa dos dados obtidos a partir da análise urinária, tendo seus valores expressos em média $\pm$ DP. Para tanto, foi selecionada uma amostra estratificada de cada grupo com $n = 10$, onde para os parâmetros analisados que apresentaram normalidade, subentendido na análise bioclínica como negativos, foi atribuído valor numérico igual a 0.

As variáveis peso corporal e níveis glicêmicos foram testados estatisticamente por meio da análise de variância *one way*, utilizando-se ANOVA, com pós testes de Tukey, intergrupos em todos os tempos estudados e Teste T de *Student*, intragrupos avaliando os dados estatísticos

comparativamente nos tempos T0 e T3, tendo como nível de significância determinado em $p \leq 0.05$, usando o programa BioEstat 5.3.

5 RESULTADOS

O modelo animal de associação de duas doenças, DM e DR, em camundongos *Mus musculus*, foi alcançado com sucesso, sendo o primeiro estudo nesta linha.

Os protocolos de indução isquêmica de doenças renal e DM com STZ, associados, foram sustentáveis, de baixo custo e não houve morte de nenhum animal.

Foram observadas alterações morfológicas dos rins submetidos à I/R, no que diz respeito a coloração, durante a cirurgia e após o final do tempo de observação, no volume e tamanho do rim esquerdo, quando comparado ao rim contralateral.

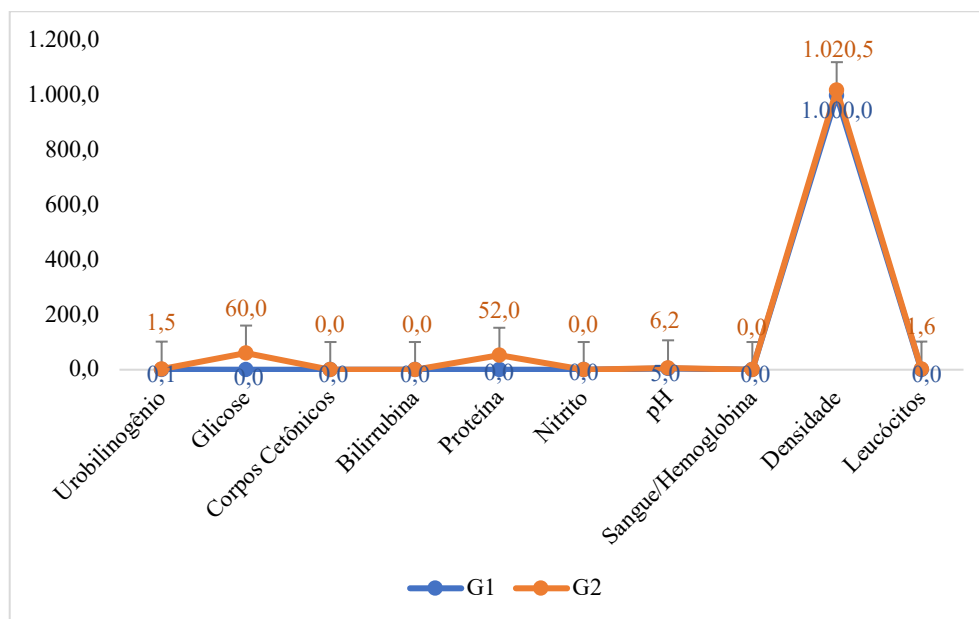
Estas alterações são compatíveis com alterações renais iniciais, nos primeiros 14 dias. A detecção das alterações renais foi realizada, por meio das tiras-teste de análise urinária, determinação semiquantitativa, de 10 parâmetros Uri-Color Check Wama® Diagnóstica. Notou-se alteração no pH, densidade, urobilinogênio e glicose urinária, assim como presença de proteína e leucócito, nos animais do grupo G2, confirmando a nefropatia. Enquanto os animais do controle (G1) apresentaram parâmetros de normalidade durante a análise, como expresso na tabela 1 e figura 6.

Tabela 1 – Valores dos parâmetros de análise urinária pela fita expressos em média $\pm$ DP, analisados intergrupo e intragrupo em uma amostra de 10 animais.

Análise Urinária	G1	G2
Urobilinogênio	0.1 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.5
Glicose	0.0 $\pm$ 0.0	60.0 $\pm$ 49.0
Corpos Cetônicos	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Bilirrubina	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Proteína	0.0 $\pm$ 0.0	52.0 $\pm$ 39.9
Nitrito	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
pH	5.0 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.2
Sangue/Hemoglobina	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Densidade	1000.0 $\pm$ 0.0	1020.5 $\pm$ 4.2
Leucócitos	0.0 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.5

(*) dentro da normalidade.

Figura 6 – Representação da Análise Urinária. Gráfico comparativo entre grupos em uma amostra de 10 animais. Valores expressos em média $\pm$ DP.



A condição de DM foi confirmada pela presença de hiperglicemia após o 7º dia de indução do protocolo. Os resultados dos níveis glicêmicos semanais de acordo com o tempo de análise e os grupos G1 e G2 estão apresentados na Tabela 2. Onde o Tempo 1, após 7 dias da indução; Tempo 2, no 14º dia pós indução e, Tempo 3, no 21º dia pós indução.

Tabela 2 – Níveis glicêmicos semanais. Valores expressos em média $\pm$ DP.

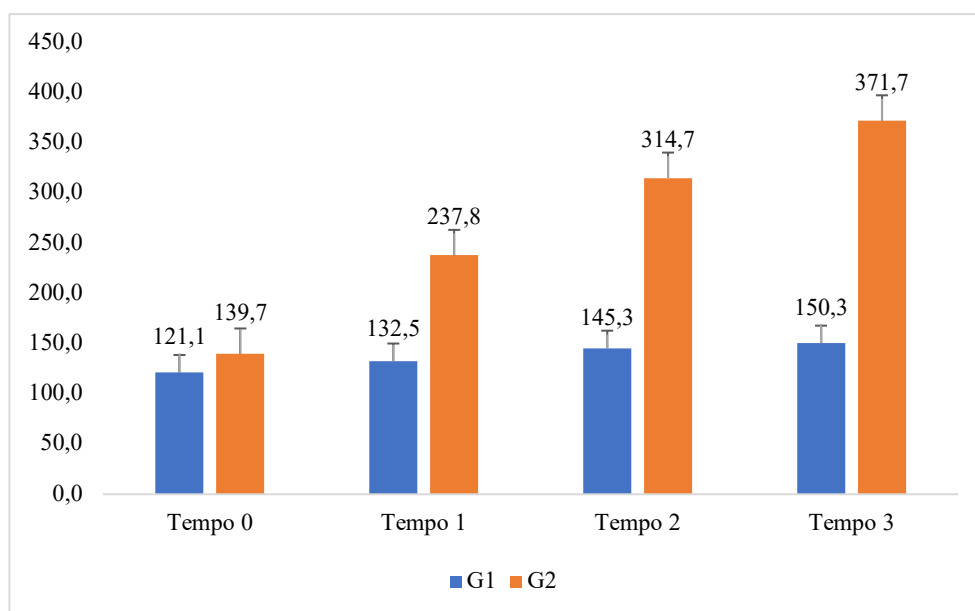
Grupos	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Teste t
G1	121.1 $\pm$ 15.9	132.5 $\pm$ 16.1	145.3 $\pm$ 17.9	150.3 $\pm$ 16.8	0.0001*
G2	139.7 $\pm$ 16.0	237.8 $\pm$ 17.4	314.7 $\pm$ 26.7	371.7 $\pm$ 25.8	0.0001*
ANOVA	0.0004*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	
Tukey	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	

(*) estatisticamente significativo. Pela análise de ANOVA com pós-teste de Tukey na análise intergrupos considerando nível de significância de $p \leq 0.05$, o grupo G2 apresentou valores estatisticamente maiores comparados ao grupo G1. O teste t foi utilizado para analisar comparativamente intragrupos no T0 e T3, tendo como valor de significância $p \leq 0.05$, onde G1 apresentou aumento significativo dos níveis glicêmicos em T3, ainda mantendo-se dentro da normalidade, enquanto G2 mostrou valores significativamente maiores em T3, confirmando quadro de DM.

Após 7 dias do protocolo de indução de DM nos animais, em 24 dos 32 animais induzidos, houve aumento dos níveis glicêmicos caracterizando a doença. Houve diferença

significativa entre grupos e intragrupo quando comparados nos momentos avaliados, com nível de significância de $p \leq 0,05$, conforme figura 7.

Figura 7 – Representação dos níveis glicêmicos semanais (mg/dL). Gráfico comparativo entre grupos em quatro tempos (T0, T1, T2 e T3). Valores expressos em média $\pm$ DP.



Tempo 1, após 7 dias da indução; Tempo 2, no 14º dia pós indução e, Tempo 3, no 21º dia pós indução.

Durante o experimento, os animais tiveram seu peso corporal aferido em quatro momentos. Os animais do G1 apresentaram maior peso corporal médio ao longo do experimento quando comparado ao G2, com significância de $p \leq 0,05$. Houve diferença significativa nos tempos 1, 2 e 3. Esses dados foram expressos como média e desvio padrão, conforme mostrado na Tabela 3 e figura 8.

Tabela 3 – Peso Corporal. Valores expressos em média $\pm$ DP.

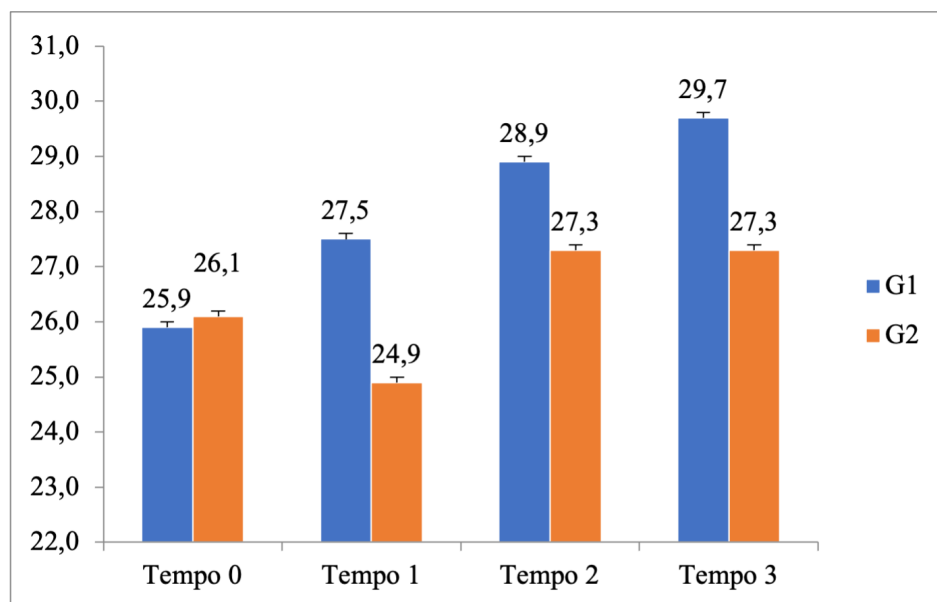
Grupos	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Test t
G1	25.9 $\pm$ 1.8	27.5 $\pm$ 1.3	28.9 $\pm$ 1.4	29.7 $\pm$ 1.0	0.0001*
G2	26.1 $\pm$ 1.8	24.9 $\pm$ 1.1	27.3 $\pm$ 1.7	27.3 $\pm$ 1.4	0.0086*
ANOVA	0.6922**	0.0001*	0.0013*	0.0001*	
Tukey	**	0.01*	0.01*	0.01*	

(*) estatisticamente significativo (**) estatisticamente não significativo. Pela análise de ANOVA com pós-teste de Tukey na análise intergrupos considerando nível de significância

de $p \leq 0.05$, o grupo G1 apresentou valores estatisticamente maiores comparados ao grupo G2, nos tempos 1, 2 e 3. O teste t foi utilizado para analisar comparativamente intragrupos no T0 e T3, tendo como valor de significância $p \leq 0.05$, onde G1 apresentou ganho de peso corporal significativo em T3, enquanto G2 mostrou valores significativamente maiores comparados T0 e T3, no entanto médias menores comparadas ao grupo saudável, confirmando quadro de DM.

A figura 8, apresenta o peso corporal dos grupos G1 e G2 nos quatro momentos analisados. Onde o Tempo 0, representa o período antes do protocolo de indução; Tempo 1, após 7 dias da indução; Tempo 2, no 14º dia pós indução e, Tempo 3, no 21º dia pós indução. É possível observar valores significativamente menores de peso corpóreo no grupo G2 quando comparado ao grupo G1, nos tempos 1, 2 e 3.

Figura 8 – Peso corporal (g). Gráfico comparativo entre grupos em quatro tempos (T0, T1, T2 e T3). Valores expressos em média $\pm$ DP.



Tempo 1, após 7 dias da indução; Tempo 2, no 14º dia pós indução e, Tempo 3, no 21º dia pós indução.

6 DISCUSSÃO

Os procedimentos de indução do diabetes e doença renal, já haviam sido realizados no LMED-UFMS, porém em espécies e condições experimentais diferentes, considerando e analisando os modelos de doença de forma isolada. O modelo animal de associação de duas doenças, DM e DR, em camundongos *Mus musculus*, foi alcançado com sucesso, sendo o primeiro estudo nesta linha. A escolha destes animais se deu devido a viabilidade de produção e as características fisiológicas destes que são extremamente semelhantes às condições humanas.

Estes modelos de doença animal, induzidos neste experimento em camundongos, concomitantemente apresentaram todos os resultados de caracterização semelhantes aos modelos já demonstrados em ratos (diabetes e doença renal), assim como em coelhos com doença renal (BAZZANO *et al.*, 2015; PAIVA *et al.*, 2017; TOGOE *et al.*, 2014; TOGOE *et al.*, 2019). Os modelos animais permitem desenhos experimentais controlados a fim de avaliar sistematicamente as variáveis estudadas (GLASTRAS *et al.*, 2016).

O primeiro estudo relacionando diabetes e doença renal data de 2003, onde estudou-se o quadro em ratos *db/db* obesos. Os estudos apontam que os camundongos são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da estreptozotocina e que este modelo animal se assemelha e permite a recapitulação de forma confiável das alterações morfológicas do quadro de nefropatia diabética humana (ALPERS; HUDKINS, 2011; SHARMA; DUNN, 2003).

Não houve nenhuma morte no momento de indução isquêmica da doença renal. Para a indução da diabetes, aos animais deste grupo foi adicionado o sistema de alimentação com ração hiperlipídica, com intuito de evitar os riscos de reversão do quadro hiperglicêmico e assim corroborar com o quadro evolutivo da doença, pois, conforme Bazzano *et al.* (2015), a doença renal por isquemia e reperfusão é evolutiva e ao 14º dia de pós-operatório, já apresenta parâmetros importantes de cronicidade.

Ao término do experimento, quanto ao modelo renal estabelecido, foi realizado uma análise macroscópica dos rins submetidos à I/R, observando-se alterações significativas em relação ao aspecto morfológico, volume e tamanho do rim esquerdo quando comparado ao rim contralateral, confirmando assim a DRC. A mudança da coloração do órgão, durante o procedimento de I/R, também foi observada no momento da cirurgia, assim como descrito na literatura (BAZZANO *et al.*, 2015).

Em estudo de Barekat *et al.* (2018), no qual realizaram modelo de doença renal por I/R em ratos, utilizaram em seu modelo cirúrgico o pinçamento dos vasos renais durante 45

minutos. Após, a pinça foi removida para restabelecimento do fluxo sanguíneo renal. Procedimento cirúrgico este semelhante ao desenvolvido neste estudo, com tempo e classe de animais diferentes, cujo qual apresentou resultados compatíveis e característicos ao modelo de doença renal. A lesão renal por I/R resulta da deficiência de oxigênio e liberação de nutrientes na remoção de resíduos. Gerando uma incompatibilidade entre a demanda e oferta de oxigênio, em conjunto, ao acúmulo de substâncias inflamatórias, provenientes do metabolismo, decorrentes da perturbação da homeostase. Isso ocorre devido à sensibilidade renal à isquemia, visto que a microvasculatura renal demanda de grande energia, em sua ausência a vasoconstrição vascular, eleva os níveis dos mediadores químicos da inflamação (endotelina-1, angiotensina II, tromboxano A2 e leucotrienos) e de citocinas vasoativas (fator de necrose tumoral- α , interleucina e endotelina). Clinicamente, estas alterações agravam-se no período de reperfusão com o consumo aumentado de oxigênio (TOGOE, 2014).

Na análise semiquantitativa, de detecção das alterações renais, por meio das tiras-teste de análise urinária, de 10 parâmetros, o grupo G2, apresentou parâmetros característicos de nefropatia, sendo observadas alterações no pH, densidade, urobilinogênio e glicose urinária, proteína e leucócito, os quais mostraram-se dentro da normalidade quando analisados no grupo G1. Estes achados condizentes ao quadro de nefropatia decorrente de lesão por I/R. De acordo com a literatura, a creatinina vem sendo utilizada como índice de função renal, uma vez que independe de demais fatores, tornando-se um teste de triagem renal confiável (TOGOE, 2014).

A administração em dose única de injeção de STZ (150 mg/kg, via i.p.), após jejum de 12 horas, seguida de dieta Rhostr hiperlipídica, durante 7 dias, e solução aquosa de glicose (10%) por 24 horas, permitiu reproduzir o modelo de DM, após 7 dias da indução nos animais, em 24 dos 32 animais induzidos. Houve diferença significativa entre os grupos e intergrupos quando comparado nos tempos avaliados. Este achado corrobora com os resultados obtidos por He *et al.* (2019), onde após administração de injeção i.p. de STZ na dose única de 120 mg/kg, 17 dos 20 animais que passaram pelo procedimento apresentaram aumento dos níveis glicêmicos, sendo considerados adequados para o experimento. Em estudo experimental Sudirman *et al.* (2019), utilizaram alta dose de STZ (150 mg/kg de peso corporal, dose única) para indução de DM1 seguida de 12 horas de oferta de solução aquosa de glicose (10%) *ad libitum*, obtiveram sucesso visto que dos 18 animais que receberam a injeção i.p. todos apresentaram hiperglicemia de jejum e aumento dos níveis séricos de glicose.

Já Tang *et al.* (2019), em seu estudo comparativo da desordem renal em pacientes humanos e animais, para indução do modelo experimental de diabetes associado a doença renal,

utilizou a dose de 150 mg/kg de STZ em camundongos fêmeas, injetado em duas doses por via i.p.

Para este estudo, foi escolhida a administração de dose única de estreptozotocina para indução de Diabetes, a fim de minimizar o estresse do procedimento para os animais, visto que doses intermediárias a altas foram comprovadas, em estudos anteriores, eficazes para indução do modelo diabético, uma vez que afetam as células beta das ilhotas pancreáticas (SUN *et al.*, 2019). Após a conclusão do experimento, foi realizada eutanásia dos animais.

Inúmeros estudos têm apontado o efeito citotóxico da STZ sobre as células beta pancreáticas, o que justifica a sua aplicação e eficácia na indução de modelos animais diabéticos. Neste estudo, foi conduzido o modelo diabético animal, em dose única a fim de evitar a necrose rápida das células betas das ilhotas pancreáticas a curto prazo, como apresentado no estudo de Sun *et al.* (2019). Em contrapartida, no estudo de Glastras *et al.* (2016), administrando alta dose de STZ associada a dieta hiperlipídica, não demonstrou resultados superiores quando comparados a administração isolada de STZ. Evidenciando assim que a administração de STZ em dose alta única é uma das estratégias mais eficazes para a indução de DM em modelo experimental de camundongos.

Durante o experimento, os animais tiveram seu peso corporal mensurado em quatro momentos. Notou-se que o G1 apresentou médias de peso corporal maiores durante todo o experimento quando comparado ao G2. No T0 não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (G1 25.9 ± 1.8 e G2 26.1 ± 1.8). Porém nos tempos 1, 2 e 3 houve diferença significativa entre os grupos, onde o G1 apresentou médias de peso corporal maiores quando comparado ao G2, com nível de significância de $p \leq 0.05$. Estes dados corroboram com os achados clínicos característicos da patologia, já descritos na literatura. Uma vez que, o DM é compreendido como uma síndrome metabólica crônica dos carboidratos, lipídios e proteínas, devido à resposta secretória defeituosa ou insuficiente do hormônio insulina, que resulta em hiperglicemia, hipoinsulinemia, cetoacidose, polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso. Logo a redução de peso corporal e a permanência do quadro hiperglicêmico caracterizaram adequadamente o quadro de DM1 (CARVALHO *et al.*, 2016; GLASTRAS *et al.*, 2016).

É reconhecido, que o DM pode acarretar inúmeras complicações, desde retardo no processo de reparação tecidual decorrente de alterações bioquímicas, assim como cardiomiopatias, encefalopatias, neuropatias e nefropatia (CARVALHO *et al.*, 2016; VALENCIA; FLOREZ, 2017).

Atualmente, o Diabetes, reconhecido como doença socioeconômica, é considerado uma das principais causas para o aparecimento da DR em países desenvolvidos. A ND é a maior

causa para o surgimento da DR no mundo, a qual pode levar a óbito. Na ND, a disfunção renal acompanhada de perda de néfrons esta associada à inflamação, acúmulo de MEC e apoptose de células tubulares, assim como é observado nos modelos de lesão nefrotóxica e de I/R (BRAGA *et al.*, 2016; BURMEISTER *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2021; VALENCIA; FLOREZ, 2017).

A hiperglicemia provoca diversas alterações metabólicas. A ativação da proteína C quinase aumenta a produção das ERO, devido a superprodução de óxido nítrico na cadeia mitocondrial, gerando o estresse oxidativo. Este processo origina então, uma resposta inflamatória, diante do aumento de radicais livres, que repercutem em lesão isquêmica, uma vez que há redução das defesas antioxidantes (DENADAI *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2016).

Este experimento veio de encontro a necessidade de modelos de doença bem estabelecidos, com baixo custo e possibilidade de utilização de poucos animais durante a indução. Sendo assim, o modelo de doença renal crônica, induzido cirurgicamente, por isquemia e reperfusão, permite que os animais se mantenham vivos e em condições de receberem os protocolos de indução da diabetes por STZ, uma vez que a nefropatia é uma das principais complicações do quadro de DM. Portanto, este modelo, permitirá a ampliação de novos estudos a respeito das complicações destas patologias.

Por tratar-se do primeiro estudo de duplo modelo de doença DM e DR associados, e diante da escassez de estudos a respeito da temática, torna-se necessário estudos adicionais para estabelecer a degeneração da função renal com a duração do diabetes.

CONCLUSÕES

O período de 10 minutos de isquemia renal seguido de reperfusão alterou significativamente os aspectos macroscópicos, sendo eles tamanho, volume e morfologia renal e, assim como bioquímicos, indicando doença renal.

A administração de dose única de estreptozotocina (150 mg/kg, STZ, i.p.) provocou a elevação dos níveis glicêmicos de forma irreversível dos animais e durante todo o período observado, compatível com quadro de DM.

Todos os camundongos permaneceram vivos, com sinais clínicos das doenças experimentalmente induzidas durante 35 dias.

Este estudo permitiu concluir que é possível manter um duplo modelo experimental de doença renal e diabetes para demais estudos e experimentos, por período suficiente de avaliação.

REFERÊNCIAS

- ALAWNEH, Khaled Z.; RAFFEE, Liqaa A.; ALSHEHABAT, Musa A.; ALKHATIB, Ahed Jumah. Expressions of heat shock protein 90, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in the skin of diabetic rats. **Veterinary World**, v. 14, n. 7, p. 1804-1807, 2021. Doi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1804-1807>.
- ALPERS, Charles E.; HUDKINS, Kelly L. Mouse Models of Diabetic Nephropathy. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 20, n. 3, p. 278-284, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283451901>.
- ANDERSEN, Monica L.; WINTER, Lucile M. F. Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, e20170238, 2019. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170238>.
- AZUSHIMA, Kengo; GURLEY, Susan B.; COFFMAN, Thomas M. Modelling diabetic nephropathy in mice. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 48-56, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.142>.
- BARBOSA, Júnia H. P.; OLIVEIRA, Suzana L.; SEARA, Luci Tojal. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-2730200800060000>.
- BAREKAT, Foroogh; TALEBI, Ardeshtir; NEMATBAKHS, Mehdi. The protective roles of zinc and estradiol in renal ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats. **Journal of Nephropathology**, v. 7, n. 2, p. 88-92, 2018.
- BAZZANO, Telma; RESTEL, Tamy Ingrid; PORFIRIO, Lenir Cardoso, SOUZA, Albert Schiaveto de; SILVA, Iandara Schetter. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 277-288, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-86502015004000007>.
- BORBA, Alberto José de; ROCHA, Márcia Gabriela Margato; SILVA, Marcelo Fernandes da; TIBÚRCIO, Denise Teresinha de Sales; PEREIRA, Sanívia Aparecida de Lima; REIS, Luiz Carlos dos; JÚNIOR, Geraldo Thedei. Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 4, p. 519-528, jul/ago., 2011. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732011000400001>.
- BRAGA, Denis Conci; PANKA, Mariane; CABRAL, Suzane; BONAMIGO, Erik Luiz; BORTOLINI, Sílvia Mônica. Avaliação da função renal em pacientes com diabetes mellitus em um município rural do meio oeste de Santa Catarina. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 45, n. 3, p. 84-92, jul./set., 2016.
- BURMEISTER, Jayme Eduardo; MOSMANN, Camila Borges; BAU, Renata; ROSITO, Guido Aranha. Prevalência do *diabetes mellitus* em pacientes renais crônicos sob hemodiálise em Porto Alegre, Brasil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 2, p. 117-121, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0101-28002012000200003>.

CARVALHO, Ana Flávia Machado de; FEITOSA, Maura Cristina Porto; COELHO, Nayana Pinheiro Machado de Freitas; REBÊLO, Veruska Cronemberger Nogueira; CASTRO, Juçara Gonçalves de *et al.* Terapia a laser de baixa intensidade e *Calendula officinalis* no reparo de úlcera em pé diabético. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 4, p. 628-634, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0080-623420160000500013>.

CAVALCANTI, Alessandro Leite; GRANVILLE-GARCIA, Ana Flávia; BERNARDINO, Veruska Medeiros Martins. Caracterização da pesquisa experimental animal em odontologia. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 57, n. 1, p. 93-98, 2009.

COBAS, Roberta; RODACKI, Melanie; GIACAGLIA, Luciano; CALLIARI, Luis Eduardo Procopio; NORONHA, Renata Maria; VALERIO, Cynthia; CUSTÓDIO, Joaquim; SCHARF, Mauro; BARCELLOS, Cristiano Roberto Grimaldi; TOMARCHIO, Maithe Pimentel; SILVA, Maria Elizabeth Rossi da; SANTOS, Rosa Ferreira dos; ZAJDENVERG, Lenita; GABBAY, Monica; BERCOLUCI, Marcello. Diagnóstico do diabetes e rastreamento do diabetes tipo 2. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes**, p. 1-23, 2022. Doi: <https://doi.org/10.29327/557753.2022-2>.

DENADAI, Amanda Silveira; AYDOS, Ricardo Dutra; SILVA, Iandara Schttert; OLMEDO, Larissa; CARDOSO, Bruno Mendonça de Senna *et al.* Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 11, p. 85-89, 2015. PMID: 28976129.

FAGUNDES, Djalma José; TAHA, Murched Omar. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 91, n. 1, p. 59-65, 2004.

GLASTRAS, Sarah J.; CHEN, Hui; TEH, Rachel; MCGRATH, Rachel T.; CHEN, Jason; POLLOCK, Carol A.; WONG, Muh Geot; SAAD, Sonia. Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. **PLOS One**, v. 11, n. 8, p. 1-15, e01162131, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162131>.

HE, Yizhi; SHI, Bingyin; ZHAO, Xinrui; SUI, Jing. Sphingosine-1-phosphate induces islet β -cell proliferation and decreases cell apoptosis in high-fat diet/streptozotocin diabetic mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, n. 5, p. 3415-3424, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7999>.

JIANG, Yupeng; XIE, Feifei; LV, Xin; WANG, Shuting; LIAO, Xiaohua; YU, Yue; DAI, Qin; ZHANG, Yan; MENG, Jie; HU, Gaoyun; PENG, Zhangzhe; TAO, Lijian. Mefunidone ameliorates diabetic kidney disease in STZ and db/db mice. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 1, e21198, p. 1-18, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1096/fj.202001138RR>.

KARAMI, Mohammad; OWJI, Seyed Mohammad; MOOSAVI, Seyed Mostafa Shid. Comparison of ischemic and ischemic/reperfused kidney injury via clamping renal artery, vein, or pedicle in anesthetized rats. **International Urology and Nephrology**, v. 52, n. 12, p. 2415-2428, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11255-020-02611-x>.

KIM, Seonghum; KANG, Shin-Wook; JOO Jeongho; HAN, Seung Hyeok; SHIN, Huiyoon; NAM, Bo Young; PARK, Jimin; YOO, Tae-Hyn; KIM, Gyuri; LEE, Pureunchowon; Park Jung

Tak. Characterization of ferroptosis in kidney tubular cell death under diabetic conditions. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 160, p. 1-14, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03452-x>.

KLUEH, Ulrike; LIU, Zenghe; CHO, Brian; OUYANG, Tianmei; FELDMAN, Ben; HENNING, Timothy P.; KAUR, Manjot; KREUTZER, Don. Continuous Glucose Monitoring in Normal Mice and Mice with Prediabetes and Diabetes. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 8, n. 3, p. 402-412, 2006.

MERCHANT, Michael L.; NIEWCZAS, Monika; FICOCIELLO, Linda H.; LUKENBILL, Janice; WILKEY, Daniel W.; LI, Ming; KHUNDMIRI, Syed J.; WARRAM, James H.; KROLEWSKI, Andrzej S.; KLEIN, Jon B. Plasma kininogen and kininogen fragments are biomarkers of progressive renal decline in type-1 diabetes. **Kidney Int**, v. 83, n. 6, p. 1177-1184, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1038/ki.2013.8>.

MONTEIRO, Rosangela; BRANDAU, Ricardo; GOMES, Walter J.; BRAILE, Domingo M. Tendência em experimentação animal. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 4, p. 506-513, 2009.

PAIVA, Letícia Alves; SILVA, Iandara Schettert; SOUZA, Albert Schiaveto de; CASSINO, Pedro Carvalho. Pulmonary Oxidative Stress in Diabetic Rats Exposed to Hyperoxia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 32, n.7, p. 503-514, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020170070000001>.

PEREIRA, Juliana Lopes; SOUZA, Priscilla Cristovam Sampaio e; SHINZATO, Vivian Izumi; SASSO, Sandramara; SANTO, Bruna Larissa Spontoni do Espirito; Ganho de Peso e Alterações Metabólicas em Camundongos Submetidos à Dieta Hiperlipídica. **Ciência e Saúde**, v.11, n.1, p. 51-57, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.15448/1983-652X.2018.1.27672>

PETERSMANN, Astrid; MULLER-WIELAND, Dirk; MULLER, Ulrich A.; LANDGRAF, Rudiger; NAUCK, Matthias; FRECKMANN, Guido; HEINEMANN, Lutz; SCHLEICHER, Erwin. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 127, n. 1, p. S1-S7, 2019. Doi: <http://dx.doi.org/10.1055/a-1018-9078>.

RAMESH, Ganesan; RANGANATHAN, Punithavathi. Mouse models and methods for studying human disease, acute kidney injury (AKI). *Methods in Molecular Biology*, v. 1194, p. 421-436, 2014. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1215-5_24.

ROBINSON, N. Bryce; KRIEGER, Katherine; KHAN, Faiza M.; HUFFMAN, William; CHANG, Michelle; NAIK, Ajita; YONGLE, Ruan; HAMEED, Irbaz; KRIEGER, Karl; GIRARDI, Leonard N.; GAUDINO, Mario. The current state of animal models in research: A review. **International Journal of Sugery**, v. 72, p. 9-13, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2019.10.015>.

ROCHA, José Carlos Tatmatsu; FERRARESI, Cleber; HAMBLIN, Michael R.; DAMASCENO, Flávio Maia; NASCIMENTO, Nilberto Robson Falcão do; DRIUSSO, Patricia; PARIZOTTO, Nivaldo Antonio. Low-lever laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. **Journal**

of **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 164, p. 96-102, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.017>.

SAMSU, Nur. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **BioMed Research International**, v. 2021, n. 497449, p. 1-17, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/1497449>.

SHARMA, Kumar; MCCUE, Peter; DUNN, Stephen R. Diabetic kidney disease in the *db/db* mouse. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 284, n. 1, p. 1138-1144, 2003. Doi: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00315.2002>.

SILVA, Telma Bazzano da. **Caracterização de um modelo animal de doença renal produzida por isquemia e reperfusão, em *Rattus norvegicus* Wistar**. 2015. Tese (Doutorado em Tecnologia e Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste/ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

SUDIRMAN, Sabri; Lai, CHING-SHU; YAN, Yi-Ling; YEH, Hung-I; KONG, Zwe-Ling. Histological evidence of chitosan-encapsulated curcumin suppresses heart and kidney damages on streptozotocin-induced type-1 diabetes in mice model. **Scientific Reports Nature Research**, v. 9, n. 15233, p. 1-11, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51821-6>.

SUN, Yun; MAO, Qianyun; SHEN, Chao; WANG, Chen; JIA, Weiping. Exosomes from β -cells alleviated hyperglycemia and enhanced angiogenesis in islets of streptozotocin-induced diabetic mice. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 12, p. 2053-2064, 2019. Doi: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S213400>.

TANG, Jeannette; WYSOCKI, Jan; Ye, Minghao; VALLÉS, Patricia G.; REIN, Johannes; SHIRAZI, Mina; BADER, Michael; GOMEZ, Roberto Ariel; SEQUEIRA-LOPEZ, Maria-Luisa S.; AFKARIAN, Maryam; BATLLE, Daniel. Urinary Renin in Patients and Mice With Diabetic Kidney Disease. **Hypertension**, v. 74, n. 1, p. 83-94, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12873>.

TOGOE, Eliane Barbosa; SILVA, Iandara Schetttert; CURY, Juliana Loprete; SOUZA, Albert Schiaveto; BORGES, José Henrique Saraiva; SATURNINO, Klaus Casaro. Animal modelo f chronic kidney disease using a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion in White New Zealand rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 10, p. 651-657, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-8650201400160005>.

TOGOE, Eliane Barbosa; SILVA, Iandara Schetttert; CURY, Juliana Loprete; Guarnier, Flavia Alessandra. Muscle changes with high-intensity aerobic training in animal model of renal disease. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 1-10, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1590/s0102-865020190050000003>.

VALENCIA, Willy Marcos; FLOREZ, Hermes. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control. **The BMJ (British Medical Journal)**, v. 17, n. 356, p. 1-17, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.i6505>.

ZHONG, Jun-Min; LU, Yue-Cheng; ZHANG, Jing. Dexmedetomidine Reduces Diabetic Neuropathy Pain in Rats through the Wnt 10a/ β -Catenin Signaling Pathway. **BioMed**

Research International, Article ID 9043628, v. 2018, p. 1-7, 2018. Doi:
<https://doi.org/10.1155/2018/9043628>.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo submetido para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira

(Autoral)

Acta Cirúrgica Brasileira

ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

EXPERIMENTAL MODEL OF ASSOCIATED DIABETES MELLITUS AND KIDNEY DISEASE IN MICE

Journal:	<i>Acta Cirúrgica Brasileira</i>
Manuscript ID	ACB-2022-0043
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	06-Feb-2022
Complete List of Authors:	Silva, Pâmela; Federal University of Mato Grosso do Sul, Graduate Program in Health and Development Henrique Silva, Patrícia; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Postgraduate Program in Health and Development; UNIDERP, Fisioterapia Corazza, Adalberto; UFMS, CPTL 1 - UFMS da Silva, Josivaldo; UFMS, Graduate Program in Health and Development Silva, Iandara; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste
Keyword – Go to DeCS or MeSH to find your keywords.:	Diabetes mellitus, chronic kidney disease, streptozotocin, ischemic injury and renal reperfusion

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/acb-scielo>

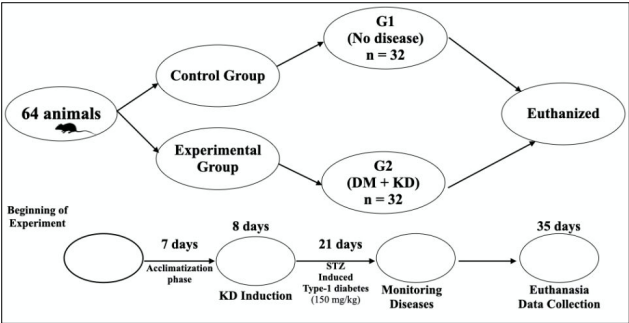


Figure 1 – Distribution and experimental induction of kidney disease and type 1 diabetes by streptozotocin (STZ).

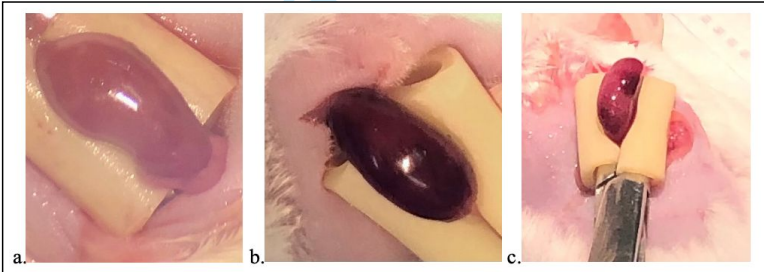


Figure 2 – Photograph showing the different moments of induction of the renal model. Where (a) presents the organ with normal coloration; (b) shows the color change during ischemia and (c) shows the kidney in the process of reperfusion.

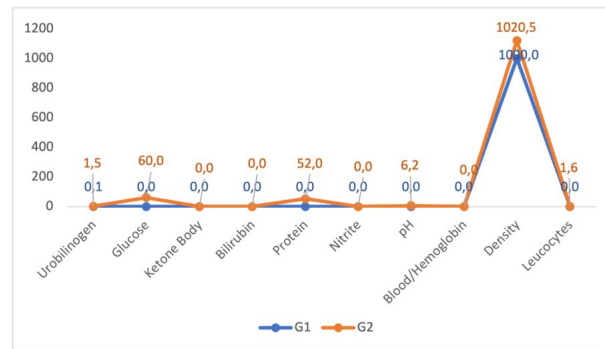


Figure 3 – Urinary Analysis. Comparative graph between groups in a sample of 10 animals. Values expressed as mean $\pm$ SD.

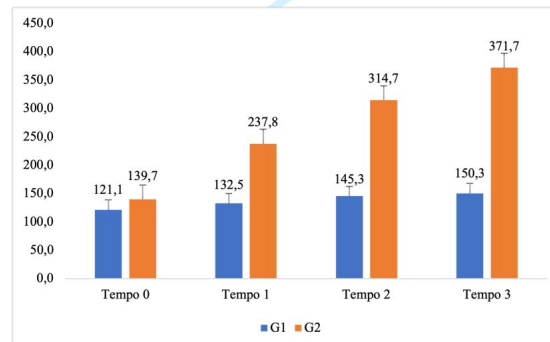


Figure 4 – Weekly glycemic levels (mg/dl). Comparative graph between groups at four times (T0, T1, T2 and T3). Values expressed as mean $\pm$ SD.

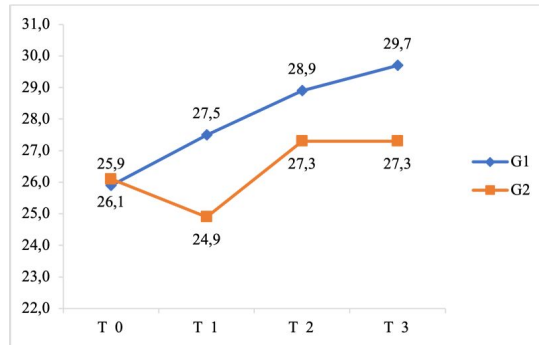


Figure 5 – Weekly body weight (grams - g). Comparative graph between groups at four times (T0, T1, T2 and T3). Values expressed as mean $\pm$ SD.

Table 1 – Values of urine analysis parameters by the tape expressed as mean $\pm$ SD, analyzed intergroup and intragroup in a sample of 10 animals.

Urine analysis	G1	G2
Urobilinogen	0.1 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.5
Glucose	0.0 $\pm$ 0.0	60.0 $\pm$ 49.0
Ketone bodies	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Bilirubin	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Protein	0.0 $\pm$ 0.0	52.0 $\pm$ 39.9
Nitrite	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
pH	0.0 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.2
Blood/Hemoglobin	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Density	1000.0 $\pm$ 0.0	1020.5 $\pm$ 4.2
Leukocytes	0.0 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.5

G1: Healthy group. G2: DM + KD group. Semi-quantitative data on urinary analysis parameters in a randomized sample of 10 animals.

* normality parameters identified in the samples.

Table 2 – Weekly glycemic levels. Values expressed as mean $\pm$ SD.

Groups	T0	T1	T2	T3	t Test
G1	121.1 $\pm$ 15.9	132.5 $\pm$ 16.1	145.3 $\pm$ 17.9	150.3 $\pm$ 16.8	0.0001*
G2	139.7 $\pm$ 16.0	237.8 $\pm$ 17.4	314.7 $\pm$ 26.7	371.7 $\pm$ 25.8	0.0001*
ANOVA	0.0004*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	
Tukey	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	

Results are presented as mean $\pm$ SD of mean. Comparisons in relation to times: One-way repeated measures ANOVA, with Tukey's post-test. The numbers expressed in the columns represent the differences in the glycemia of the animals at different times. Comparisons between diabetic and non-diabetic animals at different times: Student's t test. Statistical differences are indicated by *, $p < 0.05$.

Table 3 – Weekly Body Weight. Values expressed as mean ± SD.

Groups	T 0	T 1	T 2	T 3	t Test
G1	25.9±1.8	27.5±1.3	28.9±1.4	29.7±1.0	0.0001*
G2	26.1±1.8	24.9±1.1	27.3±1.7	27.3±1.4	0.0086*
ANOVA	0.6922ns	0.0001*	0.0013*	0.0001*	
Tukey	ns	0.01*	0.01*	0.01*	

Results are presented as mean ± SD of mean. Comparisons in relation to times: One-way repeated measures ANOVA, with Tukey's post-test. The numbers expressed in the columns represent the differences in the body weight between diabetic and non-diabetic animals at different times: Student's t test. Statistical differences are indicated by *, p<0.05. Values no statistical differences are indicates by ns (no significant).

EXPERIMENTAL MODEL OF ASSOCIATED DIABETES MELLITUS AND KIDNEY DISEASE IN MICE

Pâmela Henrique Silva^I, Patrícia Henrique Silva^{II}, Adalberto Vieira Corazza^{III}, Josivaldo Godoy da Silva^{IV}, Iandara Schettert Silva^V.

^IFellow Master Degree. Postgraduate Program in Health and Development – Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) – Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Scientific and intellectual content of the study, analysis and interpretation of data, technical producers, manuscript preparation and manuscript writing. ID: <https://orcid.org/0000-0003-1133-7752>.

^{II}Fellow Master Degree. Postgraduate Program in Health and Development – Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) – Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Analysis and interpretation of data, technical producers, manuscript preparation and manuscript writing. ID: <https://orcid.org/0000-0002-6905-5646>.

^{III}PhD. Adjunct Professor. Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) Campus of Três Lagoas - Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Critical revision. ID: <https://orcid.org/0000-0003-4888-1380>.

^{IV}PhD. Associate Professor. Postgraduate Program in Health and Development – University of Mato Grosso do Sul (UFMS) – Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Final approval of the version to be published. ID: <https://orcid.org/0000-0003-0663-2087>.

^VPhD. Associate Professor. Postgraduate Program in Health and Development – University of Mato Grosso do Sul (UFMS) – Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Critical revision and Final approval of the version to be published. ID: <https://orcid.org/0000-0001-9431-098X>.

Correspondence:

Pâmela Henrique Silva

Rua José Marcos da Fonseca, 88

79042-120 Campo Grande - MS Brasil

Tel.: (55 67) 99198-6145 pamelahenrique1998@gmail.com

Conflict of interest: Nothing to declare.

Financial source: CAPES.

ABSTRACT

PURPOSE: Diabetes Mellitus (DM) is a lipoprotein metabolic disorder, characterized by hyperglycemia, resulting from an insufficient or deficient secretory response of the hormone insulin, which is also one of the main causes of Kidney Disease (KD). The aim of this study was to present an experimental model of diabetes mellitus and associated kidney disease in mice. **METHODS:** Sixty-four adult female mice (*Mus musculus*) were used, average weigh of 20 g, induced to renal ischemia/reperfusion and, subsequently, DM (150 mg/kg, STZ, i.p.) distributed: G1, control (n=32) and G2, disease (n=32). Afterwards, metabolic changes arising from disease models were analyzed. **RESULTS:** Morphological changes were observed in kidneys submitted to R/I, regarding the coloring during surgery, volume and size of the left kidney, when compared to the contralateral kidney. The increase in glycemic levels was observed after administration of a single dose of STZ (150 mg/kg, i.p.) confirming a hyperglycemic state, with blood glucose values starting at 200 mg/dl. The diabetic model was established through the injection of STZ, associated with the free supply of a high-fat Rhoster diet, for 7 days, and aqueous glucose solution (10%), for 24 hours. **CONCLUSION:** Due to the morphological alterations, it was possible to evidence the presence of kidney disease, through the hyperglycemic condition, the confirmation of type I diabetes by streptozotocin. The induction of a dual model of experimental disease, association of kidney disease and diabetes, made it possible to perform injury and healing models, providing a basis for future studies.

Keywords: Diabetes mellitus, chronic kidney disease, streptozotocin, ischemic injury and renal reperfusion.

INTRODUCTION

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder of carbohydrates, lipids and proteins, due to defective or insufficient secretory response of the hormone insulin, which results in hyperglycemia, hypoinsulinemia, ketoacidosis, polydipsia, polyuria, polyphagia and weight loss ¹.

DM also causes complications such as microvascular changes, cardiomyopathy, encephalopathy, retinopathy, neuropathy and nephropathy. Diabetic retinopathy leads to visual problems, risk of falls and blindness, in the latter cases. Diabetic peripheral neuropathy causes orthostatic hypotension, dysautonomia, ulcers and amputations,

mainly of the lower limbs. In underdeveloped countries, diabetic nephropathy, largely glomerular disease, is recognized as one of the main causes for the onset and evolution of chronic kidney disease (CKD). In turn, CKD has been shown to be one of the major causes of morbimortality in diabetic patients^{1,2,3,4,5}.

High blood glucose levels promote several metabolic changes. The activation of protein C kinase is one of them, which consequently leads to the production of nitric oxide, promoting oxidative stress, increasing the formation of free radicals and reactive oxygen species (ROS), resulting in ischemic tissue injury^{6, 7, 8, 9}.

It is believed that among the main disorders resulting from the pathological condition of individuals affected by DM and CKD, there is peripheral neuropathy, which has become the focus of the rehabilitation of health professionals. Thus, this study aimed to determine a dual experimental model of animal disease associating the dysfunctions of Type I Diabetes and Kidney Disease.

METHODS

Procedures:

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Protocol CEUA/UFMS No. 1.065/2019).

The experiment was carried out at the Laboratory of Animal Models of Disease of the Faculty of Medicine (FAMED) of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS).

Sixty-four adult female mice (*Mus musculus*) of the Swiss strain, weighing approximately 20g and mean age of 50 days, from the Central Animal House of UFMS were used.

The experiment lasted 35 days. The mice were acclimatized for 7 days, receiving a standard CR-1 Nuvital/Nuvilab diet and water ad libitum. After acclimatization, they were randomly assigned to two groups (n = 32). The period of establishment of the renal model was 14 days and after another 14 days the type I diabetes model was established.

The animals were randomly divided into two groups: Group 1 (G1), control without disease, n = 32, and Group 2 (G2), with diabetes mellitus associated with kidney disease, n = 32, as shown in figure 1. All the animals were kept in a ventilated rack with individual microisolators, in an acclimatized room with controlled environmental conditions and a 12 h light/dark cycle.

The control group received a commercial balanced diet of CR-1 Nuvital/Nuvilab®, specific for the species. The experimental group received the same food as the control group during the ischemic induction of kidney disease procedures. After 7 days of surgery, they received a high-fat diet Rhoster for diabetes induction. All animals had access to water ad libitum.

All animals were submitted to weight control weekly during the experimental period, analysis of urine using a colorimetric tape and measurement of blood glucose by digital monitor.

Surgery and ischemic induction of kidney disease:

The surgical protocol was performed under aseptic conditions, according to the protocol of Bazzano et al.¹¹ Animals were anesthetized with intraperitoneal 10% ketamine (50-100 mg/kg) and xylazine (1-5 mg/kg). Then, the animals underwent laparotomy of the left flank to access the left kidney and isolation of the pedicle. The renal artery and vein were clamped with atraumatic forceps isolated by a latex tube for 10 minutes and, during this period, ischemia was visually confirmed by a change in the color of the organ. After releasing the forceps, renal reperfusion occurred, visually confirmed by the return of the initial and natural color of the organ. The kidney was repositioned and the incision was closed in planes with 4-0 mononylon. All animals received analgesia and were monitored for 14 days. The monitored of the animals after the renal ischemia and reperfusion surgery was performed using a 10-parameter Uri-Color Check Wama Diagnostic test strip for semiquantitative detection of renal alterations. All animals underwent urine analysis on the 14th day after the surgical procedure. The data from the control group (G1) were used as a comparative and normality parameter for the present study, while the findings from the G2 group were used as a means of confirming the success of the renal model of ischemia and reperfusion, as already described in previous studies in the same laboratory^{11,13,14}.

Induction of diabetes in animals submitted to renal ischemia and reperfusion:

Fourteen days after surgery to induce kidney disease, the animals in the G2 group were fasted for 12 hours, with water ad libitum.

For the induction of diabetes, an intraperitoneal (i.p.) injection was administered in a single dose of 150 mg/kg of streptozotocin (STZ, Sigma®, St. Louis), diluted in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). Control animals received a single injection of 0.1 M citrate

1
2
3 buffer (pH 4.5) in order to submit them to the same procedure. After 2 hours of the
4 induction period, the animals were then offered ad libitum an aqueous solution of glucose
5 (10%) for 24 hours, and a high-fat diet Rhoster for 7 days. After the period and after
6 confirmation of the hyperglycemic condition, they returned to the standard diet with ad
7 libitum supply of food and water.
8
9

10
11
12 The monitoring of blood glucose levels to confirm the diabetic condition was
13 performed by measuring blood glucose at four times: time 0 (T0) – before induction; time
14 1 (T1) – after 7 days of the induction period; time 2 (T2) – on the 14th day post induction
15 and time 3 (T3) – on the 21st day post induction, at the end of the experiment. Animals
16 that presented glycemic values ≥ 200 milligrams per deciliter (mg/dl) of blood were
17 considered diabetic and included in the experiment.
18
19

20
21
22 Blood glucose levels were analyzed during the experiment using an Accu-Check®
23 Active digital blood glucose monitor, by puncturing the tail and perforating the caudal
24 vein and with a drop of blood on the test strip, causing minimal stress and pain to the
25 animal.
26
27

28 29 30 31 Euthanasia:

32
33 At the end of a period of 35 days, the animals were euthanized using a lethal dose
34 of the association of Xylazine (20 mg/kg) and Ketamine (20 mg/kg) administered
35 intraperitoneally.
36
37

38 39 40 Statistical analysis:

41
42 All data were tabulated and expressed as mean $\pm$ standard deviation (S.D.). The
43 variables body weight and glycemic levels were statistically tested by means of one-way
44 analysis of variance, using ANOVA, with Tukey post test and Student's t-test, with the
45 significance level set at $p \leq 0.05$, using the BioEstat program 5.3. Urinary analysis was
46 semiquantitative, with values expressed as mean $\pm$ SD.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

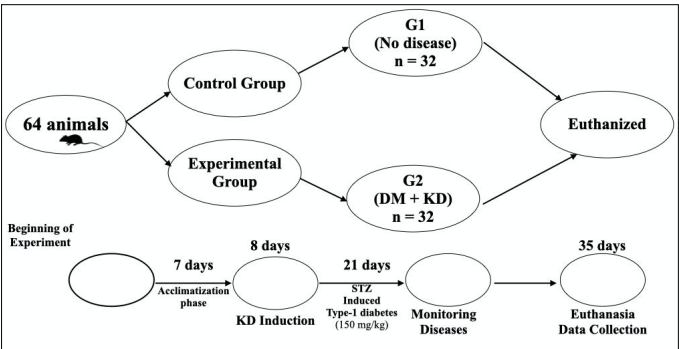


Figure 1 – Distribution and experimental induction of kidney disease and type 1 diabetes by streptozotocin (STZ).

RESULTS

At the end of the experiment, a macroscopic analysis of the kidneys submitted to R/I was performed, observing changes in relation to the morphological aspect, volume and size of the left kidney when compared to the contralateral kidney, thus confirming the CKD. The change in organ color during the procedure was also observed at the time of surgery, as can be seen in Figure 2.

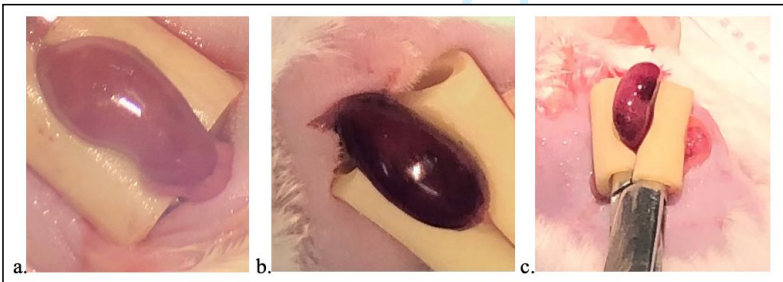


Figure 2 – Photograph showing the different moments of induction of the renal model. Where (a) presents the organ with normal coloration; (b) shows the color change during ischemia and (c) shows the kidney in the process of reperfusion.

For the detection of renal alterations, the semiquantitative determination of 10 Uri-Color Check Wama Diagnóstica parameters was performed using the urine analysis test strips. Changes were observed in pH, density, urobilinogen and urinary glucose, as well

as the presence of protein and leukocytes in G2 animals, confirming nephropathy. While the animals in the control group (G1) showed normal parameters during the analysis, as shown in table 1 and figure 3.

Table 1 – Values of urine analysis parameters by the tape expressed as mean $\pm$ SD, analyzed intergroup and intragroup in a sample of 10 animals.

Urine analysis	G1	G2
Urobilinogen	0.1 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.5
Glucose	0.0 $\pm$ 0.0	60.0 $\pm$ 49.0
Ketone bodies	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Bilirubin	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Protein	0.0 $\pm$ 0.0	52.0 $\pm$ 39.9
Nitrite	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
pH	0.0 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.2
Blood/Hemoglobin	0.0 $\pm$ 0.0*	0.0 $\pm$ 0.0*
Density	1000.0 $\pm$ 0.0	1020.5 $\pm$ 4.2
Leukocytes	0.0 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.5

G1: Healthy group. G2: DM + KD group. Semi-quantitative data on urinary analysis parameters in a randomized sample of 10 animals.

* normality parameters identified in the samples.

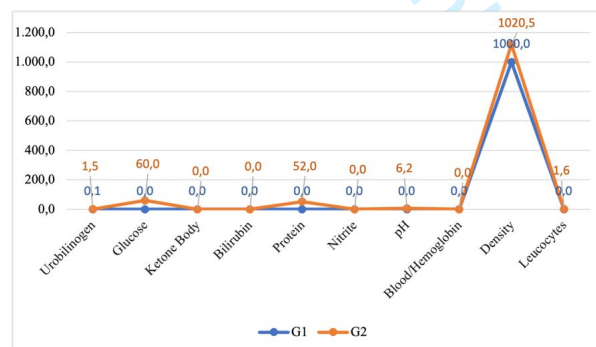


Figure 3 – Urinary Analysis. Comparative graph between groups in a sample of 10 animals. Values expressed as mean $\pm$ SD.

The results of weekly glycemic levels according to the time of analysis and groups G1 and G2 are shown in Table 1 and Figure 4. After 7 days of the DM induction protocol in the animals, in 24 of the 32 induced animals, there was an increase in glycemic levels characterizing the disease. There was a significant difference between groups and intergroups when compared at the times evaluated, with a significance level of $p \leq 0.05$, as shown in Table 2 and Figure 4.

Table 2 – Weekly glycemic levels. Values expressed as mean $\pm$ SD.

Groups	T0	T1	T2	T3	t Test
G1	121.1 $\pm$ 15.9	132.5 $\pm$ 16.1	145.3 $\pm$ 17.9	150.3 $\pm$ 16.8	0.0001*
G2	139.7 $\pm$ 16.0	237.8 $\pm$ 17.4	314.7 $\pm$ 26.7	371.7 $\pm$ 25.8	0.0001*
ANOVA	0.0004*	0.0001*	0.0001*	0.0001*	
Tukey	0.01*	0.01*	0.01*	0.01*	

Results are presented as mean $\pm$ SD of mean. Comparisons in relation to times: One-way repeated measures ANOVA, with Tukey's post-test. The numbers expressed in the columns represent the differences in the glycemia of the animals at different times. Comparisons between diabetic and non-diabetic animals at different times: Student's t test. Statistical differences are indicated by *, $p < 0.05$.

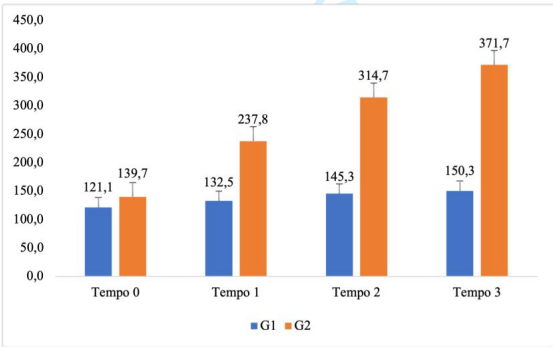


Figure 4 – Weekly glycemic levels (mg/dl). Comparative graph between groups at four times (T0, T1, T2 and T3). Values expressed as mean $\pm$ SD.

During the experiment, the animals had their body weight measured weekly. It was noted that G1 presented higher average body weight throughout the experiment when compared to G2. At T0, there was no statistically significant difference between the

groups (G1 25.9±1.8 and G2 26.1±1.8). However, at times 1, 2 and 3 there was a significant difference between the groups, where G1 presented higher average body weight when compared to G2, with a significance level of $p \leq 0.05$. These data were expressed as mean and standard deviation as shown in Table 3 and figure 5.

Table 3 – Weekly Body Weight. Values expressed as mean $\pm$ SD.

Groups	T 0	T 1	T 2	T 3	t Test
G1	25.9±1.8	27.5±1.3	28.9±1.4	29.7±1.0	0.0001*
G2	26.1±1.8	24.9±1.1	27.3±1.7	27.3±1.4	0.0086*
ANOVA	0.6922ns	0.0001*	0.0013*	0.0001*	
Tukey	ns	0.01*	0.01*	0.01*	

Results are presented as mean $\pm$ SD of mean. Comparisons in relation to times: One-way repeated measures ANOVA, with Tukey's post-test. The numbers expressed in the columns represent the differences in the body weight between diabetic and non-diabetic animals at different times: Student's t test. Statistical differences are indicated by *, $p < 0.05$. Values no statistical differences are indicates by ns (no significant).

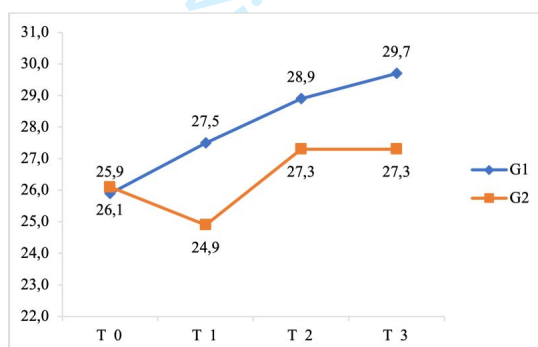


Figure 5 – Weekly body weight (grams - g). Comparative graph between groups at four times (T0, T1, T2 and T3). Values expressed as mean $\pm$ SD.

DISCUSSION

The procedures for inducing diabetes and kidney disease had already been performed at the LMED-UFMS, but in different species and experimental conditions, considering and analyzing the disease models in isolation.

The animal disease models induced in this experiment in mice concomitantly presented all characterization results similar to the models already demonstrated in rats (diabetes and kidney disease), as well as in rabbits with kidney disease^{11,12,13,14}. The first study relating diabetes and kidney disease dates from 2003, where the condition was studied in obese db/db rats¹⁵. Studies show that mice are more susceptible to the toxic effects of streptozotocin and that this animal model resembles and allows the reliably recapitulation of the morphological changes of human diabetic nephropathy^{5, 15}.

There were no deaths at the time of ischemic induction of renal disease. For the induction of diabetes, the animals in this group were fed a high-fat diet, in order to avoid the risk of reversing the hyperglycemic condition and thus corroborating the evolution of the disease, since, according to Bazzano et al.¹¹, renal disease due to ischemia and reperfusion is progressive and, on the 14th, postoperative day, it already presents important parameters of chronicity.

At the end of the experiment, regarding the established renal model, a macroscopic analysis of the kidneys submitted to R/I was performed, observing significant changes in relation to the morphological aspect, volume and size of the left kidney when compared to the contralateral kidney, thus confirming the CKD. The change in organ color during the R/I procedure was also observed at the time of surgery, as can be seen in Figure 2, as described in the literature by Bazzano et al.¹¹

The administration of a single dose of STZ injection (150 mg/kg, i.p.), after fasting for 12 hours, followed by a high-fat diet Rhoster, for 7 days, and aqueous glucose solution (10%) for 24 hours, allowed to reproduce the DM model, after 7 days of induction in the animals, in 24 of the 32 induced animals. There was a significant difference between groups and intergroups when compared in the evaluated times, as shown in Table 2 and figure 4. This finding corroborates the results obtained by He et al.¹⁶, where after administration of i.p. of STZ in a single dose of 120 mg/kg, 17 of the 20 animals that underwent the procedure showed increased glycemic levels, being considered suitable for the experiment. In an experimental study Sudirman et al.¹⁷, used a high dose of STZ (150 mg/kg of body weight, single dose) for the induction of type 1 DM followed by 12 hours of offering an aqueous solution of glucose (10%) ad libitum, they were successful since of the 18 animals that received the i.p injection all had fasting hyperglycemia and increased serum glucose levels. Tang et al.¹⁸, in their comparative study of renal disorders in human and animal patients, for induction of the experimental model of diabetes

associated with renal disease, used a dose of 150 mg/kg of STZ in female mice, injected in two doses per via i.p.

For this study, the administration of a single dose of streptozotocin for induction of Diabetes was chosen in order to minimize the stress of the procedure for the animals. It is justified, since intermediate to high doses have been proven, in previous studies, to be effective for inducing the diabetic model, since they affect the beta cells of the pancreatic islets¹⁹. After the conclusion of the experiment, the animals were euthanized.

Numerous studies have pointed out the cytotoxic effect of STZ on pancreatic beta cells, which justifies its application and effectiveness in inducing diabetic animal models. In this study, a single-dose diabetic animal model was carried out in order to avoid rapid necrosis of the beta cells of the pancreatic islets in the short term, as presented in the study by Sun et al.¹⁹

DM is a chronic metabolic syndrome of carbohydrates, lipids and proteins, due to defective or insufficient secretory response of the hormone insulin, which results in hyperglycemia, hypoinsulinemia, ketoacidosis, polydipsia, polyuria, polyphagia and weight loss¹. During the experiment, the animals had their body weight measured weekly. It was noted that G1 had a statistically significant higher mean body weight throughout the experiment when compared to G2, with a significance level of $p \leq 0.05$. These changes are reported as likely to cause numerous complications, from delay in the tissue repair process resulting from biochemical changes, as well as cardiomyopathies, encephalopathies, neuropathies and nephropathy^{1,3}.

Currently, Diabetes, recognized as a socioeconomic disease, is considered one of the main causes for the onset of kidney disease (KD) in developed countries. Diabetic nephropathy is the major cause of KD in the world, which can lead to death^{3,4,20}.

Hyperglycemia causes several metabolic changes. Activation of protein C kinase increases the production of ROS, due to the overproduction of nitric oxide in the mitochondrial chain, generating oxidative stress. This process then gives rise to an inflammatory response, in view of the increase in free radicals, which results in ischemic injury, since there is a reduction in antioxidant defenses^{6, 7, 8, 9}.

This experiment meets the need for well-established disease models, with low cost and the possibility of using few animals during induction. Thus, the model of chronic kidney disease, surgically induced by ischemia and reperfusion, allows the animals to remain alive and able to receive the STZ diabetes induction protocols, since nephropathy

is one of the main complications of the disease DM frame. Therefore, this model will allow the expansion of new studies regarding the complications of these pathologies.

CONCLUSION

The 10-minute period of renal ischemia, followed by reperfusion, significantly altered the macroscopic aspects, such as size, volume and renal morphology, as well as biochemical aspects indicating renal disease.

The administration of a single dose of streptozotocin (150 mg/kg, STZ, i.p.) caused an irreversible increase in the glycemic levels of the animals and during the entire period observed, compatible with DM.

All mice remained alive, with clinical signs of the experimentally induced diseases for 35 days.

This study allowed us to conclude that it is possible to maintain a dual experimental model of kidney disease and diabetes for other studies and experiments for a sufficient evaluation period.

Additional studies are needed to establish the degeneration of renal function with the duration of diabetes.

Author's contribution

Scientific and intellectual content of the study: Silva PH; **Analysis and interpretation of data:** Silva PH and Silva IS; **Technical proceducers:** Silva PH and Silva PH. **Manuscript preparation:** Silva PH and Silva PH; **Manuscript writing:** Silva PH and Silva PH; **Critical revision:** Corazza AV, Silva IS and Silva JG and; **Final approval of the version to be published:** Silva IS, Silva JG.

Funding

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

[<https://doi.org/10.13039/501100002322>]

Grant no. 88887.502709

Acknowledgments

To the team at the Laboratory of Animal Models of Disease – LMED and Laboratory of Assistive Technology and Biomedical Engineering at UFMS for help and support.

REFERENCES

1. Carvalho AF, Feitosa MC, Coelho NP, Rebêlo VC, Castro JG, Sousa PR, Feitosa VC, Arisawa EA. Low-level laser therapy and *Calendula officinalis* in repairing diabetic foot ulcers. *Rev Esc Enferm USP*. 2016;50(4):628-34. doi: 10.1590/S0080-623420160000500013.
2. Azushima K, Gurley SB, Coffman TM. Modelling diabetic nephropathy in mice. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(1):48-56. doi: 10.1038/nrneph.2017.142.
3. Valencia WM, Florez H. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control. *BMJ*. 2017;17(356):i6505. doi: 10.1136/bmj.i6505.
4. Burmeister JE, Mosmann CB, Bau R, Rosito GA. Prevalência do diabetes mellitus em pacientes renais crônicos sob hemodiálise em Porto Alegre, Brasil. *J Bras Nefrol*. 2012;34(2):117-21. doi: 10.1590/s0101-28002012000200003.
5. Alpers CE, Hudkins KL. Mouse Models of Diabetic Nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(3):278-84. doi: 10.1097/MNH.0b013e3283451901.
6. Denadai AS, Aydos RD, Silva IS, Olmedo L, Cardoso BM, Silva BA, Carvalho PT. Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. *J Exp Ther Oncol*. 2017;11(2):85-9. PMID: 28976129.
7. Nascimento OJ, Pupe CC, Cavalcanti EB. Neuropatia Diabética. *Rev Dor*. 2016;17(1):46-51. doi: 10.5935/1806-0013.20160047.
8. Pieber K, Herceg M, Paternostro-Sluga T. Electrotherapy for treatment of painful diabetic peripheral neuropathy: a review. *J Rehabil Med*. 2010;42(4):289-95. doi: 10.2340/16501977-0554.
9. Tatmatsu-Rocha JC, Ferraresi C, Hamblin MR, Maia FD, Nascimento NR, Driusso P, Parizotto NA. Low-level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J Photochem Photobiol B*. 2016;164:96-102. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.17.
10. Zhong JM, Lu YC, Zhang J. Dexmedetomidine Reduces Diabetic Neuropathy Pain in Rats through the Wnt 10a/β-Catenin Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9043628. doi: 10.1155/2018/9043628.
11. Bazzano T, Restel TI, Porfirio LC, Souza AS, Silva IS. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras*. 2015;30(4):277-88. doi: 10.1590/S0102-865020150040000007.
12. Paiva LA, Silva IS, Souza AS, Cassino PC. Pulmonary Oxidative Stress in Diabetic Rats Exposed to Hyperoxia. *Acta Cir Bras*. 2017;32(7):503-14. doi: 10.1590/s0102-865020170070000001.
13. Togoe EB, Silva IS, Cury JL, Souza AS, Borges JH, Saturnino KC. Animal model of chronic kidney disease using a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion in White New Zealand rabbits. *Acta Cir Bras*. 2014;29(10):651-7. doi: 10.1590/s0102-8650201400160005.
14. Togoe EB, Silva IS, Cury JL, Guarnier FA. Muscle changes with high-intensity aerobic training in animal model of renal disease. *Acta Cir Bras*. 2019;34(5):e201900503. doi: 10.1590/s0102-865020190050000003.
15. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(6):F1138-44. doi: 10.1152/ajprenal.00315.2002.
16. He Y, Shi B, Zhao X, Sui J. Sphingosine-1-phosphate induces islet β-cell proliferation and decreases cell apoptosis in high-fat diet/streptozotocin diabetic mice. *Exp Ther Med*. 2019;18(5):3415-24. doi: 10.3892/etm.2019.7999.

17. Sudirman S, Lai CS, Yan YL, Yeh HI, Kong ZL. Histological evidence of chitosan-encapsulated curcumin suppresses heart and kidney damages on streptozotocin-induced type-1 diabetes in mice model. *Sci Rep.* 2019;9(1):15233. doi: 10.1038/s41598-019-51821-6.
18. Tang J, Wysocki J, Ye M, Vallés PG, Rein J, Shirazi M, Bader M, Gomez RA, Sequeira-Lopez ML, Afkarian M, Battle D. Urinary Renin in Patients and Mice With Diabetic Kidney Disease. *Hypertension.* 2019;74(1):83-94. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12873.
19. Sun Y, Mao Q, Shen C, Wang C, Jia W. Exosomes from β -cells alleviated hyperglycemia and enhanced angiogenesis in islets of streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12:2053-64. doi: 10.2147/DMSO.S213400.
20. Kim S, Kang SW, Joo J, Han SH, Shin H, Nam BT, Park J, Yoo TH, Kim G, Lee P, Park JT. Characterization of ferroptosis in kidney tubular cell death under diabetic conditions. *Cell Death Dis.* 2021;12(2):160. doi: 10.1038/s41419-021-03452-x.

¹Research performed at Laboratory of Animal Models of Disease – LMED, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

ANEXO B– Artigo submetido para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira **(Segunda Autora)**



ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

ORIGINAL ARTICLE 8

Experimental Surgery

<https://doi.org/10.1590/acb370402>

Effect of electrophysical resources on healing of neurotendinous injury in an experimental model of type I diabetes and kidney disease

Patrícia Henrique Silva^{1*}, Pâmela Henrique Silva², Gilberto Gonçalves Facco³, Adalberto Vieira Corazza⁴, Josivaldo Godoy da Silva⁵, Iandara Schetttert Silva⁶

1. Fellow Master's degree. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Postgraduate Program in Health and Development – Campo Grande (MS), Brazil.
2. Fellow Master's degree. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Postgraduate Program in Health and Development – Campo Grande (MS), Brazil.
3. PhD. Universidade Anhanguera – Postgraduate Program in Environments and Regional Development – Campo Grande (MS), Brazil.
4. PhD. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Campo Grande (MS), Brazil.
5. PhD. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Postgraduate Program in Health and Development – Campo Grande (MS), Brazil.
6. PhD. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Postgraduate Program in Health and Development – Campo Grande (MS), Brazil.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate and describe the effect of electrophysical resources laser therapy (LLLT), intravascular laser blood irradiation (ILIB), and cryotherapy on the healing process of neurotendinous injury, as well as possible systemic changes, in the experimental model of type 1 diabetes associated with kidney injury. **Methods:** The animals were randomized into four groups: G1) healthy control with untreated injury; G2) healthy control with injury and treatment; G3) disease control with untreated lesion; G4) disease with injury and treatment. Furthermore, the treated groups were divided into three, according to the type of treatment. All animals were induced to neurotendinous injury and treated according to the therapeutic protocols. Healing and inflammation were analyzed by semiquantitative histopathological study. **Results:** It was observed in sick animals treated with cryotherapy and ILIB reduction of inflammatory exudate, presence of fibroblasts and organization of collagen, when compared to the effects of LLLT. Moreover, there was reduction in glycemic levels in the group treated with ILIB. **Conclusions:** Cryotherapy promoted reduction in inflammatory exudate and organization of collagen fibers, in addition to the absence of signs of tissue necrosis, in the groups treated with and without the disease. ILIB therapy showed the same findings associated with significant reduction in glycemic levels in the group of diseased animals. The application of LLLT showed increased inflammatory exudate, low organization of collagen fibers and low sign of tissue degeneration and necrosis. This study in a model of associated diseases (diabetes and kidney disease) whose effects of electrophysical resources studied after neurotendinous injury allows us to verify histopathological variables suggestive of patients with the same comorbidities.

Key words: Renal Insufficiency, Chronic. Low-Level Light Therapy. Cryotherapy. Diabetes Mellitus.

■ Introduction

Diabetes mellitus (DM), a socioeconomic disease, understood as a chronic metabolic syndrome, results from defective or insufficient secretory response of the hormone insulin, resulting in hyperglycemia¹. This can lead to numerous complications, from delayed tissue repair due to biochemical changes, as well as cardiomyopathies, encephalopathies, neuropathies and nephropathies¹. These complications affect function and quality of life, resulting in disability and reduced productivity².

*Corresponding author: phs.fisio@gmail.com | (55 67) 99198-6293

Received: Dec 28, 2021 | Review: Feb 26, 2021 | Accepted: Mar 27, 2021

Conflict of interest: Nothing to declare.

Research performed at Laboratory of Animal Models of Disease, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande (MS), Brazil.



Acta Cir Bras. 2022;37(02):e370402

Microvascular complications occur in all types of diabetes, which in turn corroborate to the emergence of the main complications that affect diabetic patients. Retinopathy stands out, which causes visual problems, increased incidence of falls and blindness; nephropathy, which in turn causes severe chronic kidney disease, leading to renal replacement therapy and even death; and peripheral neuropathy, which causes orthostatic hypotension, dysautonomia, foot ulcers, and limb amputations².

High blood glucose levels promote activation of protein C kinase, which leads to the production of nitric oxide, promoting oxidative stress, increasing the synthesis of free radicals, which result in ischemic injury and delay in the healing process³⁻⁵.

Among the complications arising from the pathological condition, diabetic peripheral neuropathy is a disorder commonly rehabilitated by physical therapists, using physical and phototherapeutic resources, effective in controlling painful process, inflammations, edema, tissue regeneration and repair, revascularization, nutrition, and tissue oxygenation^{1,5,6}.

The therapeutic approach through low-cost physical resources, such as laser therapy, intravascular laser irradiation of blood therapy (ILIB), and cryotherapy, has shown effective results in tissue repair and minimization of tissue damage⁷.

To generate biological effects when reaching the tissues, the laser light must be absorbed by the target tissue. LLLT in healthy tissues is able to produce reactive oxygen species (ROS). However, when applied under conditions of oxidative stress, there is reduction in ROS synthesis⁸.

On the other hand, ILIB therapy, in addition to the expected effects of laser therapy, modulates the signaling of reactive enzymes in the respiratory chain, through mitochondrial components, inducing positive effects on the expression of immunoglobulins, interferons and interleukins, being able to promote an increase in the supply of oxygen to the tissues, ceasing tissue hypoxia, normalizing metabolism, and improving the oxidation of energy transport molecules, glucose and pyruvate, due to the greater production of adenosine triphosphate. Recent studies have pointed out its use in several systemic conditions^{8,9}.

There are data in the literature that prove the power to weaken and delay the infiltration of inflammatory cells after the application of cryotherapy, which can be explained by the vasoconstriction induced by cold, promoting reduction in cell permeability and lymphatic vessels and capillaries, which, in turn, reduces leakage of liquid into the interstitium¹⁰.

It is believed that the electrophysical resources used in the physiotherapeutic rehabilitation of patients only promote local effects, not being able to interfere with the systemic metabolism of individuals affected by DM and chronic kidney disease.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of electrophysical resources (laser therapy, ILIB and cryotherapy) on tissue healing and possible local and systemic metabolic changes, in an experimental model of diabetes-associated kidney disease, mimicking a diabetic nephropathy.

■ Methods

The present study is experimental research using animals. It was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Protocol no. 1.065/2019.

The experiment was conducted at the Laboratory of Experimental Models of Disease of the Faculty of Medicine (FAMED) of the UFMS.

Sixty-four adult female mice (*Mus musculus*) of the Swiss strain were used, weighing approximately 20 g, with an average age of 50 days old.

The animals were accommodated in a ventilated rack with individual transparent polycarbonate microisolators, with direct air injection. During the entire experiment, the animals were kept in an acclimatized room with controlled environmental conditions of temperature, 12-hour light/dark cycle and humidity.

After the establishment of the disease models, they were fed a standard balanced commercial diet specific for the species and access to water *ad libitum*.

The experiment lasted 35 days. The animals were adapted to the environment for seven days before starting the animal disease model protocols.

Experimental design

The animals were randomized into four groups:

- Group 1 (G1): healthy control with untreated injury (n = 8);
- Group 2 (G2): healthy control with injury and treatment, subdivided into three subgroups, L (low-level laser therapy treatment), n = 8, I (intravascular laser irradiation of blood treatment), n = 8, and C (cryotherapy treatment), n = 8;
- Group 3 (G3): disease control with untreated lesion (n = 6);
- Group 4 (G4): disease with injury and treatment, subdivided into three subgroups, L (low-level laser therapy treatment), n = 6, I (intravascular laser irradiation of blood treatment), n = 6, and C (cryotherapy treatment), n = 6 (Fig. 1).

Groups G3 and G4 were composed of animals induced to the model of kidney disease associated with diabetes. Animals that did not present hyperglycemia (> 200 mg/dL) were excluded from the groups.

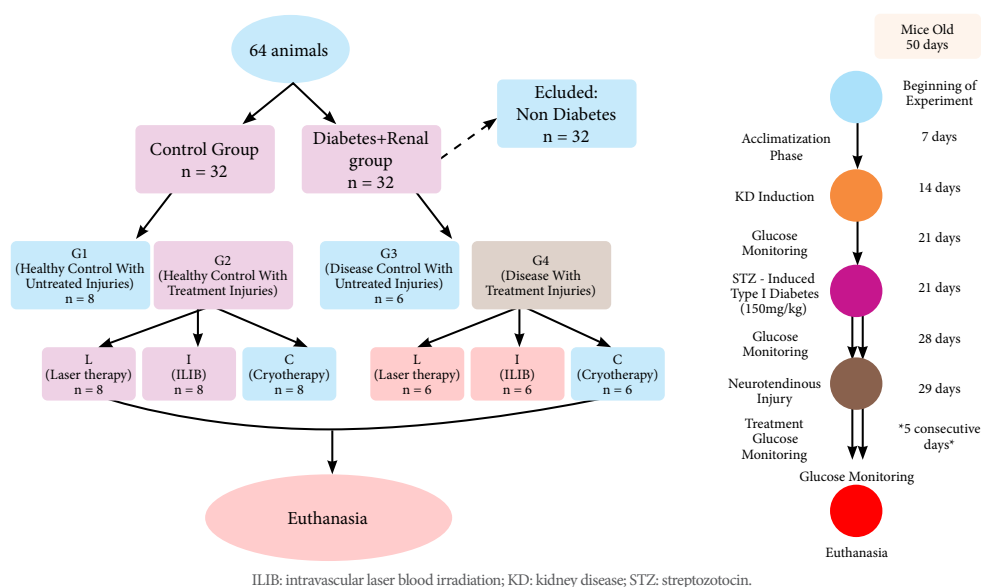


Figure 1 - Flowchart of the distribution of animals in groups and protocols. The flowchart shows the random division of animals into groups: G1 (healthy control with untreated injury); G2 (healthy control with injury and treatment), subdivided into subgroups L (low-level laser therapy treatment), I (intravascular laser irradiation of blood treatment), and C (cryotherapy treatment); G3 (disease control with untreated lesion); G4 (disease with injury and treatment), subdivided into subgroups L (low-level laser therapy treatment), I (intravascular laser irradiation of blood treatment), and C (cryotherapy treatment). While the timeline illustrates the phases of the experiment: acclimatization period (seven days), kidney disease induction (14 days), glucose monitoring (21 days), induction of the streptozotocin type I diabetes protocol (21 days), glucose monitoring (28 days), neurotendinous injury protocol (29 days), five days of consecutive treatment, and glucose monitoring and glucose monitoring, before euthanasia (35 days).

Procedures

Diabetes-associated kidney disease

The diabetes-associated kidney disease model was performed according to experiments previously performed at the Laboratory of Experimental Models of Disease of the UFMS, as described ahead:

- Renal ischemia and reperfusion, by aseptic surgery¹¹⁻¹³;
- Kidney damage was monitored for 14 days, using urine dipstick tests, in which renal damage was verified by the parameters pH, density, urobilinogen, and urinary glucose, as well as the presence of proteinuria and leukocytes. Renal damage was monitored for 14 days, using a urine reagent strip, by semiquantitative determination of 10 parameters by chemical reaction, in which the kidney was selected by the parameters pH, density, urobilinogen, and urinary glucose, in addition to the presence of proteinuria and leukocytes;
- After 14 days of surgery for induction of kidney disease, the animals comprising the diseased groups were injected intraperitoneally (i.p.) in a single high dose of 150 mg/kg of streptozotocin for induction of diabetes;
- After 2 hours of induction, they began to receive a high-fat Rhoster diet for seven days, with water replaced by aqueous glucose solution (10%) for 24 hours. After this period, they returned to the standard diet of food and water *ad libitum*;
- Blood glucose levels were analyzed during the experiment using a digital glucose monitor, and the animals that showed results >200 mg/dL were also considered diabetics;
- All animals underwent neurotendinous injury.

Tibial nerve and common calcaneal tendon injury

- The neurotendinous injury protocol was performed on the seventh day after the induction and confirmation of the hyperglycemic condition in the animals;
- The animals were submitted to inhalational anesthesia with isoflurane (3-5%), and then manual restraint was performed, holding the skin of the dorsocervical region between the index and thumb fingers and fixing the tail between the little finger of the hand;
- Under inhalation anesthesia with isoflurane (3-5%) and manual restraint, the structures (common calcaneal tendon and tibial nerve) of the left hind limb (LHL) were compressed with a curved Kocher hemostat for 15 seconds (Fig. 2);
- The glycemic levels were checked: before the induction of the DM protocol by streptozotocin; seven days after disease induction and after DM induction and confirmation; after neurotendinous injury and the beginning of the therapeutic protocol; on the fifth and the last day of treatment, to confirm if the animals remained diabetic; the last glycemic measurement was performed before euthanasia to determine whether or not there was a reversal of the diabetic condition.
- At the end of the procedure, they were returned to their individual microisolators. After 24 hours of the traumatic injury, the animals were randomly redistributed between the groups and prepared for the beginning of the therapeutic protocols.

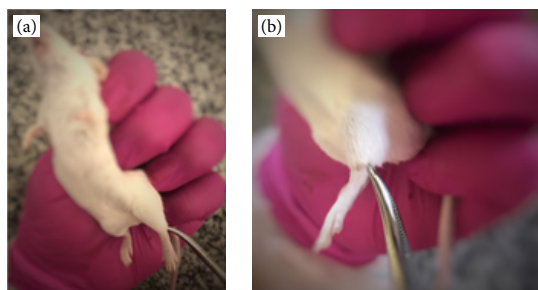


Figure 2 - Compression of local left hind limb structures (tibial nerve and common calcaneal tendon).
(a) Containment. (b) Local region compressed by the forceps.

Irradiation with low-intensity laser therapy

The animals in Groups 2 and 4 of subgroup I were submitted to a protocol of low-intensity, infrared laser therapy irradiation, through direct punctual application in the injured area in the LHL, at the frequency of one application daily for five consecutive days (Fig. 3). The therapeutic laser equipment used for the procedure was branded DMC Therapy EC.

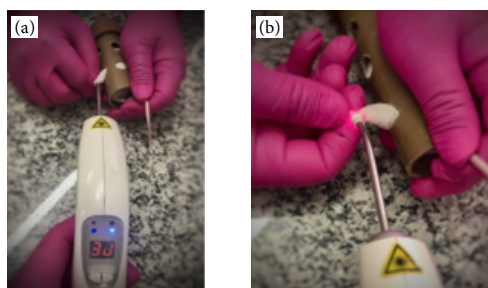


Figure 3 - Irradiation with low intensity laser therapy. (a) Parameter of energy and application. (b) – Direct punctual application. Parameters: 808 nm, continuous, 30 seconds, 100 mW, 3 J/cm², 3 J, 1 cm² area.

Intravascular laser irradiation of blood

The animals in Groups 2 and 4 of subgroup I were submitted to a protocol of intravascular blood irradiation with red laser, by means of direct punctual application in the region of the femoral artery of the limb contralateral to the lesion, at the frequency of one application daily, for five consecutive days, for a week (Fig. 4). The therapeutic laser equipment used for the procedure was branded DMC Therapy EC.

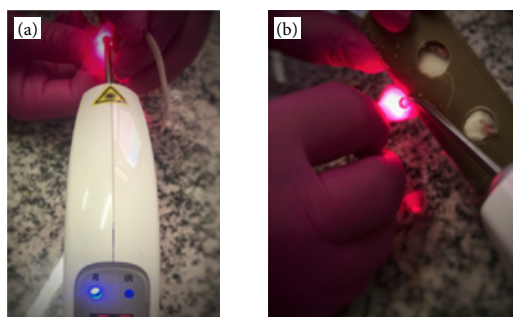


Figure 4 - Intravascular blood irradiation with laser. (a) Therapeutic laser equipment. (b) Direct punctual application in the femoral artery. Parameters: 660 nm, continuous, 360 seconds, 100 mW, 36 J/cm², 36 J, 1 cm² area.

Cryotherapy by immersion

The animals of Groups 2 and 4 of subgroup C were submitted to a protocol of cryotherapy by immersion, at the frequency of one application daily for five days, in a period of one week. The animal had its injured limb immersed in a container with water and ice, at an average temperature of 8-10°C for 1 minute (Fig. 5).

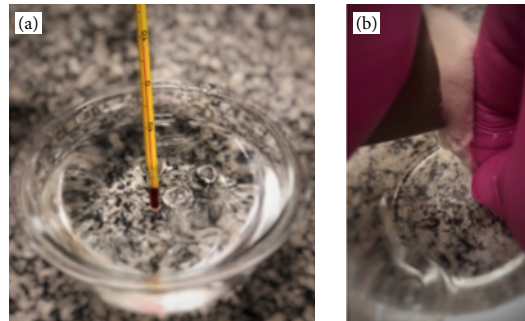


Figure 5 - Immersion cryotherapy. (a) Average temperature 8-10°C. (b) Animal submitted to the cryotherapy protocol.

Sample collection and processing

At the end of the experiment, the animals were euthanized with a lethal dose of anesthetic via i.p., ketamine (20 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg).

Portions of the tendon and nerve were collected. The piece containing the tendon and nerve was sent for histopathology, fixed in 10% formalin, and later processed for cutting at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin (HE).

Statistical analysis

All data were tabulated and expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). After characterizing the variables, based on the histopathological study, a descriptive study of the findings was carried out, in addition to verifying the possible relationships between the variables. Thus, a semiquantitative analysis of the data obtained in the histopathological analysis was performed, based on the images captured from the values were assigned for the analysis according to the frequency of characteristic cells of the inflammatory and healing process. Thus, it was considered:

- Very: 5;
- Frequent: 4;
- Regular: 3;
- Low: 2;
- Absent: 1.

The variables of glycemic levels and semiquantitative analysis of the sections of the anatomopathological pieces were statistically tested by means of one-way analysis of variance, with Tukey's post-test and Student's t-test, with significance level determined at $p \leq 0.05$, using the program BioEstat 5.3.

■ Results

The animal model of kidney disease associated with diabetes in *Mus musculus* mice allowed the study and comparative analysis of the effect of the application of different electrophysical resources in acute conditions in the face of tissue injury.

The glycemic data evaluated over the experimental period allowed us to observe that there were statistically significant differences in the groups at the analyzed moments. There were no statistically significant differences in glycemic levels between the healthy groups (G1, G2C, G2L, and G2I). Groups G3, G4C, G4L and G4I had statistically significant means higher than groups G1, G2C, G2L, and G2I, at moments M1, M2 and M3, with a significance level of $p \leq 0.05$. The G4I

(247.0±6.9) showed a statistically significant reduction in glycemic levels at the end of the therapeutic protocol when compared to the other groups G3 (353.3±9.1), G4C (361.3±15.9) and G4L (336.8±15.9). These data are presented in Table 1.

Table 1 - Weekly glycemic levels. Values expressed as mean ± SD*.

Groups	M0	M1	M2	M3	T Test
G1	117.5±18.0	123.6±16.7a	118.4±13.0a	134.4±20.5a	0.0424ns
G2C	113.5±17.2	126.0±21.0	118.3±14.9	130.6±14.5	0.0560ns
G2L	108.6±12.1	116.8±15.8	133.1±25.6	127.8±14.1	0.0007*
G2I	111.9±11.0	125.5±13.7	124.5±13.3	135.4±12.5	0.0055*
G3	120.0±8.1	229.7±4.6	296.7±5.3	353.3±9.1	0.0001*
G4C	131.0±20.1	221.8±10.6c	283.5±11.1c	361.3±15.9c	0.0001*
G4L	133.0±19.7	226.8±5.7d	258.5±13.2d	336.8±15.9d	0.0001*
G4I	115.2±11.8	265.8±15.6b	333.2±16.4b	247.0±6.9b	0.0001*
ANOVA	0.049ns	0.0001*	0.0001*	0.0001*	

SD: standard deviation; ANOVA: analysis of variance; *results are presented as mean ± SD of mean. Comparison's overtime: one-way repeated measures ANOVA, with Tukey's post-test. The letters expressed in the columns represent the differences in the glycemia of the animals at different times. Comparison between groups: a) statistically significant difference between G1 and G3; b) statistically significant difference between G3 and G4I; c) statistically significant difference between G4C and G4I; d) statistically significant difference between G4L and G4I. Comparisons between diabetic and non-diabetic animals at different times: Student's t-test. Statistical differences are indicated by *, p<0.05; ns: values without statistical differences (no significant).

In Fig. 6, it was observed that G2C (Fig. 6a) and G1 (Fig. 6b) presented better morphological analysis, with absence of inflammatory cells, focal areas of degeneration and a certain organization of collagen fibrils. The other groups, G2L (Fig. 6c) and G2I (Fig. 6d), showed mononuclear inflammatory infiltrate (predominantly activated macrophages) in almost all animals, a certain intensity of degeneration and nuclei of active fibroblasts in the peritendinous region. In none of the groups areas of necrosis observed.

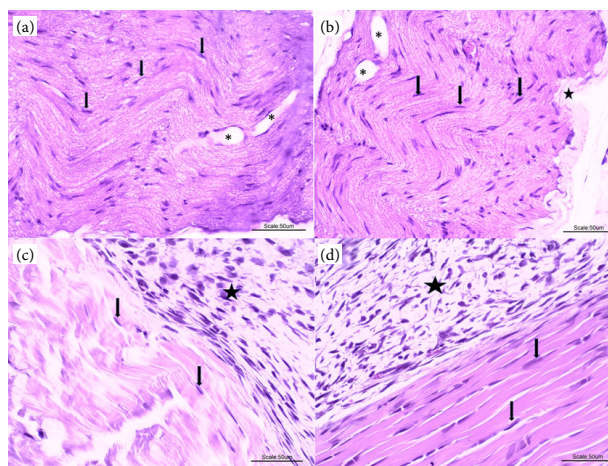


Figure 6 - (a) (G2C): Photomicrograph of a tendinous segment showing the presence of fibroblasts (arrows) in dense modeled connective tissue. (b) (G1): Tendon segment also showing fibroblast nuclei (arrows), dense connective tissue sheath (star) and areas of degeneration (asterisks). (c) (G2L) and (d) (G2I): Tendon segments showing area of mononuclear inflammatory infiltrate (star) and fibroblast nuclei (arrows). 40x magnification, hematoxylin and eosin staining.

Intensity of macrophages, infiltrate, reactive lymphoid tissue, fibroblasts, fibrosis, focal degeneration, and collagen organization were observed, with a significant difference between groups G1, G2C, G2L and G2I in all variables when compared with each other, with a significance level of $p \leq 0.05$ (Fig. 7).

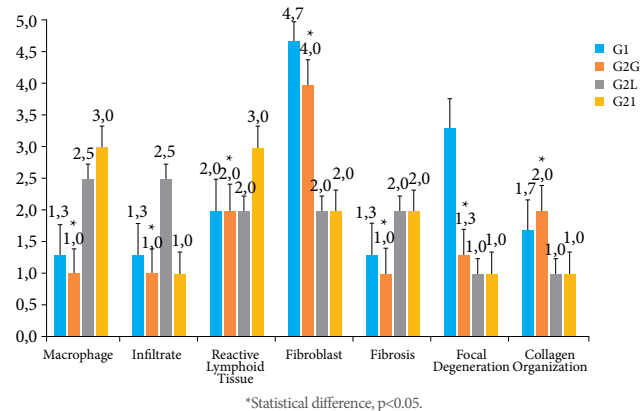


Figure 7 - Comparisons between groups: analysis of variance of one-way repeated measures, with Tukey's post-test. Representation of the semiquantitative analysis of the sections of the anatomopathological parts of the groups (G1, G2C, G2L and G2I). G2C presented better statistically significant results in relation to G1, G2L and G2I, illustrated by the star symbol. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation of mean.

In the descriptive qualitative histopathological analysis, it was possible to observe the patterns between the groups in relation to the organization of collagen fibers, presence of cellular tissue, inflammatory infiltrate, and signs of degeneration.

Figure 8 presents the histopathological results of animals with comorbidities. It was observed that G4I (Fig. 8c) presents a better morphological analysis, with a smaller number of inflammatory cells, present in focal areas, without areas of degeneration and some reorganization of collagen fibrils. The other groups, G4C (Fig. 8a), G4L (Fig. 8b) and G3 (Fig. 8d), showed in almost all animals a mononuclear inflammatory infiltrate (predominantly activated macrophages), in all histological sections, a certain intensity of degeneration, except in G4L, with active fibroblast nuclei, mainly in the peritendinous region. No areas of necrosis were observed in any of the groups.

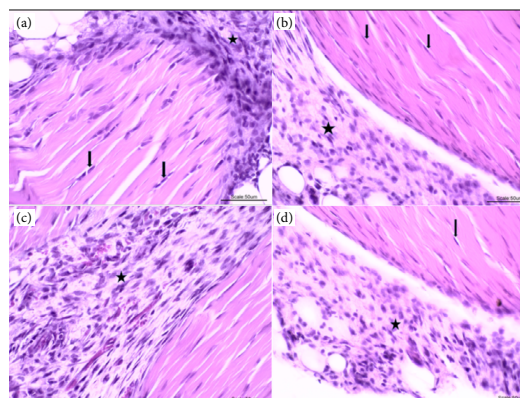


Figure 8 - (a) (G4C): Photomicrograph of a tendon segment showing the presence of fibroblasts (arrows) in dense patterned connective tissue and an area of peritendinous inflammatory infiltrate (star). (b) (G4L): Tendon segment also showing fibroblast nuclei (arrows) and area of peritendinous inflammatory infiltrate (star). (c) (G4I) Tendon segment with lower intensity of inflammatory cells (star). (d) (G3): Tendon segments showing area of mononuclear inflammatory infiltrate (star) and fibroblast nuclei (arrows). 40x magnification, hematoxylin and eosin coloring.

Significantly different intensity of macrophages, infiltrate, reactive lymphoid tissue, fibroblasts, fibrosis, focal degeneration, and collagen organization were observed between G3, G4C, G4L and G4I, indicating the presence of an inflammatory process and the beginning of the healing process after the injury. The G4I presented better statistically significant results in relation to the variables studied when compared to G3, G4C and G4L, with a significance level of $p \leq 0.05$. G4L also presented statistically significant better results when compared to G3 and G4C, when a lower intensity of reactive lymphoid tissue, fibrosis and focal degeneration were observed, with a significance level of $p \leq 0.05$. Figure 9 presents a graphical representation of these data.

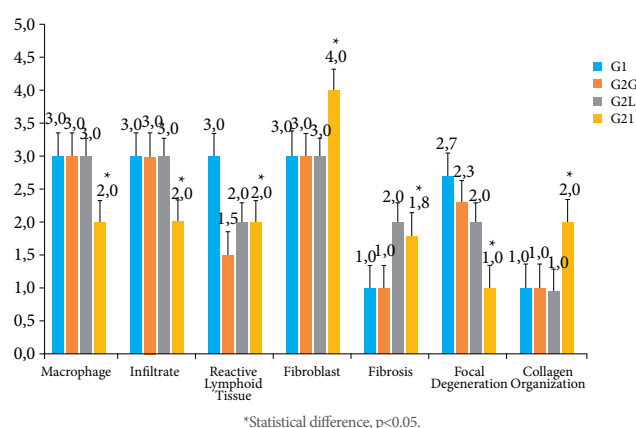


Figure 9 - Comparisons between groups: analysis of variance of one-way repeated measures, with Tukey's post-test. Representation of the semiquantitative analysis of the sections of the anatomopathological parts of the groups (G3, G4C, G4L and G4I). G4I presented better statistically significant results in relation to G3, G4C and G4L, illustrated by the star symbol. Results are presented as mean $\pm$ standard deviation of mean.

Discussion

The literature reports that the induction of the kidney disease model by ischemia and reperfusion, by compression of the renal pedicle, causes local injury to the kidney, that suffers ischemia, and also to the contralateral kidney by the metabolic responses of reperfusion¹¹.

Considering that the comorbidity models chosen in this study are, by themselves and separately, highly debilitating for the animals and of low survival, the association of the protocols in this study did not worsen the condition of life and/or survival after the installation of the illnesses.

The feasibility of using mice is due to the feasibility of producing their biological characteristics, in addition to having greater sensitivity to the use of streptozotocin. Previous studies allowed the effective induction of the kidney disease animal model in other animal species of the rodent class¹¹⁻¹³.

Patterns between groups were observed and described in relation to the organization of collagen fibers, presence of cellular tissue, inflammatory infiltrate, and signs of degeneration.

DM is a metabolic syndrome characterized, among other signs and symptoms, by hyperglycemia, in other words, high serum glucose. This, in turn, causes microvascular changes that affect various organs and tissues, mainly induced diabetic nephropathy, diabetic neuropathy, and diabetic retinopathy. The healing process of patients with DM is modified by several factors, resulting from the hyperglycemic condition, among them the suppression of inflammatory responses, decrease in

angiogenesis and growth factors, alteration in cell proliferation (keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells), increased cellular apoptosis and defects in collagen deposition. It is believed that the control of glycemic levels is essential to prevent the emergence of these complications. Therefore, it is necessary that the appropriate treatment is carried out correctly and as soon as possible^{14,15}.

During the normal tissue repair process, fibroblasts are stimulated to proliferate and migrate to the injury site in order to synthesize collagen to restore tissue integrity¹⁴. In this study, no significant differences were observed in glycemic levels between the healthy groups with lesions (G1, G2C, G2L and G2I), after the application of electrophysical resources, which suggests that the use of resources was not able to promote changes in the healthy organism at a systemic level.

The therapeutic protocol adopted for five consecutive days aimed to analyze the initial effects of the application of different electrotherapeutic resources: immersion cryotherapy, LLLT and ILIB, in the tissue healing process in healthy organisms and patients with kidney disease associated with DM. In the literature, there is still little described about the effects of the application of these resources, in view of the conditions of these associated metabolic disorders^{10,14}.

In this study, animals treated with LLLT showed similar results to animals in the control groups. G2L, of healthy animals with neurotendinous injury, treated with LLLT (808 nm, 3J/cm², 30 s, five consecutive days), at the end of the therapeutic protocol, presented mononuclear inflammatory infiltrate, with predominance of macrophages, small signs of degeneration, active fibroblasts nuclei, mainly in the paratendinous region, with some disorganization of collagen fibrils. These findings corroborate the study by Carvalho et al.¹, in which the investigators observed, at the end of a period of three days of consecutive treatment with LLLT (660 nm, 10 J/cm²), the presence of diffuse mononuclear inflammatory exudate, of granulation with moderate amount of newly formed vessels and disorganized arrangement of fibroblasts and collagen fibers. These results were also similar to G4L ones, a model of kidney disease and associated diabetes, which received LLLT treatment following the same therapeutic parameters and protocols, and the presence of persistent inflammatory infiltrate was also observed, with the presence of macrophages and minimal signs of degeneration, common to the diabetic picture.

In a review study performed by Tomé et al.⁸, treatment in diabetic patients with ILIB therapy was efficient in reducing serum glucose levels in patients with type 2 DM. The protocol adopted was the punctual application of red laser (630 nm) for 30 minutes for 14 consecutive sessions, and the patients had their glycemic levels measured by digital monitoring.

The cryotherapy protocol by immersion (60 s, 8-10°C, five consecutive days) adopted presented statistically significant results in the semiquantitative histopathological analysis when comparing G2C with G1, G2L and G1. The time chosen was sufficient to cool the area according to the literary findings. These corroborate the study by Furtado et al.¹⁰, who applied in their study the protocol of immersion in cold water for five consecutive days, after a single session of exhaustive exercise, with the temperature of 12°C, for 12 minutes, immersing the whole body. They also demonstrated that treatment with immersion in cold water after a session of intense exercise was able to decrease the formation and damage of ROS and increase cell viability, favoring a faster recovery of muscle tissue. When observing the disease model groups, there was no significant difference in relation to the other treated and untreated groups.

The choice of ILIB therapy in the present study was based on its prevalent use in diabetic patients, as shown in the review by Tomé et al.⁸. It was also observed that ILIB is capable of promoting reduction in the levels of pro-inflammatory interleukin 1 and interleukin 6 and increase in the levels of anti-inflammatory interleukin 10. In this study, we observed that, after the application of ILIB therapy, there was a statistically significant reduction in inflammatory parameters of G4I when compared to the other groups, with significance of $p \leq 0.05$. These results were compatible with the histopathological semiquantitative analysis, in which the same group presented better results regarding the tissue healing process, which enhances and contributes positively to the findings in the literature regarding the benefits of this innovative therapy.

In DM, there is low level serum insulin and high levels of fatty acids. These are oxidized by the liver, producing ketone bodies—acetone, acetoacetate and beta-hydroxybutyrate. This process reduces the production of arginine,

responsible for the release of insulin, glucagon, adrenal catecholamines, prolactin and growth hormone, deregulating endothelial cells and increasing pro-inflammatory cytokines. Therapy with ILIB has shown significant reduction in arginase and epidermal growth factor receptor, reduction of neuroinflammation and secondary damage according to the literature⁸.

The diversity and lack of alignment of parameters for the use of ILIB therapy make it difficult to standardize and recognize the best modes of application for the different systemic comorbidities. However, despite the heterogeneity between the parameters of use, studies have shown satisfactory results in the clinical condition of patients, with regard to the modulation of inflammation and reduction of levels of pro-inflammatory cytokines, as revealed in the study by Tomé *et al.*⁸.

Recent studies revealed that the application of ILIB therapy in chronic pathological conditions, such as diabetes and kidney injury, promoted beneficial effects in the clinical condition of these individuals, being associated with increased oxygen availability, reduction of carbon dioxide pressure, tissue removal hypoxia, normalization of tissue metabolism, release of cytokines, modulation of the production of growth factors, and development of new blood vessels⁹.

Razzaghi *et al.*⁹, in their study with patients with acute kidney injury, administered ILIB to patients (450 nm, 1.5 mW, continuous, 30 min), through a local catheter, for three sessions on alternate days, obtaining reduction in the levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in urine and plasma, and normal serum creatinine levels, indicating improvement in renal function.

This study suggests a beneficial effect of ILIB on the inflammatory and healing process of neurotendinous injury in a diabetic and renal model. The limitation of this study is the lack of description of the effects of the ILIB, as well as the fact that it is a device that does not allow changes in dosimetry. The other resources used are described in the literature, but, as an option for treatment and rehabilitation in patients with such comorbidities, there is no longer any therapeutic justification¹⁶.

The strengths of the experimental research were the design of the dual animal model of disease and the non-surgical protocol for neurotendinous injury, as well as the design of therapeutic protocols that allowed us to observe findings indicative of better tissue recovery rates in the phase of acute after application of immersion cryotherapy and ILIB therapy, when compared with application of LLLT.

The non-surgical protocol for neurotendinous injury, in a model of diseases commonly found as comorbidities for patient's recovery, as well as the design of therapeutic protocols from the daily clinic, allowed us to observe findings indicative of better tissue recovery rates in its acute phase. The lesion phase after application of immersion cryotherapy and ILIB therapy, when compared to the application of LLLT, are consistent with what is often observed in patients.

Both pathologies (DM + kidney disease) promote systemic metabolic changes, deficit in blood supply and reduction in oxygen supply, which negatively interfere in the healing process and tissue repair. Based on this assumption, it is necessary to carry out new studies at different times to verify the effects of resources in the long term.

■ Conclusions

Cryotherapy promoted reduction in inflammatory exudate and organization of collagen fibers, in addition to the absence of signs of tissue necrosis, in the groups treated with and without the disease.

ILIB therapy showed reduction in inflammatory exudate and organization of collagen fibers, in addition to the absence of signs of tissue necrosis in the group of sick animals. The animals in this group also showed significant reduction in glycemic levels during treatment.

The application of LLLT showed increased inflammatory exudate, low organization of collagen fibers and low sign of tissue degeneration and necrosis.

This study, in a model of associated diseases (DM and kidney disease) whose effects of electrophysical resources studied after neurotendinous injury, allowed us to verify histopathological variables suggestive of patients with the same comorbidities.

■ Authors' contribution

Scientific and intellectual content of the study: Silva PH; **Analysis and interpretation of data:** Silva PH and Silva IS; **Technical procedures:** Silva PH and Silva IS. **Manuscript preparation:** Silva PH and Silva IS; **Manuscript writing:** Silva PH and Silva IS; **Histopathological examinations:** Facco GG. **Critical revision:** Corazza AV, Silva IS and Silva JG; **Final approval of the version to be published:** Silva IS, and Silva JG.

■ Data availability statement

Data will be available upon request.

■ Funding

Not applicable.

■ Acknowledgments

To the team at the Laboratory of Experimental Models of Disease, Laboratory of Assistive Technology and Biomedical Engineering at UFMS for help and support; and to Dr. Gilberto Gonçalves Facco for his assistance in the histopathological analyses.

■ References

1. Carvalho AF, Feitosa MC, Coelho NP, Rebêlo VC, Castro JG, Sousa PR, et al. Low-level laser therapy and *Calendula officinalis* in repairing diabetic foot ulcers. *Rev Esc Enferm USP*. 2016;50(4):628-34. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420160000500013>
2. Valencia WM, Florez H. How to prevent the microvascular complications of type 2 diabetes beyond glucose control. *BMJ*. 2017;356:i6505. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6505>
3. Denadai AS, Aydos RD, Silva IS, Olmedo L, Cardoso BM, Silva BA, et al. Acute effects of low-level laser therapy (660 nm) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. *J Exp Ther Oncol*. 2017;11(2):85-9.
4. Nascimento OJ, Pupe CC, Cavalcanti EB. Neuropatia diabética. *Rev Dor*. 2016;17(Supl. 1):46-51. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160047>
5. Pieber K, Herceg M, Paternostro-Sluga T. Electrotherapy for treatment of painful diabetic peripheral neuropathy: a review. *J Rehabil Med*. 2010;42(4):289-95. <https://doi.org/10.2340/16501977-0554>
6. Zhong JM, Lu YC, Zhang J. Dexmedetomidine reduces diabetic neuropathy pain in rats through the Wnt 10a/β-catenin signaling pathway. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9043628. <https://doi.org/10.1155/2018/9043628>
7. Chaves ME, Araújo AR, Piancastelli AC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER × LED. *An Bras Dermatol*. 2014;89(4):616-23. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142519>
8. Tomé RF, Silva DF, Santos CA, Neves GV, Rolim AK, Gomes DQ. ILIB (intravascular laser irradiation of blood) as an adjuvant therapy in the treatment of patients with chronic systemic diseases – an integrative literature review. *Lasers Med Sci*. 2020;35(9):1899-907. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03100-4>
9. Razzaghi MR, Ghanei E, Malekian S, Mazloomfard MM. Intravenous laser therapy in patients with acute kidney injury: a randomized clinical trial. *J Lasers Med Sci*. 2021;12:e49. <https://doi.org/10.34172/jlms.2021.49>
10. Furtado AB, Hartmann DD, Martins RP, Rosa PC, Silva IK, Duarte BS, et al. Cryotherapy: biochemical alterations involved in reduction of damage induced by exhaustive exercise. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(11):e7702. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187702>

11. Bazzano T, Restel TI, Porfírio LC, Souza AS, Silva IS. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2015;30(4):277-88. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150040000007>
12. Togoe EB, Silva IS, Cury JL, Souza AS, Borges JH, Saturnino KC. Animal model of chronic kidney disease using a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion in White New Zealand rabbits. *Acta Cir Bras.* 2014;29(10):651-7. <https://doi.org/10.1590/s0102-8650201400160005>
13. Togoe EB, Silva IS, Cury JL, Guarnier FA. Muscle changes with high-intensity aerobic training in animal model of renal disease. *Acta Cir Bras.* 2019;34(5):e201900503. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020190050000003>
14. Carvalho PT, Silva IS, Reis FA, Pereira DM, Aydos RD. Influence of ingaalp laser (660 nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. *Acta Cir Bras.* 2010;25(1):71-9. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502010000100016>
15. Aviz GB, Santos FM, Azevedo VD, Silva GG, Furtado LL. Avaliação da qualidade de vida e perfil socioeconômico em diabéticos insulino-dependentes. *J Health NPEPS.* 2021;6(1):47-61. <https://doi.org/10.30681/252610104630>
16. Menezes MR, Alves-Silva EG, Santana EC, Mendes VC. Estudos clínicos randomizados dos benefícios e limitações do Irradiation Laser Intravenous of Blood (ILIB) na odontologia: revisão integrativa. *Res Soc Dev.* 2021;10(2):e30910212576. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12576>

ANEXO C – Confirmação de submissão de Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Autorial)

ScholarOne Manuscripts

06/02/2022 19:39

ScholarOne Manuscripts™

Pâmela SilvaInstructions & FormsHelp

 Acta Cirúrgica Brasileira

[Home](#) [Author](#)

Author Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to Acta Cirúrgica Brasileira

Manuscript ID ACB-2022-0043

Title EXPERIMENTAL MODEL OF ASSOCIATED DIABETES MELLITUS AND KIDNEY DISEASE IN MICE

Authors Silva, Pâmela
Henrique Silva, Patrícia
Corazza, Adalberto
da Silva, Josivaldo
Silva, Iandara

Date Submitted 06-Feb-2022

Author De

ANEXO D – Confirmação de submissão de Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira (Segunda Autora)

ScholarOne Manuscripts

20/04/2022 11:09

ScholarOne Manuscripts™

Patricia Henrique SilvaInstructions & FormsHelp

 Acta Cirúrgica Brasileira

[Home](#) [Author](#)

Author Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation

Thank you for your revision

Submitted to	Acta Cirúrgica Brasileira
Manuscript ID	ACB-2022-0049.R2
Title	EFFECT OF ELECTROPHYSICAL RESOURCES ON HEALING OF NEUROTENDINOUS INJURY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TYPE-I DI AND KIDNEY DISEASE
Authors	Henrique Silva, Patricia Silva, Pâmela Facco, Gilberto Gonçalves Corazza, Adalberto da Silva, Josivaldo Silva, Iandara
Date Submitted	20-Apr-2022

Author De

**ANEXO E – Confirmação de aceite de Artigo para Publicação na Revista Acta
Cirúrgica Brasileira (Autorial)**

Decision Letter (ACB-2022-0049)

From: actacirbras@gmail.com

To: pamelahenrique1998@gmail.com

CC:

Subject: Acta Cirúrgica Brasileira - Decision on Manuscript ID ACB-2022-0049

Body: 06-Mar-2022

Dear Ms. Silva:

Manuscript ID ACB-2022-0049 entitled "EFFECT OF ELECTROPHYSICAL RESOURCES ON TISSUE HEALING IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TYPE-I DIABETES AND KIDNEY DISEASE" which you submitted to the Acta Cirúrgica Brasileira, has been reviewed. The comments of the reviewer(s) are included at the bottom of this letter.

The reviewer(s) have recommended publication, but also suggest some revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

To revise your manuscript, log into <https://mc04.manuscriptcentral.com/acb-scielo> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision.

You may also click the below link to start the revision process (or continue the process if you have already started your revision) for your manuscript. If you use the below link you will not be required to login to ScholarOne Manuscripts.

*** PLEASE NOTE: This is a two-step process. After clicking on the link, you will be directed to a webpage to confirm. ***

https://mc04.manuscriptcentral.com/acb-scielo?URL_MASK=2009685ccdc643248d8cc40e41ba6a29

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Center.

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to the Acta Cirúrgica Brasileira, your revised manuscript should be submitted by 22-Mar-2022. If it is not possible for you to submit your revision by this date, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to the Acta Cirúrgica Brasileira and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Prof. Edna Montero
Editor-in-Chief, Acta Cirúrgica Brasileira
actacirbras@gmail.com

ANEXO F – Confirmação de aceite de Artigo para Publicação na Revista Acta
Cirúrgica Brasileira (Segunda Autora)

Decision Letter (ACB-2022-0049.R2)

From: actacirbras@gmail.com

To: pamelahenrique1998@gmail.com

CC:

Subject: Acta Cirúrgica Brasileira - Decision on Manuscript ID ACP-2022-0049.R2

Body: 12-May-2022

Dear Ms. Silva:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EFFECT OF ELECTROPHYSICAL RESOURCES ON HEALING OF NEUROTENDINOUS INJURY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TYPE-I DIABETES AND KIDNEY DISEASE" in its current form for publication in the Acta Cirúrgica Brasileira.

The comments of the reviewers who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter and will be asked by our publishing team.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Acta Cirúrgica Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Edna Montero
Editor-in-Chief, Acta Cirúrgica Brasileira
actacirbras@gmail.com

Reviewer Comments:

The article has improved a lot. However, both the conclusion of the abstract and the conclusion of the text speak of the model. The objective of the study was to evaluate and describe the effect of electrophysical resources laser therapy (LLLT), intravascular laser blood irradiation (ILIB) and cryotherapy on the healing process of neurotendinous injury, as well as possible systemic changes, in the experimental model of type 1 diabetes associated with kidney injury.

The objective was not to evaluate the model.
They could talk about it in the discussion.

Figure 2b is still of poor quality and figures 6 and 7 lack the legends for → and *

Date Sent: 12-May-2022

ANEXO G – Confirmação de aceite de Artigo para Publicação na Revista Acta Cirúrgica Brasileira com volume e iss do artigo (Segunda Autora)

ScholarOne Manuscripts™
Pâmela Silva ▾ | Instructions & Forms | Help | Log Out

Acta Cirúrgica Brasileira

Home
Author

Author Dashboard

Author Dashboard

1 Submitted Manuscripts >

3 Manuscripts with Decisions >

4 Manuscripts I Have Co-Authored >

Start New Submission >

Legacy Instructions >

5 Most Recent E-mails >

Manuscripts I Have Co-Authored

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Montero, Edna	ACB-2022-0049.R2	EFFECT OF ELECTROPHYSICAL RESOURCES ON HEALING OF NEUROTENDINOUS INJURY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TYPE-I DIABETES AND KIDNEY DISEASE View Submission Submitting Author: Henrique Silva, Patrícia	20-Apr-2022	20-Apr-2022
Accept (12-May-2022) vol:37, iss:4 Contact Journal				
ADM: Montero, Edna	ACB-2022-0049.R1	EFFECT OF ELECTROPHYSICAL RESOURCES ON TISSUE HEALING IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TYPE-I DIABETES AND KIDNEY DISEASE View Submission Submitting Author: Henrique Silva, Patrícia	05-Apr-2022	05-Apr-2022
Major Revision (07-Apr-2022) a revision has been submitted Contact Journal				