

Antagonista (p425) do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) melhora as alterações histopatológicas e funcionais renais em ratos diabéticos

Macrophage migration inhibitory factor antagonist (p425) ameliorates kidney histopathological and functional changes in diabetic rats

Autores

Jamal Khalilpour²

Shiva Roshan-Milani^{2, 4}

Farzaneh Hosseini Gharalarj^{1, 3}

Amin Abdollahzade Fard^{1, 2, 4}

¹Urmia University of Medical Sciences, Nephrology and Kidney Transplant Research Center, Urmia, Iran

²Urmia University of Medical Sciences, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia, Iran

³Urmia University of Medical Sciences, Department of Pathology, Emam Hospital, Urmia, Iran

⁴Urmia University of Medical Sciences, Neurophysiology Research Center, Urmia, Iran.

Data de submissão: 26/08/2018.

Data de aprovação: 30/10/2018.

Correspondência para:

Amin Abdollahzade Fard.

E-mail: af.amin@yahoo.com.

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2018-0184

RESUMO

Introdução: Supõe-se que elevações da expressão do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) possam contribuir para a patogênese da nefropatia diabética (ND). O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos renais da inibição do MIF em um modelo experimental diabético. **Métodos:** Dezoito ratos Wistar machos (230 ± 20g) foram divididos em três grupos: 1) controle, 2) diabético (STZ 50 mg/kg dissolvida em soro fisiológico, IP), 3) diabético + antagonista do MIF (p425 1 mg/kg por dia IP no 21o dia por 21 dias consecutivos). O tratamento começou após a identificação de aumento significativo na albuminúria nos ratos diabéticos em relação aos controles. Os ratos foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas (8h-14h) e amostras de urina foram colhidas no 21o e no 42o dia. Ao final do estudo, amostras de sangue e tecido foram colhidas para análises bioquímicas (BS, excreção urinária de proteína, excreção urinária de GAGs, BUN, Cr, Na e K) e histológicas. **Resultados:** O presente estudo demonstrou que o antagonista do MIF (p425) diminuiu significativamente proteinúria, excreção urinária de GAGs, relação proteína/creatinina na urina, BUN e Cr no grupo com ND induzida por estreptozotocina. As alterações patológicas foram significativamente abrandadas nos ratos com ND que receberam antagonista do MIF (p425). **Conclusão:** Coletivamente, os dados sugerem que o antagonista do MIF (p425) teve efeito protetor contra lesões funcionais e histopatológicas da ND.

Palavras-chave: Fatores Inibidores da Migração de Macrófagos; Nefropatias Diabéticas; Ativação de Macrófagos; Proteinúria; Glicosaminoglicanos.

ABSTRACT

Introduction: It is hypothesized that increased macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression may contribute to diabetic nephropathy (DN) pathogenesis. The aim of the present study was to investigate the renal effects of MIF inhibition in a diabetic experimental model. **Methods:** Eighteen male Wistar rats (230 ± 20 g) were divided into three groups: 1) control, 2) diabetic (STZ, 50 mg/kg, dissolved in saline, ip), 3) diabetic + MIF antagonist (p425, 1 mg/kg per day, ip, on the 21th day, for 21 consecutive days). The treatment started since we found a significant increase in urine albumin excretion (UAE) rate in the diabetic rats in comparison with the control rats. The rats were kept individually in metabolic cages (8 AM-2 PM) and urine samples were collected in the 21 and 42th day. At the end, blood and tissue samples were collected for biochemical (BS, UPE, urine GAG, BUN, Cr, Na, and K) and histological analyses. **Results:** The results of this study showed that MIF antagonist (p425) significantly decreased urine protein and GAG excretion, urine protein/creatinine ratio, and serum BUN and Cr in the streptozotocin-induced DN in the rats. Pathological changes were significantly alleviated in the MIF antagonist (p425)-administered DN rats. **Conclusion:** Collectively, these data suggested that MIF antagonist (p425) was able to protect against functional and histopathological injury in the DN.

Keywords: Macrophage Migration-Inhibitory Factors; Diabetic Nephropathies; Macrophage Activation; Proteinuria; Glycosaminoglycans.

INTRODUÇÃO

A nefropatia diabética (ND) é a causa mais comum de doença renal crônica e figura como uma das complicações de longo prazo mais importantes da diabetes. Embora a ND seja convencionalmente vista como uma doença não imune, inúmeras evidências demonstram que o mecanismo inflamatório pode desempenhar um papel fundamental em seu desenvolvimento e progressão.¹⁻³

Vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da ND, incluindo fatores genéticos, estresse oxidativo⁴ hiperfiltração glomerular,⁵ acúmulo de produtos de glicação avançada (AGEs)⁶ e superexpressão do fator de crescimento transformante β (TGF- β), seguido de aumento das matrizes extracelulares.⁷

A membrana basal glomerular (MBG) é composta principalmente de laminina, colágeno tipo IV e proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG). A degradação desses componentes resulta na ruptura da estrutura da membrana basal. Os proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) são abundantes nas matrizes extracelulares (MECs) e nas membranas basais, e são compostos por diversos polipeptídeos nucleares e HS.^{8,9}

O HS mantém a integridade mecânica das membranas basais glomerulares. A digestão direta através da heparitinase existente nas membranas basais glomerulares resulta em perda de função da membrana.¹⁰ Relatos indicam perda de HSPG nas matrizes extracelulares glomerulares de pacientes com ND.¹¹ Elevações dos níveis urinários e plasmáticos de heparanase foram relatados em diabetes tipo 2. Na ND, a elevação da heparanase urinária e de sua atividade como endoglicosidase que cliva especificamente a HS nas cadeias laterais da HSPG foram observadas em pacientes com diabetes tipo 1 e 2 com proteinúria.^{12,13} Portanto, a perda de HS na membrana basal glomerular resulta em diminuição da barreira de carga aniônica, o que a torna, possivelmente, uma das principais causas de albuminúria na ND.^{14,15}

As células inflamatórias, e principalmente os macrófagos, estão presentes nos glomérulos e no interstício de pacientes com ND, sugerindo que o processo inflamatório também esteja imbricado no desenvolvimento da ND.^{16,17} Atividade da heparanase foi relatada em macrófagos, plaquetas, neutrófilos, monócitos, células de Langerhans e várias outras células.¹⁸⁻²³ Supõe-se que a heparanase secretada ou associada à membrana seja responsável pela degradação da MEC. O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é a primeira molécula a chegar ao local da inflamação, provavelmente determinando também o grau de inflamação celular.²⁴ O MIF foi correlacionado com ambos os tipos de diabetes,²⁵ e

evidências indicam ligações entre MIF e ND. Além disso, o MIF também encontra-se elevado em ND experimental²⁶ antes do início da microalbuminúria.²⁷ Acredita-se que o aumento da expressão do MIF possa contribuir para a patogênese da ND. O presente estudo investigou os efeitos renais da inibição do MIF em um modelo diabético experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Dezoito ratos machos Wistar com 10 semanas de idade, pesando 230 ± 20 g, foram recrutados junto ao biotério da Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Irã. Todos os procedimentos realizados com os animais foram conduzidos de acordo com os Princípios para Cuidados com Animais de Laboratório (publicação nº 85-23 do NIH, revisada em 1985) e aprovados pelo Comitê de Ética da Urmia University of Medical Sciences. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz/escuridão de 12/12 h. Eles foram alimentados com ração padrão e água. Os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos (seis animais cada): Grupo 1 - controle saudável (injeção IP de 0,2 mL de soro fisiológico); Grupo 2 - diabético; e Grupo 3 - diabético tratado com antagonista do MIF (p425, 1 mg/kg IP diariamente).

Nos animais do grupo diabético, a patologia foi induzida por meio de uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ 50 mg/kg de peso corporal dissolvida em soro fisiológico). Os ratos no grupo de controle receberam injeção de soro fisiológico. Cinco dias após a injeção de STZ, os níveis de glicemia de jejum foram determinados com um glicosímetro. Ratos com glicemia acima de 200 mg/dL foram definidos como diabéticos. O inibidor do MIF (p424) foi dissolvido em soro fisiológico. O tratamento foi iniciado 21 dias após a injeção de STZ, sendo assim considerado como primeiro dia de tratamento. O tratamento prosseguiu diariamente por três semanas.

A partir da terceira semana após a indução diabética, os ratos foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas (8h-14h) e amostras de urina foram colhidas para dosagem de 6 h de excreção urinária de proteína e creatinina urinária. Os resultados revelaram um aumento significativo na albuminúria dos ratos diabéticos em comparação aos controles, o que os caracterizou como portadores de nefropatia.

Ao final da sexta semana, os ratos foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas (8h-14h) e amostras de urina de 6h foram colhidas para análise

bioquímica. Posteriormente, seis ratos de cada grupo foram sacrificados sob anestesia com éter. Amostras de sangue e tecidos foram colhidas.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca para dosagem de Na, K, BUN e creatinina (Cr). BUN sérico e creatinina foram medidos usando analisador automático e as concentrações séricas de Na e K foram medidas por fotometria de chama. Amostras de urina de 6 h também foram colhidas para a dosagem de BUN, Cr, excreção urinária de proteína e glicosaminoglicanos urinários (GAGs).

A excreção urinária de proteína foi determinada por kit de teste (Pars Azmon, Irã) e medida por reação quantitativa com verde de bromocresol²⁸ utilizando albumina de soro bovino como padrão. Alíquotas de 10 µL da amostra e padrão foram misturados separadamente em 1 mL de verde de bromocresol e, em seguida, a absorvância foi lida a 625 nm.

Os glicosaminoglicanos urinários foram medidos por espectrofotometria com comprimento de onda de 520 nm nas amostras de urina de 6h, pelo método colorimétrico descrito por Jong²⁹ com 1,9 azul de dimetileno e heparan sulfato de rim bovino como padrão (Sigma Cat No H7640).

ESTUDO HISTOLÓGICO

Após a coleta da amostra de sangue, o rim direito foi excisado e armazenado em formaldeído a 10%. Cortes de rim (5 µm) foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS) e tricrômico de Masson para análise histológica e morfométrica. O acúmulo de matriz mesangial foi caracterizado por coloração PAS-positiva em áreas do anucleadas do mesângio. A matriz mesangial foi avaliada em 30 glomérulos selecionados aleatoriamente e caracterizados numericamente de maneira cega em uma escala de 0 a 4, onde 0 = 0-5%, 1 = 0,5-25%, 2 = 0,25-50%, 3 = 0,50-75 % e 4 = 0,75% de deposição. Os escores revelaram variações na extensão, mas não na intensidade da coloração.³⁰ O “índice esclerótico” faz referência ao escore

médio. A deposição de colágeno foi medida pelo método tricrômico de Masson realizado em 30 glomérulos, avaliada de maneira cega usando o sistema citado acima e relatada como unidade arbitrária.^{30,31} Os dados foram então relatados como índice esclerótico médio e escore de colocação do colágeno glomerular para cada grupo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram relatados como a média ± DP. A significância estatística das diferenças foi avaliada por ANOVA fator único no SPSS (versão 18; SPSS Inc., Chicago, EUA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Análises de regressão linear foram aplicadas para avaliar a relação entre as duas variáveis.

RESULTADOS

EFEITOS DO p425 SOBRE BUN SÉRICO, CREATININA, K E NA

Como exibido na Tabela 1, foram observados aumentos significativos nos níveis séricos de BUN, Cr e K dos ratos com ND em relação aos controles (*p* < 0,001; *p* < 0,001; e *p* < 0,05, respectivamente). Contudo, não houve diferença significativa na concentração sérica de Na entre os grupos. A administração do antagonista do MIF (p425) no grupo com ND reduziram de forma significativa o BUN sérico e a Cr (*p* < 0,01 e *p* < 0,05, respectivamente). Coletivamente, os dados sugeriram que o p425 produziu efeito protetor contra as lesões causadas pela ND.

EFEITOS DO p425 SOBRE A GLICEMIA

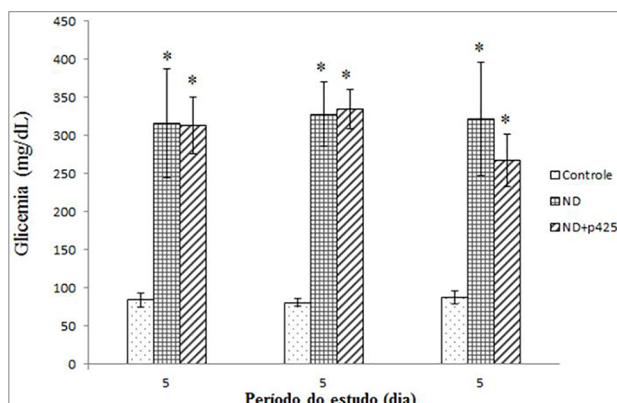
A Figura 1 mostra que no 5º, 21º e 42º dias do estudo de seis semanas os níveis de glicemia do grupo de controle foram 84,4 ± 8,9, 81,2 ± 5,1 e 87,7 ± 8,7 mg/dL, respectivamente. Os animais com ND apresentaram níveis significativamente elevados (316,4 ± 72,1, 328,1 ± 42,3 e 321,6 ± 74,3 mg/dL, respectivamente; *p* < 0,001). A elevação da glicemia permaneceu estável ao longo do tempo. A administração de p425 no grupo com ND no período do estudo de 42 dias

TABELA 1 NÍVEIS SÉRICOS DE CREATININA, BUN, SÓDIO E POTÁSSIO NOS GRUPOS DO ESTUDO

Grupo	Creatinina (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Na (meq/L)	K (meq/L)
Controle	0,45 ± 0,1	13,3 ± 2,3	139,5 ± 4,8	4,2 ± 0,4
ND	1,04 ± 0,2*	26,1 ± 4*	141,2 ± 3,2	5,3 ± 0,6*
ND +p425	0,61 ± 0,1†	18,2 ± 1,9†	139 ± 4,7	4,6 ± 0,5

Valores exibidos como média ± DP. DN (nefropatia diabética), p425 (antagonista do MIF) * e † indicam diferença significativa em relação aos grupos de controle e ND, respectivamente (*p* < 0,05).

Figura 1. Glicemia no 5º, 21º e 42º dia do período do estudo. Os valores são exibidos como média ± DP. ND: Nefropatia Diabética; p425: antagonista do MIF. *indica diferença significativa em relação ao grupo de controle ($p < 0,001$).



reduziu a glicemia em comparação com o grupo com ND que não recebeu p425, embora a alteração não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 1).

EFEITOS DO P425 SOBRE GAGs URINÁRIOS

Ao final do período de seis semanas do estudo, os níveis de GAGs urinários de 6 horas foram significativamente mais elevados nos ratos com ND em comparação aos controles saudáveis ($p < 0,001$). Contudo, o grupo que recebeu antagonista do MIF (p425) apresentou excreção significativamente menor de GAGs do que os ratos com ND não tratados ($p < 0,001$, Tabela 2).

EFEITOS DO P425 SOBRE A EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNA E RELAÇÃO PROTEÍNA/CREATININA (RPC):

Ao final do período de três semanas do estudo, o nível de excreção urinária de proteína de 6 horas foi de $8,8 \pm 2,4$, $50 \pm 14,6$ e $48,6 \pm 18$ mg/6h entre os controles saudáveis, controles diabéticos e controles diabéticos tratados, respectivamente. A excreção urinária de proteína aumentou significativamente nos ratos diabéticos ($p < 0,01$). O nível de excreção urinária de proteína de 6 horas permaneceu elevado ao longo do tempo no grupo com ND em relação aos controles ($p < 0,001$). No entanto, a administração do antagonista do MIF (p425) reduziu significativamente a excreção urinária de proteína de 6h ($p < 0,001$) no grupo com ND em comparação ao grupo com ND não tratado (Tabela 2). Os resultados indicaram um efeito de melhoria do p425 no grupo com ND induzida

por STZ, evidenciado por queda significativa ($p < 0,001$) na RPC na urina (Figura 2).

CORRELAÇÃO ENTRE PROTEÍNA URINÁRIA E EXCREÇÃO URINÁRIA DE GLICOSAMINOGLICANOS

Houve correlação significativa entre excreção urinária de proteína e excreção urinária de glicosaminoglicanos ($r = 0,89$, $p < 0,001$) em todos os grupos do estudo (Figura 3).

Figura 2. Relação proteína/creatinina na urina. Os valores são exibidos como média ± DP. ND: Nefropatia Diabética; p425: antagonista do MIF; * e † indicam diferença significativa em relação aos grupos de controle e ND, respectivamente ($p < 0,001$).

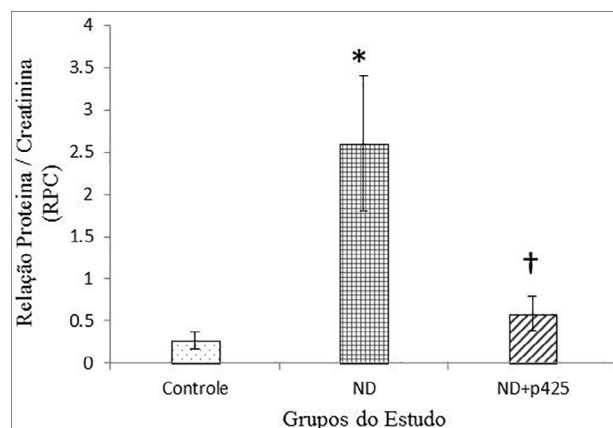
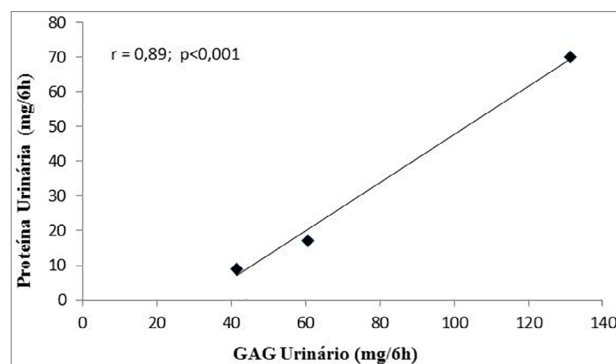


Figura 3. Curvas da regressão linear representando proteína e glicosaminoglicanos urinários nos ratos normais e diabéticos ($r = 0,89$ e $p < 0,001$).



EFEITOS DO P425 SOBRE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS APÓS LESÃO POR ND

As Figuras 4 e 5 mostram que a ND levou a lesão tubular caracterizada por acentuado descolamento

TABELA 2 NÍVEIS URINÁRIOS DE CREATININA, PROTEÍNA E GLICOSAMINOGLICANOS (GAG)

Grupo	Cr U (mg/dl)	Prot. U 21 (mg/6h)	Prot. U 42 (mg/6h)	GAG (mg/6h)
Controle	33,9 ± 4,8	8,8 ± 2,4	9,4 ± 2,6	41,6 ± 6,8
ND	26,9 ± 7,2	50 ± 14,6*	70 ± 2,4*	131,2 ± 19,2*
ND +p425	29,4 ± 7,7	48,6 ± 18,3*	17,4 ± 8,4†	60,8 ± 12†

Valores exibidos como média ± DP. DN (nefropatia diabética), p425 (antagonista do MIF) Prot. U 21 e 42 (proteína urinária no 21o e 42o dia). * e † indicam diferença significativa em relação aos grupos de controle e ND, respectivamente ($p < 0,01$).

tubular renal, necrose tubular e perda de borda em escova, além de aumento da área de superfície glomerular, expansão mesangial, espessamento da MBG e da cápsula de Bowman e aumento da deposição de proteínas da matriz na matriz mesangial. O “índice esclerótico”, que reflete o acúmulo de matriz glomerular, aumentou nos ratos com ND não tratados em relação aos controles saudáveis ($2,73 \pm 0,17$ vs. $0,2 \pm 0,07$, três semanas após o início da albuminúria, $p < 0,001$), mas sofreu queda significativa ($1,17 \pm 0,16$, $p < 0,001$) com tratamento com p425 (Figura 4). A deposição de colágeno no glomérulo foi acentuadamente reduzida no

grupo com ND após tratamento com p425 ($2,37 \pm 0,11$ vs. $0,57 \pm 0,09$, $p < 0,001$ Figura 5). Como mostrado nas Figuras 4 e 5, as alterações patológicas citadas acima foram significativamente reduzidas nos ratos com ND tratados com p425.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o antagonista do MIF (p425) reduziu a proteinúria e a excreção urinária de GAGs e preveniu o espessamento da membrana basal glomerular e o acúmulo de MEC nos ratos com ND induzida por STZ. Houve

Figura 4. Fotomicrografias de tecidos renais corados pelo método PAS. ND: Nefropatia Diabética; p425: antagonista do MIF. As setas mostram o acúmulo de matriz mesangial em áreas livres de núcleos do mesângio nos glomérulos. O “índice esclerótico” se refere ao escore médio \pm EP. Os escores refletem variações no grau e não na intensidade da coloração. * e † indicam diferença significativa em relação aos grupos de controle e ND, respectivamente ($p < 0,001$). Ampliação: 400x.

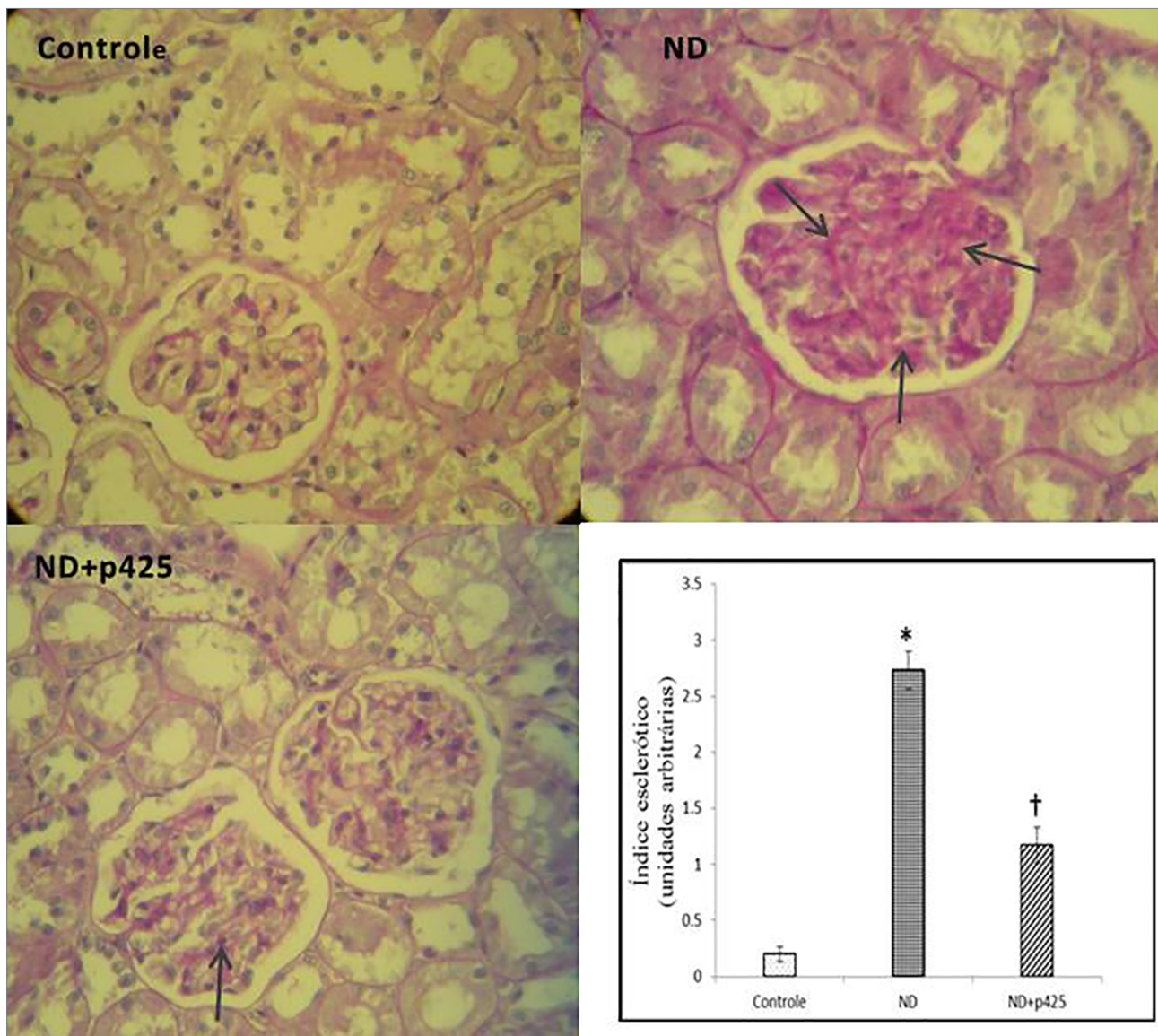
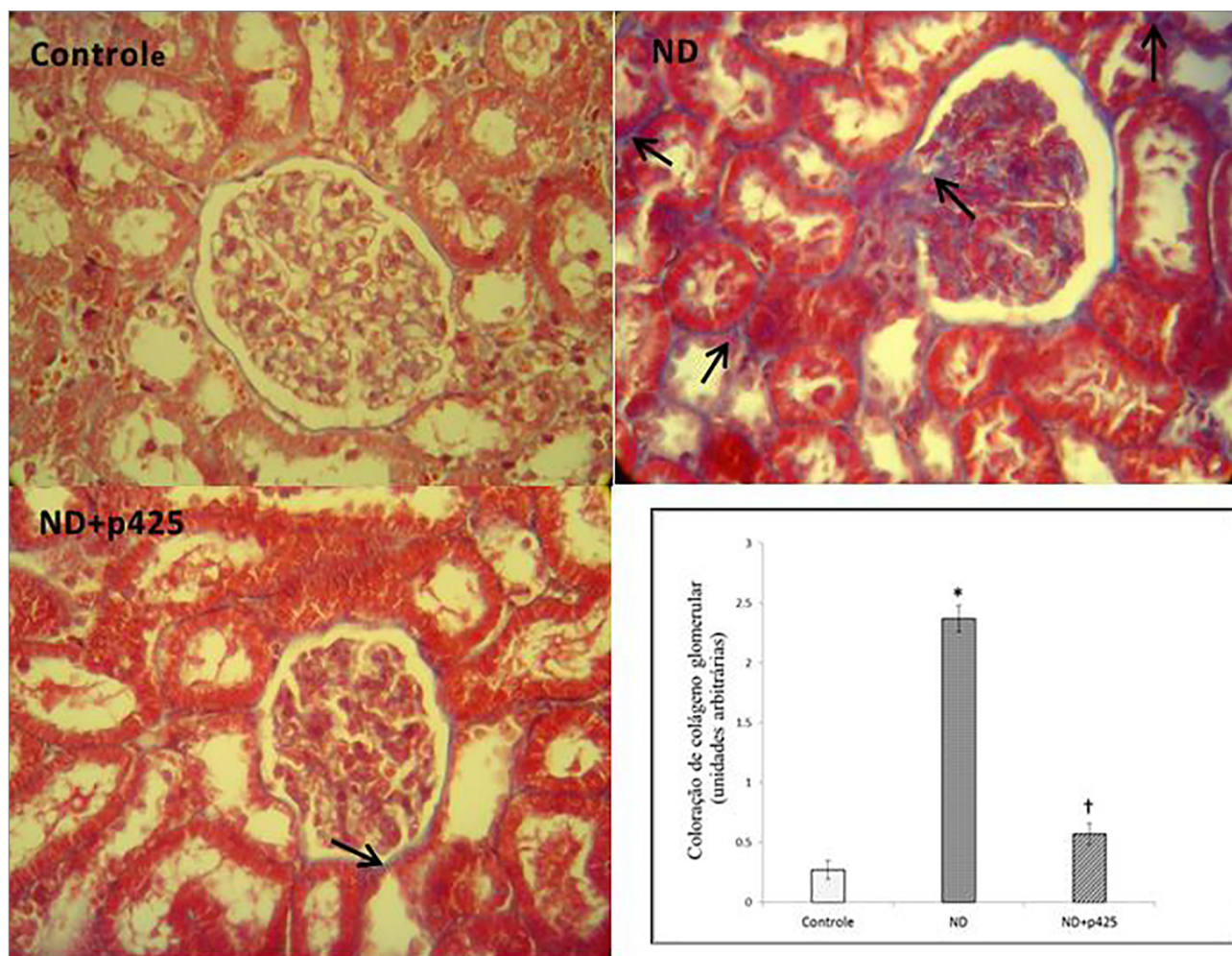


Figura 5. Fotomicrografias de tecidos renais corados pelo método tricrômico de Masson. ND: Nefropatia Diabética; p425: antagonista do MIF. As setas mostram a deposição de colágeno. A "deposição glomerular de colágeno" se refere ao escore médio \pm EP. * e † indicam diferença significativa em relação aos grupos de controle e ND, respectivamente ($p < 0,001$). Ampliação: 400x.



um aumento significativo na excreção urinária de proteínas durante o estudo de seis semanas. Foi observado espessamento da MBG. Alterações nas cadeias de GAGs de heparan sulfato não foram investigadas no presente estudo. Contudo, a perda de proteoglicanos de heparan sulfato na MBG foi associada a proteinúria em doenças glomerulares, incluindo ND.³² Os resultados do presente estudo confirmaram que a excreção urinária de GAGs estava elevada nos ratos diabéticos não tratados, como descrito anteriormente por Reddi.^{33,34} Uma queda significativa na excreção urinária de GAGs foi detectada nos ratos com ND tratados com p425 em relação aos ratos com ND não tratados. A excreção urinária de GAGs foi significativamente correlacionada com a excreção de proteínas em todos os grupos do estudo. Tal fato pode indicar que a perda aumentada de proteoglicanos em rins diabéticos é revertida pelo tratamento com antagonista do MIF (p425). Este é o primeiro relato de tal efeito.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos foram corroborados pelos achados da microscopia óptica. Tais achados sugerem que a inibição do MIF pode ser benéfica para ND e que este efeito pode ser atribuído ao seu papel na modulação da ativação dos macrófagos e da membrana basal glomerular. Nosso interesse reside no MIF enquanto potencial alvo terapêutico para ND, não só por estar elevado em pacientes e modelos animais com ND,^{26,27} mas também por conta de seu papel fundamental na cascata inflamatória e na polarização dos macrófagos. O MIF é a primeira molécula a chegar ao local da inflamação e provavelmente determina o grau de inflamação celular.²⁴

Embora as alterações na atividade da heparanase não tenham sido examinadas no presente estudo, atividade da heparanase foi relatada em macrófagos, plaquetas, neutrófilos, monócitos, células de Langerhans e várias outras células.¹⁸⁻²³ Supõe-se que a heparanase secretada ou associada à membrana

seja responsável pela degradação da MEC. A atividade da heparanase, uma endoglicosidase que cliva especificamente as cadeias laterais da HS de HSPG, foi observada em pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 com proteinúria.^{12,13} Portanto, a perda de HS na membrana basal glomerular resulta em diminuição da barreira de carga aniônica, o que possivelmente a configura como uma das principais causas de proteinúria na ND.

A ND é caracterizada por fibrose progressiva como via final, eventualmente afetando todas as subestruturas do rim. Estudos recentes descrevem infiltração intersticial de macrófagos ligada à produção de citocinas responsáveis por lesão histológica e proliferação e ativação de fibroblastos.^{35,36} Alguns estudos demonstraram que macrófagos M1 classicamente ativados induzem permeabilidade podocitária.³⁷ O presente estudo forneceu evidências de que a inibição do MIF foi funcionalmente significativa, o que possivelmente levou à redução da ativação de macrófagos no rim diabético e à queda da proteinúria, acúmulo de MEC e deposição de colágeno em glomérulos in vivo. Esses efeitos podem ser atribuídos ao efeito inibitório do MIF sobre a ativação de macrófagos no rim diabético. Portanto, a inibição do MIF pode representar uma estratégia terapêutica potencial para ND.

Em conclusão, o tratamento com antagonista do MIF (p425) reduz a excreção urinária de proteína e GAGs, evita o espessamento da MBG e a deposição de colágeno, e provavelmente produz efeito protetor contra a perda de conteúdo aniônico na MBG de ratos com ND. A preservação de GAGs e das cargas aniônicas da MBG parece ser um dos mecanismos pelos quais o p425 reduz a proteinúria em ratos diabéticos.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo faz parte de uma tese de mestrado e recebeu apoio financeiro da Urmia University of Medical Sciences (UMSU) (processo no. 2013). Os autores também gostariam de agradecer o experiente pessoal do Centro de Pesquisa em Nefrologia e Transplante Renal da UMSU.

REFERÊNCIAS

- Mora C, Navarro JF. Inflammation and diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep.* 2006;6(6):463-8. Epub 2006/11/23.
- Tuttle KR. Linking metabolism and immunology: Diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2005;16(6):1537-8.
- Fard AA, Abbasnezhad P, Makhdomi K, Salehi M, Karamdel HR, Saboory E. Association of Serum Prolactin Concentrations with Renal Failure in Diabetic Patients. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases.* 2017;24(3):179-85.
- Zemin C, EC. M. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Invest* 2011;2:243-7.
- Magee GM, Bilous R, Cardwell CR, Hunter SJ, Kee F, Fogarty DG. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. *Diabetologia.* 2009;52(4):691-7.
- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.
- Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *Journal of Clinical Investigation.* 1994;93(2):536.
- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(17):10079-86.
- Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM, et al. Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nature medicine.* 1998;4(6):691-7.
- Kanwar YS, Farquhar MG. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1979;76(3):1303-7.
- Makino H, Ikeda S, Haramoto T, Ota Z. Heparan sulfate proteoglycans are lost in patients with diabetic nephropathy. *Nephron.* 1992;61(4):415-21.
- Shafat I, Ilan N, Zoabi S, Vlodavsky I, Nakhoul F. Heparanase levels are elevated in the urine and plasma of type 2 diabetes patients and associate with blood glucose levels. *PloS one.* 2011;6(2):e17312.
- Rops AL, van den Hoven MJ, Veldman BA, Saleminck S, Vervoort G, Elving LD, et al. Urinary heparanase activity in patients with Type 1 and Type 2 diabetes. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2011;27(7):2853-61.
- Kolset S, Reinholt F, Jenssen T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2012;60(12):976-86.
- Mansouri E, Panahi M, Ghaffari MA, Ghorbani A. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates albuminuria and renal sclerosis in experimental diabetic nephropathy rats. *Asian Biomedicine.* 2012;6(2):195-202.
- Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K, et al. The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *American Journal of Kidney Diseases.* 1993;21(5):480-5.
- Shikata K-I, Makino H. Role of macrophages in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Type-2 Diabetic Nephropathy in Japan: Karger Publishers;* 2001. p. 46-54.
- Freeman C, Parish RC. Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity. *Biochemical Journal.* 1998;330(3):1341-50.
- Matzner Y, Bar-Ner M, Yahalom J, Ishai-Michaeli R, Fuks Z, Vlodavsky I. Degradation of heparan sulfate in the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. Possible role in invasion through basement membranes. *Journal of Clinical Investigation.* 1985;76(4):1306.
- Sewell RF, Brenchley PE, Mallick NP. Human mononuclear cells contain an endoglycosidase specific for heparan sulphate glycosaminoglycan demonstrable with the use of a specific solid-phase metabolically radiolabelled substrate. *Biochemical Journal.* 1989;264(3):777-83.
- Naparstek Y, Cohen IR, Fuks Z, Vlodavsky I. Activated T lymphocytes produce a matrix-degrading heparan sulphate endoglycosidase. *Nature.* 1984;310(5974):241-4.

22. Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Research*. 2000;60(17):4767-70.
23. Bernard D, MÅ©hul B, Delattre C, Simonetti L, Thomas-Collignon A, Schmidt R. Purification and characterization of the endoglycosidase heparanase 1 from human plantar stratum corneum: a key enzyme in epidermal physiology? *Journal of investigative dermatology*. 2001;117(5):1266-73.
24. Malorny U, Goebeler M, Gutwald J, Roth J, Sorg C. Differences in migration inhibitory factor production by C57B1/6 and BALB/c mice in allergic and irritant contact dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1990;92(4):356-60.
25. SÅ¡nchez-Zamora YI, Rodriguez-Sosa M. The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes research*. 2014;2014.
26. Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney international*. 2004;65(1):116-28.
27. Watanabe T, Tomioka NH, Doshi M, Watanabe S, Tsuchiya M, Hosoyamada M. Macrophage migration inhibitory factor is a possible candidate for the induction of microalbuminuria in diabetic db/db mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2013;36(5):741-7.
28. Rasanayagam L.J., Lim K.L., Beng C.G., K.S. L. Measurement of urine albumin using bromocresol green. *Clin Chim Acta*. 1973;44:53-7.
29. De Jong J, Wevers R, Laarakkers C, Poorthuis B. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clinical chemistry*. 1989;35(7):1472-7.
30. Janssen U, Riley SG, Vassiliadou A, Floege Jr, Phillips AO. Hypertension superimposed on type II diabetes in Goto Kaki-zaki rats induces progressive nephropathy. *Kidney international*. 2003;63(6):2162-70.
31. Yung S, Chau MKM, Zhang Q ZC, Chan TM. Sulodexide Decreases Albuminuria and Regulates Matrix Protein Accumulation in C57BL/6 Mice with Streptozotocin-Induced Type I Diabetic Nephropathy. *PLoS ONE*. 2013;8(1): e54501.
32. Vanden Born J, van Kraats AA, Hill S, Bakker MA, Berden JH. Vessel wall heparan sulfate and transcapillary passage of albumin in experimental diabetes in the rat. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(2):27-31.
33. Reddi AS, Ramamurti R, Miller M, Dhuper S, Lesker N. Enalapril improves albuminuria by preventing glomerular loss of heparan sulfate in diabetic rats. *Biochem Med Metab Biol*. 1991;45(119-131).
34. Dilek Gogas Yavuz, Halil Onder Ersoz, Morvet Tuncel, Mustafa F Sargon, Belgin Kookkaya, Ahiskali R, et al. Effects of Aminoguanidine on Glomerular Basement Membrane Thickness and Anionic Charge in a Diabetic Rat Model. *Int Jnl Experimental Diab Res*. 2001;2:225-32.
35. Zhigang Wang, Meng Wei, Meng Wang, Lei Chen, Hua Liu, Yi Ren, et al. Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor Reduces Diabetic Nephropathy in Type II Diabetes Mice. *Inflammation*. 2014;37(6).
36. Al-Abed Y, S.VanPatten. MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic. *Future Medicinal Chemistry*. 2011;3(1):45-63.
37. You H, T. Gao, T.K. Cooper, W. Brian Reeves, A.S.Awad. Macrophages directly mediate diabetic renal injury. *Renal Physiology*. 2013;305(12):1719-27.