



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

CLÁUDIA SILVA SOUZA

**EFEITO PREVENTIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Vitória da Conquista, BA
2018

CLÁUDIA SILVA SOUZA

**EFEITO PREVENTIVO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA
NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Telma de Jesus Soares

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Lilianny Souza de Brito Amaral

Vitória da Conquista, BA
2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Souza, Cláudia Silva

Efeito preventivo do exercício físico na nefropatia diabética em ratas ovariectomizadas / Cláudia Silva Souza. - 2018.

84 f.: il.

Orientadora: Profª. Drª. Telma de Jesus Soares.

Co-orientadora: Profª. Drª. Lilianny Souza de Brito Amaral.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2018.

1. Nefropatia diabética. 2. Exercício físico. 3. Rim. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Soares, Telma de Jesus. III. Amaral, Lilianny Souza de Brito. IV. Título.

CDU: 616.379-008.64

CLÁUDIA SILVA SOUZA

**“Efeito preventivo do exercício físico na nefropatia diabética em
ratas ovariectomizadas”**

30/07/2018.

Raildo S. Coqueiro

PROF. DR. RAILDO DA SILVA COQUEIRO (EXAMINADOR)
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

Robson Augusto da Silva

PROF. DR. ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA (EXAMINADOR)
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Liliany Souza de Brito Amaral

PROF^a. DR^a. LILIANY SOUZA DE BRITO AMARAL (CO-ORIENTADORA)
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Telma de Jesus Soares

PROF^a. DR^a. TELMA DE JESUS SOARES (ORIENTADORA)
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

À Luzia Caíres, minha mãe, e Bárbara Dantas, minha tia, pelo amor, incentivo, suporte e, principalmente, por sempre acreditarem nos meus sonhos.

À Telma de Jesus Soares, pela confiança a mim depositada o que me encorajou a persistir e superar difíceis obstáculos.

Às amigas Aracely Melo e Jeisa Rodrigues pelos conselhos fundamentais para que eu recuperasse minha confiança e realizasse a prova de mestrado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais essa graça em minha vida e por me proporcionar um imenso conforto momentos mais difíceis durante a condução deste trabalho.

Ao IMS/CAT/UFBA e ao Programa de Pós-graduação em Biociências pela oportunidade de ingresso no mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

À prof^a Telma de Jesus Soares, pela paciência, conselhos, orientação e apoio irrestrito. Um exemplo profissional que me inspira e estimula a ser cada dia melhor. É imensurável minha admiração e carinho e serei eternamente grata por tudo que fez por mim.

À prof^a Lilianny Amaral, pela co-orientação e por estar sempre presente em momentos muito importantes durante a elaboração desse trabalho, o que permitiu sua realização plena.

Aos alunos da iniciação científica pela imensa ajuda durante a realização do projeto, sempre com muito comprometimento e dedicação.

À Aracely Melo pela ajuda na obtenção dos animais para realização desse trabalho.

À prof^a Regiane Yatsuda pela doação dos animais, parte fundamental desse trabalho, sou muito grata por esse gesto grandioso.

Ao prof^o Márcio Vasconcelos pelas dosagens bioquímicas.

À prof^a Terezila Machado Coimbra pela doação do anticorpo anti-TGF- β 1 e coloração com Tricrômio de Masson.

À todos os professores do curso de mestrado pelos quais tenho grande admiração e respeito.

Aos colegas do mestrado, pela troca de conhecimento, solidariedade e momentos inesquecíveis vividos durante esses dois anos.

À técnica Lucimara pelos conselhos os quais foram essenciais em diversos momentos importantes durante a realização desse trabalho e por estar sempre disponível para a realização dos cortes histológicos.

À técnica Janeide pela disponibilidade e grande ajuda em todos os momentos que eu precisava.

Ao grupo *mutans* e “os meninos e meninas do leite” pelos momentos de alegrias e tristezas compartilhados.

À Lucas Coelho pela ajuda na realização de um experimento crucial.

À Thiago Macedo, Amanda Alves e Danielba Almeida pela realização da dosagem de TBARS e troca de conhecimentos.

À Fernanda David Vieira, psicóloga do serviço de psicologia do IMS/CAT/UFBA, pela disponibilidade em me atender e, principalmente, tentar me mostrar que a vida não é feita só de laboratório. Sou muito grata por tudo.

Aos meus amigos que tornaram esses dois anos mais leves.

RESUMO

SOUZA, C. S. **Efeito preventivo do exercício físico na nefropatia diabética em ratas ovariectomizadas.** Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.

A nefropatia diabética é caracterizada por alterações renais que podem ser exacerbadas pela retirada da renoproteção conferida pelos hormônios sexuais femininos. As alterações na função e estrutura renal induzidas pelo diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) são provocadas pelo aumento da inflamação e estresse oxidativo com consequente acúmulo de proteínas de matriz extracelular. Embora o exercício físico seja uma importante ferramenta para o controle glicêmico, seu impacto sobre o rim diabético ainda não está totalmente elucidado. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do exercício físico iniciado previamente à indução do DM sobre as alterações da função e estrutura renal e dos marcadores de inflamação e estresse oxidativo induzidas pelos diabetes em ratas ovariectomizadas (OVX). Para isso, ratas *wistar* foram anestesiadas e submetidas à ovariectomia bilateral. Após a recuperação cirúrgica, os animais receberam injeção de 40 mg/kg de estreptozotocina (STZ) para a indução do DM1 ou de tampão citrato 0,1M, pH 4,5, e foram divididos em quatro grupos experimentais: ratas controles sedentárias OVX (CSO); controles previamente treinadas OVX (CPTO); diabéticas sedentárias OVX (DSO); e diabéticas previamente treinadas OVX (DPTO). Os animais dos grupos DPTO e CPTO foram submetidos a quatro semanas de treinamento aeróbico previamente à indução do DM1 ou administração do tampão citrato, enquanto os animais dos demais grupos foram mantidos sedentários. Após as quatro semanas foi realizada indução do DM1 nos animais dos grupos DSO e DPTO. Em seguida, os grupos CPTO e DPTO foram submetidos ao mesmo protocolo de exercício físico aeróbico regular de intensidade moderada, o qual consistiu em corrida em esteira motorizada por um período de oito semanas. Testes de corrida máxima foram realizados no início, a cada 4 semanas e no final do protocolo de treinamento para ajustes na intensidade do exercício e determinação da capacidade física dos animais. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, amostras de sangue e urina foram coletadas para determinação dos parâmetros de função renal; e os rins foram coletados e destinados à avaliação do estresse oxidativo, estudos histológicos e imunoistoquímicos. Para realização das análises estatísticas, os dados foram submetidos à análise de variância *Two-Way*. Os resultados demonstram que o exercício físico reduziu a glicosúria, a creatinina sérica, proteinúria e as alterações histológicas nas ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas. Os aumentos das expressões de NF- κ B, TGF- β 1, fibronectina, monócitos/macrófagos, linfócitos e os níveis de TBARS foram também reduzidos nas ratas previamente treinadas do grupo DPTO. Os nossos dados demonstram que o exercício físico aeróbico prévio, de intensidade moderada, exerceu efeito renoprotetor sobre o desenvolvimento da nefropatia diabética induzida pela estreptozotocina em ratas ovariectomizadas.

Palavras-chaves: Nefropatia diabética, Inflamação, Estresse Oxidativo, Exercício.

ABSTRACT

SOUZA, C. S. **Preventive effect of physical exercise on diabetic nephropathy in ovariectomized rats.** Dissertation (Master in Biosciences) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.

Diabetic nephropathy is characterized by renal changes that may be exacerbated by the removal of the renoprotein conferred by female sex hormones. Changes in renal function and structure induced by type 1 diabetes mellitus (DM1) are caused by increased inflammation and oxidative stress with consequent accumulation of extracellular matrix proteins. Although exercise is an important tool for glycemic control, its impact on the diabetic kidney has not yet been fully elucidated. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of previous physical exercise on the alterations of renal function and structure and the markers of inflammation and oxidative stress induced by diabetes in ovariectomized rats (OVX). For this, wistar rats were anesthetized and submitted to bilateral ovariectomy. After surgical recovery, the animals were injected with 40 mg/kg streptozotocin (STZ) for the induction of DM1 or 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, and were divided into four experimental groups: OVX sedentary controls (CSO); previously trained OVX controls (CPTO); OVX sedentary diabetic (DSO); and previously trained OVX diabetic (DPTO). The animals of the DPTO and CPTO groups submitted four weeks of aerobic training previous to induction of DM1 or administration of the citrate buffer, while the animals in the other groups were kept sedentary. After four weeks, DM1 induction was performed in the animals of the DSO and DPTO groups. Then, the CPTO and DPTO groups were submitted to the same protocol of regular aerobic physical exercise of moderate intensity, which consisted of running on a motorized treadmill for a period of eight weeks. Maximum running tests were performed at the beginning, every 4 weeks and at the end of the training protocol for adjustments in exercise intensity and determination of the physical capacity of the animals. Forty-eight hours after the last training session, blood and urine samples were collected for determination of renal function parameters; and the kidneys were collected and intended for the evaluation of oxidative stress, histological and immunohistochemical studies. To perform the statistical analysis, the data were submitted to Two-Way Variance Analysis. The results demonstrate that physical exercise reduced glycosuria, serum creatinine, proteinuria, and histological changes in previously trained diabetic ovariectomized rats. Increases in the expression of NF- κ B, TGF- β 1, fibronectin monocytes/macrophages, lymphocytes, and TBARS levels were also reduced in the previously trained rats of the DPTO group. Our data demonstrate that previous aerobic exercise of moderate intensity exerted a renoprotective effect on the development of diabetic nephropathy induced by streptozotocin in ovariectomized rats.

Key words: Diabetic Nephropathy, Inflammation, Oxidative stress, Exercise.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGEs – Produtos finais de glicação avançada
- AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
- BUN – Nitrogênio ureico
- CTIC – Compartimento túbulo-intersticial cortical
- DM – Diabetes *mellitus*
- DRT – Doença renal terminal
- E2 – 17 β -estradiol
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- ER – Receptores de estrógeno
- LFA-1 – Função linfocitária
- LPO – Peroxidação lipídica
- LTI – Lesões túbulo-intersticiais
- MEC – Matriz extracelular
- ND – Nefropatia diabética
- NF- κ B – Fator nuclear-kappa B
- NO – Óxido nítrico
- OVX – Ovariectomizadas
- PKC – Proteína quinase C
- PR – Receptores de progesterona
- SNAR – Nervo simpático renal
- STZ – Estreptozotocina
- TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- TEM – Transição tubular epitelial-mesenquimal

TFG – Taxa de filtração glomerular

TGF- β – Fator de crescimento transformante β

TRH – Terapia de reposição hormonal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal, teste de corrida máxima, glicemia pós-prandial, níveis de 17β -estradiol e peso relativo dos rins de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO.....75

Tabela 2. Dados de função renal de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO.....76

Tabela 3. Lesões túbulo-intersticiais, injúria tubular, índice glomerulosclerótico, área do tufoglomerular, porcentagem da área corada com Ácido Periódico de Schiff e porcentagem da área corada com Tricrômico de Masson de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO.....77

Table 4. Imunocoloração renal para ED-1, CD43, NF- κ B (p65), TGF- β 1, vimentina e fibronectina de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO.....78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografias representativas de alterações histológicas glomerulares (coloração com PAS), seta fina - obliteração da luz dos capilares glomerulares, seta espessa - dilatação dos capilares glomerulares, ponta de seta - acúmulo de matriz extracelular; de fibrose glomerular (coloração com Tricrômio de Masson), seta fina - áreas de fibrose; e de lesões túbulo-intersticiais (coloração com HE), ponta de seta - degeneração hidrópica, seta espessa - dilatação da luz tubular e perda da borda em escova, estrela - túbulos em necrose; de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO. Foi possível observar redução das alterações glomerulares e túbulo intersticiais no grupo DPTO. Coloração com PAS e Tricrômio de Masson, aumento x400; coloração com HE, aumento x200.....79
- Figura 2.** Imunolocalização para vimentina e TGF- β 1 no glomérulo e CTI do córtex renal; e para fibronectina no glomérulo; de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO. Setas finas indicando marcação para vimentina no glomérulo e CTI do córtex renal. Aumento x200. Houve menor intensidade de imunomarcação de fibronectina (ponta de seta) no glomérulo do grupo DPTO. Aumento x400. Houve menor intensidade de marcação de TGF- β 1 (seta) no glomérulo e CTI do córtex renal do grupo DPTO. Aumento x200.....80
- Figura 3.** Imunolocalização para células ED-1 positivas, células CD43 positivas e NF- κ B (p65), no glomérulo e CTI do córtex renal de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO. Foi possível observar redução da marcação para células ED-1 e CD43 positivas no glomérulo e CTI do córtex renal. Aumento x200. Foi observada menor intensidade de imunomarcação nuclear de células NF- κ B (p65) positivas no glomérulo do grupo DPTO. Aumento x200.....81
- Figura 4.** Expressão proteica de TGF- β 1 no córtex renal das ratas CSO, DSO e DPTO.....82
- Figura 5.** Níveis de TBARS no córtex renal de ratas CSO, CPTO, DSO e DPTO. Houve redução de TBARS nos grupos DPTO e CPTO.....83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Nefropatia diabética.....	18
2.2 Hormônios sexuais femininos e susceptibilidade ao desenvolvimento de nefropatia diabética.....	23
2.3 Exercício físico na nefropatia diabética.....	25
3 JUSTIFICATIVA	28
4 OBJETIVO GERAL	29
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
6 MATERIAL E MÉTODOS	29
6.1 Animais.....	29
6.2 Procedimentos experimentais.....	30
6.3 Procedimento cirúrgico.....	31
6.4 Protocolo de treinamento.....	31
6.4.1 Teste de Corrida Máxima.....	31
6.4.2 Protocolo de Exercício Físico Aeróbico.....	32
6.5 Determinação do Peso Corporal.....	32
6.6 Determinação dos níveis de estradiol e glicemia pós-prandial.....	32
6.7 Análise da Função Renal.....	32
6.7.1 Quantificação da proteinúria e glicosúria e creatinina, Na ⁺ , K ⁺ e ureia nas amostras de sangue e de urina.....	33
6.8 Histologia Renal.....	33
6.8.1 Índice Glomeruloesclerótico.....	34
6.8.2 Morfometria Glomerular.....	34
6.8.3 Fibrose glomerular.....	34
6.8.4 Lesões túbulo-intersticiais.....	34
6.9 Estudos Imunoistoquímicos.....	35
6.10 Expressão proteica de TGF-β1 por Western blot.....	36
6.10.1 Preparação de homogenato do tecido renal.....	36
6.10.2 Eletroforese e imunoblotting.....	36
6.11 Estimativa do estresse oxidativo renal.....	36

6.11.1	Preparação de homogenato do tecido renal.....	36
6.11.2	Estimativa da peroxidação lipídica.....	37
6.12	Análise estatística.....	37
7	REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 1	48
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma das doenças metabólicas mais complexas, e por isso tornou-se um grande problema de saúde pública (NARRES et al., 2016). Historicamente, o DM é classificado em dois tipos principais, diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) e do tipo 2 (DM2). O DM 1 é causado por uma deficiência absoluta de insulina, e o DM 2 caracteriza-se pela presença de resistência à insulina com um aumento compensatório inadequado na secreção de insulina (YI et al., 2016).

Especificamente, o DM1 ocorre como resultado de um processo complexo, envolvendo fatores genéticos e ambientais que conduzem a uma resposta autoimune, podendo ocorrer em qualquer idade (NOBLE; ERLICH, 2012). Durante este processo, as células betas das ilhotas pancreáticas são destruídas o que culmina com a deficiência absoluta de insulina levando à hiperglicemia, resultando em indivíduos que necessitam imprescindivelmente da administração de insulina exógena para a sobrevivência (FORBES; COOPER, 2013). Em modelos experimentais, a estreptozotocina (STZ) é largamente utilizada para mimetizar o diabetes em humanos (HAYDEN; TYAGI 2002). Isso ocorre, porque a STZ é seletivamente tóxica para células beta secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas e induz necrose dessas células, prejudicando a liberação de insulina e a oxidação da glicose (LU et al., 2007; MERZOUK et al., 2000).

Durante o curso da doença são desenvolvidas alterações micro e macrovasculares (POLAT et al., 2016). Dentre essas alterações, a nefropatia diabética (ND) é considerada uma das complicações microvasculares mais importantes do diabetes, representando a principal causa de doença renal terminal no mundo e uma das principais causas de morbidade e mortalidade nesses pacientes (SAMENI et al., 2016).

As características iniciais da ND incluem um aumento progressivo da excreção urinária de albumina e um decréscimo na taxa de filtração glomerular (DIXON; MARIC, 2007). Estas alterações funcionais são desenvolvidas como consequência de alterações estruturais iniciais, incluindo o espessamento da membrana basal glomerular, expansão mesangial com acúmulo de proteínas de matriz extracelular (MEC), alterações nas células epiteliais glomerulares e tubulares, glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial (SHARMA; MCGOWAN, 2000; POURGHASEM, SHAFI E BABAZADEH, 2015). Em especial, o progressivo acúmulo de matriz mesangial, ocorre como resultado do aumento da síntese e diminuição da degradação de proteínas de matriz extracelular, incluindo colágeno tipo IV,

laminina e fibronectina, que em última análise, levam ao prejuízo dos capilares glomerulares, resultando em injúria renal (ADLER et al., 2000; OH et al., 1998).

Entretanto, existem ainda inúmeras hipóteses sobre os mecanismos envolvidos no surgimento e progressão dos distúrbios renais induzidos pelo diabetes (PALM et al., 2003). Mansouri e colaboradores (2011) sugerem que o aumento do estresse oxidativo pode ser uma das vias pela qual a hiperglicemia conduz à ND. Nesse sentido, em tecidos que não requerem a insulina para a captação da glicose, como o rim, um estado hiperglicêmico crônico pode causar aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a um aumento do estresse oxidativo ou nitrosativo mediando, dessa forma, os efeitos deletérios do diabetes sobre a função e o tecido renal (PUNARO et al., 2014). Além disso, embora a ND não tenha sido considerada uma doença inflamatória no passado e, embora os fatores metabólicos ou hemodinâmicos sejam as principais causas que contribuem para ND, estudos recentes sugerem que o recrutamento de células imunes e consequente aumento da inflamação pode desempenhar função importante no desenvolvimento e progressão da ND (SEO et al., 2015; VIETINGHOFF et al., 2011). Há evidências crescentes de que os processos inflamatórios estão envolvidos na patogênese da ND, sendo o fator nuclear-kappaB (NF- κ B) e o fator de crescimento transformante β (TGF- β) identificados como mediadores-chave desses eventos (LI et al., 2010).

No diabetes experimental e em humanos, a produção de EROs pode ser aumentada por várias vias, incluindo a auto oxidação da glicose, ativação da proteína quinase C dependente de NADPH-oxidase e por formação de produtos finais de glicação avançada (BROWNLEE et al., 2001; FORBES, COUGHLAN e COOPER, 2008). Altos níveis de EROs levam à peroxidação lipídica em membranas celulares, aumentando a sua fluidez e permeabilidade. Notadamente, os níveis elevados de EROs geram malondialdeído, uma molécula altamente tóxica, e seu produto secundário, o ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é utilizado como marcador de peroxidação lipídica (FINAMOR et al., 2013). Além disso, a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio pode levar a ativação de vias inflamatórias e fibrose no tecido renal lesado (DOMINGUETI et al., 2016; HERRERA et al., 2017).

Os macrófagos são considerados mediadores centrais da resposta inflamatória (CAO et al., 2015). A infiltração de macrófagos ativa uma cascata de processos de sinalização profibrótica que contribuem para a esclerose e a cicatrização no rim diabético (MENG et al., 2014; REDDY et al., 2014). Nesse sentido, o aumento do número de macrófagos renais, principalmente em glomérulos e na área intersticial, foi correlacionado com a duração e a

gravidade da lesão renal no diabetes (CHOW et al., 2004). Estudos demonstraram que a infiltração de macrófagos no tecido renal de ratos com DM1 induzido por STZ foi relacionada com ativação do NF- κ B, e este, por sua vez, aumentou a expressão de citocinas pró-inflamatórias e profibróticas, incluindo o TGF- β 1 (SOETIKNO et al., 2011; LU et al., 2014). O TGF- β 1 é considerado um dos principais mediadores da fibrose na ND (KOMALA et al., 2015).

Da mesma forma, os hormônios sexuais femininos são considerados um fator influente na susceptibilidade e progressão de doenças renais. Foi demonstrado aumento da expressão de metaloproteinases e consequente aumento da degradação por essas enzimas de proteínas da matriz extracelular, melhora da expansão mesangial e do espessamento da membrana basal glomerular em ratas ovariectomizadas diabéticas tratadas com o 17 β -estradiol (MARIC et al., 2004). Mankhey e colaboradores (2004) também demonstraram que a reposição de 17 β -estradiol reduziu a albuminúria, atenuando a glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial em ratas ovariectomizadas com diabetes induzida por STZ. Contudo, em estudos anteriores foi demonstrado que o estrógeno acelerou o desenvolvimento de doença renal em ratas obesas *Zucker* (GADES et al., 1998) e contribuiu para o desenvolvimento de glomeruloesclerose em um modelo de DM2 e obesidade (TOMIYOSHI et al., 2002).

Levando em consideração os dados conflitantes, e tendo em vista que apesar de existirem terapias farmacológicas que visem o controle glicêmico e da pressão arterial como formas de proteger o rim, a incidência de ND continua alta e crescente (PARK, 2014). Assim, o exercício físico de intensidade moderada tem sido considerado uma intervenção importante na proteção contra as complicações do DM1 devido aos seus benefícios relacionados à atenuação de complicações microvasculares e de sensibilidade à insulina, bem como no controle da progressão da ND (AMARAL et al., 2016; 2018; RODRIGUES et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Foi demonstrado que o exercício físico de intensidade moderada promoveu efeitos benéficos sobre o perfil metabólico com melhora do controle glicêmico, a função renal, níveis de TBARS e ausência de lesões renais em ratos com DM induzida por STZ (RODRIGUES et al., 2011). Esses dados indicam que o treinamento aeróbio associado a um melhor controle do estresse oxidativo e nitrosativo pode ser usado para retardar a progressão da ND. Silva e colaboradores (2012) demonstraram também que o exercício físico retardou a progressão da doença renal e a disfunção autonômica e morfométrica cardíaca em ratos com DM induzida por

STZ. Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que o exercício físico regular, de intensidade moderada, realizado antes e após a indução do DM atenuou as mudanças na função e estrutura renal, a infiltração de macrófagos, linfócitos e ativação do NF- κ B em ratas com diabetes induzida por STZ. O exercício realizado anteriormente a indução do DM reduziu ainda a expressão de colágeno IV, sendo este efeito associado à expressão reduzida de TGF- β 1 (AMARAL et al., 2016; 2018). Contudo, ainda existem controvérsias quanto ao efeito global do exercício sobre a ND e têm-se demonstrado que a intensidade e duração do exercício parecem influenciar as respostas renais (KURDAK et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEFROPATIA DIABÉTICA

O DM é uma doença não transmissível, considerada uma das cinco principais causas de morte no mundo e por isso tornou-se uma das maiores emergências globais de saúde do século 21 (AYEPOLA et al., 2014). Estimativas de 2015 demonstraram que existem 387 milhões de adultos com diabetes no mundo. Ainda de acordo com essas estimativas 14,3 milhões de indivíduos entre 20 e 79 anos de idade possuem diabetes no Brasil, classificando o país como tendo o quarto maior número de casos de diabetes em todo o mundo. Além disso, em 2015 o Brasil teve o maior número de casos de morte por diabetes na América do Sul, com aumento da prevalência de mortes em mulheres a partir de 50 anos de idade (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2015).

O DM é uma doença de causas múltiplas que está envolvido em distúrbios do metabolismo de vários nutrientes e se caracteriza por defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação, com consequente hiperglicemia. O diabetes é dividido em dois tipos principais, diabetes DM1, também conhecido como diabetes insulino dependente e DM2, chamado diabetes não insulino dependente (WHO, 2012).

Especificamente, o DM1 é uma doença crônica caracterizada pela destruição autoimune das células beta pancreáticas. Sem a insulina produzida por essas células, o corpo não é capaz de administrar os níveis de glicose no sangue, levando então a hiperglicemia (COLEMAN et al., 2015), a qual pode iniciar uma complicada série de processos fisiopatológicos (KURDAK et al., 2010). Em modelos experimentais, a STZ é largamente utilizada para mimetizar o diabetes em humanos, e consequentemente simular um modelo de lesão renal induzida pelo

DM1 (HAYDEN; TYAGI 2002). A STZ é seletivamente tóxica para células beta secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas e induzem necrose dessas células, prejudicando a liberação de insulina e a oxidação da glicose (LU et al., 2007; MERZOUK et al., 2000).

Assim, a hiperglicemia causada pelo diabetes conduz a muitas alterações patológicas, incluindo a neuropatia periférica, nefropatia, retinopatia, doença hepática e uma variedade de doenças que diminuem a qualidade e expectativa de vida das pessoas (COLEMAN et al., 2015). Dessas alterações, a ND é considerada uma das principais complicações do diabetes e tornou-se uma das principais causas de morte em pacientes com diabetes (HUANG et al., 2014).

Nesse sentido, nos estágios iniciais da ND tem-se observado aumento da excreção urinária de proteínas e da taxa de filtração glomerular (TFG), levando à hiperfiltração glomerular, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (HERMAN-EDELSTEIN et al., 2011). No entanto, na fase tardia da ND, a TFG, eventualmente, diminui à medida que o número de néfrons funcionantes diminui, o que leva a insuficiência da função excretora renal (CHANG et al., 2016). Esse declínio na TFG está associado com alterações estruturais incluindo hipertrofias epiteliais glomerular e tubular, aumento da espessura da membrana basal glomerular com expansão da área mesangial, proliferação celular e acúmulo de proteínas de matriz extracelular (POURGHASEM; SHAFI; BABAZADEH, 2015).

A glomerulosclerose leva à deterioração e disfunção glomerular (MAKINO et al., 2003). Os podócitos lesados desempenham papel chave no desenvolvimento de proteinúria e progressão da disfunção glomerular, uma vez que, ao contrário de outras células glomerulares, os podócitos são células terminalmente diferenciadas e têm limitada capacidade de replicação, portanto, a sua perda precede inevitavelmente o desenvolvimento de glomerulosclerose na ND (AGUILAR, RODRÍGUEZ-DELFÍN, 2012). A fibrose túbulo-intersticial é considerada o final da ND e envolve, principalmente, a expansão de fibroblastos e ativação de miofibroblastos intersticiais. Os miofibroblastos são considerados uma das principais células efetivas derivadas da transição tubular epitelial-mesenquimal (TEM) e são também responsáveis pelo acúmulo de MEC, desempenhando papel central na fibrose renal progressiva (HUANG et al., 2013). Quando ativados, os miofibroblastos expressam uma ampla gama de proteínas do citoesqueleto, em particular a vimentina, que é uma importante proteína do filamento intermediário de células mesenquimais (ESSAWY et al., 1997; SATELLI et al., 2011). Assim, Singh e colaboradores (2018) verificaram que o aumento da expressão gênica de vimentina 4 meses após indução do diabetes estava relacionado ao aumento da atividade do TGF- β 1 em tecido renal de ratos com

DM induzido por STZ. Herman-Edelstein e colaboradores (2011) também demonstraram que em condições de hiperglicemia há perda de podócitos tanto *in vivo* quanto *in vitro* e isso estava relacionado a uma expressão aumentada de vimentina associada ao aumento da ativação de TGF- β 1. Em adição, Huang e colaboradores (2017) demonstraram que altas concentrações de glicose induzem TEM de células epiteliais dos túbulos renais, e isso foi associado com a regulação positiva de TGF- β 1, vimentina e colágeno I. Tomados em conjunto, esses estudos sugerem que o TGF- β está diretamente envolvido na patogênese da ND.

A hiperglicemia pode levar à ND através de vários mecanismos, incluindo o aumento do estresse oxidativo e inflamação com conseqüente acúmulo de proteínas de MEC (GALKINA, LEY, 2006; MANSOURI et al., 2011). O acúmulo de MEC mediada por células mesangiais representa uma via final comum entre a ND e todas as doenças renais crônicas (MILLER et al., 2014). Em condições fisiológicas, a MEC mesangial consiste em colágenos (incluindo tipos I e IV), laminina, fibronectina e proteoglicanos (HARALDSSON et al., 2008; KOLSET et al., 2012). Em especial, aumentos significativos de fibronectina foram detectados em várias glomerulopatias, incluindo a ND, sendo esta proteína considerada uma das primeiras a aumentar nos estágios iniciais da ND e uma mediadora essencial para o acúmulo de outras proteínas de MEC (OH, 1998; SUMI et al., 2011; MILLER et al., 2014). A fibronectina tem domínios os quais interagem com outras proteínas de MEC, receptores de superfície celular, glicosaminoglicanos e outras moléculas de fibronectina, e essa combinação pode então levar a cicatrização e finalmente a fibrose no tecido lesionado (MAO, SCHWARZBAUER, 2005).

O aumento do estresse oxidativo é considerado um componente importante para as etapas iniciais da ND, sendo responsável por ativar uma variedade de vias patológicas em praticamente todos os tipos de células renais como células endoteliais, mesangiais, epiteliais, tubulares e podócitos. A fibrose é tida como a característica mais crucial e proeminente da ND e a inflamação parece estar envolvida no início e na progressão da fibrose renal (WADA, MAKINO, 2013). O aumento do estresse oxidativo está associado à síntese e liberação do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (LU et al., 2007; CHIARELLI et al., 2009; FRIEDERICH-PERSSON et al., 2014). O TGF- β é uma citocina pro fibrótica que tem papel importante na hipertrofia renal e na expansão da matriz mesangial por estimular a produção de vários componentes de MEC e por alterar sua composição (NAVARRO et al., 2006). Esse fator possui ainda potente efeito quimiotático sobre fibroblastos e outras células fagocíticas, que por sua vez contribuem para fibrose (CHIARELLI et al., 2009). A expressão aumentada de TGF- β 1 foi relacionada ao aumento da excreção urinária de albumina e aumento da síntese de

componentes de matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina e laminina, resultando em hipertrofia das células mesangiais e glomerulosclerose em modelos experimentais de doença renal crônica (KRAG et al., 2000; LU et al., 2007; WADA, MAKINO et al., 2013). De fato, estudos têm demonstrado aumento da expressão renal de mRNAs para TGF- β 1 e MEC tanto em modelos experimentais de diabetes quanto em pacientes diabéticos (PARK et al., 1997; WANO et al., 1996). O uso de anticorpos neutralizantes anti-TGF- β impediu a glomerulosclerose e a fibrose intersticial, e reduziu a expressão de genes de MEC, incluindo fibronectina e colágeno do tipo IV em camundongos com diabetes tipo 1 e tipo 2 (SHARMA et al., 1996; ZIYADEH et al., 2000). Estudos em cultura de células confirmaram que níveis elevados de glicose induziram a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) com consequente aumento da expressão de TGF- β 1 em células mesangiais renais e células epiteliais tubulares (TAN et al., 2007; NAKAJIMA et al., 2006).

O aumento do estresse oxidativo pode levar ainda ao processo de peroxidação lipídica. Na peroxidação lipídica, especialmente, as EROs estimulam a degradação dos fosfolipídios de membrana, proteínas e do DNA, resultando em disfunção de organelas e, finalmente, morte celular (MANSOURI et al., 2011). Assim, a concentração dos produtos de peroxidação dos lipídios pode refletir o grau de estresse oxidativo na ND (KUMAR et al., 2007). Estudos demonstraram que o aumento sérico e renal de malondialdeído, que é um produto da peroxidação lipídica, em ratos com diabetes induzida por STZ contribuiu para o desenvolvimento e progressão da ND nesse modelo experimental (BAYNES, 1991; KAKKAR et al., 1995). Rodrigues e colaboradores (2011) também demonstraram que o aumento da peroxidação lipídica estava relacionado ao aumento da albuminúria em ratos diabéticos. O aumento dos níveis do ânion de superóxido e peroxidação lipídica e a diminuição da produção de NO em animais diabéticos foi fortemente correlacionada ao aumento da excreção urinária de proteínas (PUNARO et al., 2014).

Além disso, a produção de EROs leva a uma ativação anormal de vias de sinalização intracelulares renais, as quais desencadeiam respostas pró-inflamatórias e produzem resposta imune (SOURRIS, FORBES, 2009). O grau de infiltração de monócitos/macrófagos e o nível de expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias contribuem para a patogênese da ND (AWAD et al., 2011; YOU et al., 2017). Estudos tem demonstrado aumento do número de macrófagos tanto em glomérulos (GUO et al., 2017; JHA et al., 2017) quanto no interstício de animais diabéticos (CHOW et al., 2004; AMARAL et al., 2018). Nguyen e colaboradores (2006) mostraram que na fase mais precoce da ND, os macrófagos já estavam presentes nos

glomérulos, enquanto que o número de macrófagos intersticiais foi observado na fase mais tardia da injúria renal. Klessens e colaboradores (2017) obtiveram resultados semelhantes, mostrando que macrófagos glomerulares já estavam presentes em amostras de biópsia em estágios iniciais de ND, sugerindo um papel importante para os macrófagos na proteinúria e nos danos precoces induzidos pelo diabetes. O aumento significativo de macrófagos em glomérulos também foi associado ao aumento da glomeruloesclerose com consequente albuminúria (UTIMURA et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a depleção de macrófagos reduziu a albuminúria, o nitrogênio ureico (BUN) e as alterações histopatológicas renais em ratos com DM1 induzido por STZ (YOU et al., 2013). Existem evidências que o aumento de macrófagos está relacionada à expressão de TGF- β 1, o qual medeia o estabelecimento de glomeruloesclerose no tecido renal de animais com ND experimental (CHEN et al., 2003; ZIYADEH et al., 2000). Adicionalmente, Chow e colaboradores (2003) demonstraram tanto *in vitro* quanto *in vivo* que macrófagos estimulam as células mesangiais a produzir proteínas de MEC através do TGF- β 1. O recrutamento de linfócitos, em particular as células T, tem emergido como um fator essencial não apenas no desenvolvimento, mas também na progressão da ND (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2011; PENG et al., 2015; SEO et al., 2015). Moon e colaboradores (2012) mostraram uma correlação positiva entre a infiltração de células CD4⁺ e CD8⁺ e albuminúria no interstício renal de pacientes com DM2 com nefropatia. Estudos mais recentes, também demonstraram aumento da infiltração de linfócitos no córtex renal de animais diabéticos quando comparado com animais não-diabéticos (AMARAL et al., 2018; TONG et al., 2017). O bloqueio da ativação de células T reduziu o número dessas células infiltrantes em rins de camundongos com DM1, o qual foi correlacionado com atenuação do dano renal medido pela albuminúria (HERRERA et al., 2017).

A participação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) foi demonstrada em várias doenças renais, inclusive na ND (LOPEZ-FRANCO et al., 2002; SCHIMID et al., 2006, CHEN et al., 2008; GARCÍA-GARCÍA et al., 2014). O NF- κ B é um importante fator de transcrição nuclear, responsável por controlar a transcrição de muitos genes celulares que regulam a resposta inflamatória e a sobrevivência e proliferação celular (BARNES; KARIN, 1997). O aumento do estresse oxidativo aumenta a ativação do NF- κ B pelo processo de fosforilação e degradação do I κ B, sua subunidade inibitória, permitindo a translocação nuclear e ligação da subunidade p65 às regiões promotoras do DNA. A ativação desse fator promove aumento da expressão de vários genes envolvidos na inflamação, como citocinas, fatores quimiotáticos para monócitos e macrófagos (MCP-1) e moléculas de adesão vascular e

intracelular (GUIJARRO; EGIDO, 2001, VAN DEN BERG et al., 2001). O aumento da expressão de NF- κ B, de marcadores de estresse oxidativo e do número de macrófagos e linfócitos foi demonstrado em glomérulos e túbulos renais em pacientes e em animais diabéticos com ND (MEZZANO et al., 2004; AMARAL et al., 2018). Lee e colaboradores (2010) demonstraram aumento de EROs, ativação de NF- κ B e TGF- β 1 em glomérulos e túbulos proximais, o que pode ter contribuído para as alterações patológicas, como hipertrofia glomerular e expansão da matriz mesangial, além de aumento da excreção urinária de albumina observadas em ratos diabéticos. Além disso, estudos tem demonstrado que o aumento da expressão de NF- κ Bp65 fosforilado está associado ao aumento da inflamação em ratos com DM1 induzido por STZ (RIAD et al., 2007; LV et al., 2017). A inibição de diferentes fontes de EROs, a inibição do NF- κ B e da infiltração de macrófagos diminuiu a atividade de TGF- β 1 por meio da redução da transcrição da proteína TGF- β 1 ativada (SOETIKNO et al., 2011; GONZALEZ-RAMOS et al., 2012; LU et al., 2014). Esses dados indicam que o aumento da transcrição de TGF- β 1 induzida pelo estresse oxidativo e células inflamatórias pode, pelo menos em parte, contribuir para o aumento da expressão de TGF- β 1 na ND.

Diante disso, em todo o mundo, a incidência de DM1 está aumentando a um ritmo alarmante (HUANG et al., 2012). Mesmo no caso de terapêutica estritamente regulada com insulina, é extremamente difícil manter os níveis de glicose no sangue dentro de uma faixa aceitável e, devido à complexidade de mecanismos, não existem ainda medicamentos definitivos para retardar o desenvolvimento da ND (COLEMAN et al., 2015). Logo, torna-se de fundamental importância a busca por alternativas que visem prevenir o desenvolvimento desses mecanismos complexos que antecedem o estabelecimento da ND.

2.2 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS E SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE NEFROPATIA DIABÉTICA

A diferença entre os sexos tem sido considerada um fator influente na susceptibilidade à doença renal diabética. Geralmente, mulheres mostram uma maior proteção contra o desenvolvimento e a progressão da doença em comparação com os homens (DIAMOND-STANIC; YOU; SHARMA, 2012). Nesse sentido, foi demonstrado que mulheres diabéticas na pré-menopausa têm um risco menor de desenvolver doença renal terminal em comparação com homens diabéticos da mesma idade, sendo esta proteção perdida após a menopausa (BALLARD et al., 1998). Assim, o sexo masculino é considerado um fator de risco para o desenvolvimento

e progressão da doença renal diabética, enquanto que o sexo feminino está associado a uma progressão mais lenta para o estágio final da injúria renal (CHIN et al., 2005).

Estudos indicam que o estrógeno tem efeitos protetores cardiovasculares, sendo responsável por melhorar os níveis séricos de lipídeos, aumentar a vasodilatação do endotélio e proteger contra a aterosclerose e hipertensão (LOW et al., 2002; MILLER et al., 2003). Além disso, tem sido relatado que o estrógeno e seus principais metabólitos exercem ações renoprotetoras tanto em condições fisiopatológicas quanto em condições fisiológicas (MANKHEY et al., 2004). Foi demonstrado que mulheres com DM1 desenvolveram microalbuminúria em um ritmo mais lento e tiveram uma menor incidência de nefropatia do que homens (KARL et al., 2005). Dados experimentais também sugerem que o estrógeno apresentou efeitos benéficos na progressão de doenças renais em ratos uninefrectomizados e hipertensos (GROSS et al., 2004).

No rim, o estrógeno tem como principal alvo o glomérulo, tornando então a ação desse hormônio particularmente importante para a manutenção da estrutura e função glomerular e volume da MEC (POTIER et al., 2001). As células glomerulares expressam receptores de estrógeno (ER), predominantemente do subtipo ER α , que medeia à maioria das ações do estrógeno/ER em células mesangiais (POTIER et al., 2002). O estrógeno, provavelmente, age regulando muitos de seus efeitos protetores sobre o rim através de mecanismos dependentes dos ERs (PEDRAM et al., 2006). Então uma diminuição das ações do estrógeno/ER, como no caso de redução dos níveis de estrógeno, em células glomerulares pode levar a respostas renais alteradas, contribuindo para o desenvolvimento e progressão de muitas doenças renais crônicas, incluindo a ND (PEREIRA-SIMON et al., 2012).

Estudos sugerem que as possíveis razões para a perda de proteção do sexo feminino no diabetes são a redução dos níveis de estradiol no plasma, com conseqüente diminuição da regulação de receptores de estrógeno no rim de animais diabéticos (MANKHEY et al., 2005; MARIC et al., 2004). Em adição, estes estudos mostraram ainda que a suplementação com 17 β -estradiol (E $_2$) no início da diabetes restaurou os níveis de estradiol em ratas ovariectomizadas, e impediu o desenvolvimento de albuminúria, glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial associada à ND, sendo essa renoproteção exercida principalmente pela regulação da síntese e degradação de proteínas da MEC. Nesse sentido, Meng e colaboradores (2011) também demonstraram que a reposição de E $_2$ em ratas ovariectomizadas contribuiu para proteção cardio-

renal, como indicado por uma diminuição da deposição de colágeno do miocárdio intersticial e hipertrofia de miócitos, assim como redução da lesão renal mediada pelo estresse oxidativo.

De forma semelhante ao estrógeno, os receptores de progesterona (PR) também estão amplamente distribuídos pelo rim. Os RPs foram encontrados, principalmente, em células tubulares distais, embora estejam presentes no córtex e medula renal (BUMKE-VOGT et al., 2002; YANES et al., 2008). Assim, estudos têm demonstrado que a administração de progesterona sozinha ou progesterona combinada com estradiol antes da ovariectomia melhora a função renal em ratas envelhecidas (NIELSEN et al., 2003). Entretanto, Antus e colaboradores (2003) demonstraram que a administração de estradiol combinada com progesterona aumentou a proteinúria e glomeruloesclerose em ratas ovariectomizadas uninefrectomizadas. Outros estudos tem demonstrado que a administração exógena somente de progesterona exerce efeitos antioxidantes e renoprotetores atenuando o dano renal em modelo de injúria renal aguda (SANDHI et al., 2014) e crônica (MONTEZANO et al., 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que a reposição com progesterona melhorou as alterações funcionais e estruturais renais e inibiu a fibrose em ratos diabéticos induzido por STZ (AL-TRAD et al., 2015).

Diante do exposto, a contribuição dos hormônios sexuais femininos para os mais diversos tipos de doenças renais ainda é incerto e existem poucos estudos avaliando suas ações sobre a doença renal diabética. Além disso, os benefícios da terapia de reposição desses hormônios para a saúde tem sido seriamente questionados (MAUVAIS-JARVIS et al., 2013). Então, a busca por alternativas que levem a prevenção da nefropatia em condições de ausência dos hormônios sexuais femininos tornam-se cada vez mais necessárias.

2.3 EXERCÍCIO FÍSICO NA NEFROPATIA DIABÉTICA

O exercício é um componente indiscutível para um estilo de vida saudável e uma contribuição importante ao comportamento sedentário para o desenvolvimento de muitas das condições benéficas ao organismo a longo prazo. A inatividade física tem sido descrita como a maior ameaça à saúde pública na sociedade atual e por isso o papel do exercício na gestão, bem como na prevenção de doenças crônicas está se tornando cada vez mais aceito (SMITH; BURTON, 2012). Nesse sentido, o exercício aeróbico tem sido relacionado à prevenção do desenvolvimento e progressão de muitas doenças crônicas, incluindo o DM e ND (BORTOLON et al., 2012; AMARAL et al., 2016).

Durante décadas, o exercício tem sido considerado como um dos pilares da gestão do diabetes, juntamente com a dieta e medicação (KURDAK et al., 2010). Pechter e colaboradores (2003) relataram ainda que um programa de exercício de natação de baixa intensidade em pacientes com ligeira a moderada insuficiência renal resultou na diminuição da pressão sanguínea, diminuição da proteinúria e melhora na TFG, associada a redução do estresse oxidativo renal. Sigal e colaboradores (2004) mostraram também que o exercício aeróbico melhorou o controle glicêmico e reduziu a mortalidade por doenças cardiovasculares em pacientes com DM2. No entanto, o efeito global do exercício sobre a ND ainda é controverso (KURDAK et al., 2010).

Sabe-se que o exercício pode induzir profundas mudanças na hemodinâmica renal e excreção urinária de proteínas, uma vez que, ele pode reduzir o fluxo sanguíneo renal e consequentemente reduzir a TFG (KURDAK et al., 2010). Estudos demonstraram que o exercício influencia a hemodinâmica renal aumentando a permeabilidade glomerular por alterar as cargas negativas presentes na parede dos capilares glomerulares, aumentando a excreção urinária de proteínas em pacientes com ND (ALA-HOUHALA, 1990; POORTMANS; VANDERSTRAETEN, 1994).

Gunduz e Senturk (2003) demonstraram ainda que o estresse oxidativo induzido pelo exercício agudo de alta intensidade também contribuiu para a ocorrência de proteinúria pós-exercício em ratos. O exercício agudo de alta intensidade promove grandes alterações endócrinas, metabólicas e imunológicas que podem persistir por um período de várias horas após o exercício (BORTOLON et al., 2012). Devido a esses fatores, muitas vezes, o exercício é contraindicado em alguns casos de doença renal, e por provocar essas alterações, a microalbuminúria induzida pelo exercício agudo já foi utilizado muitas vezes como um teste preditivo para a detecção precoce de ND em pacientes sem microalbuminúria (O'BRIEN et al., 1995; GHOSH et al., 2009).

Embora tenha sido demonstrado que o exercício agudo promove essas sérias alterações sobre o rim, estudos demonstraram que o exercício físico aeróbico regular de intensidade moderada melhorou significativamente o perfil metabólico e reduziu a albuminúria em ratos com DM2 (WARD et al., 1994; CHIASERA et al., 2000). Adicionalmente, foi demonstrado que o exercício físico de intensidade moderada reduziu as lesões túbulo-intersticiais e a glomeruloseclerose em modelo experimental de doença renal crônica (CAO et al., 2016) e o índice glomerulosclerótico em ratos com DM2 (TUFESCU et al., 2008). Além disso, foi

demonstrado também que o exercício aeróbico de intensidade moderada, realizado previamente à indução do diabetes *mellitus*, reduziu a expressão de proteínas da MEC e TGF- β 1 em ratas não-ovariectomizadas com DM1 induzido por STZ (AMARAL et al., 2016).

Os mecanismos pelos quais o exercício melhora a função e estrutura renal ainda não estão completamente elucidados. No entanto, sabe-se que o músculo esquelético desempenha papel importante na homeostase da glicose, aumentando a captação de glicose de modo mediado pela insulina (CHRISTOPHER et al., 2005) ou pela ação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) durante o exercício (HO-JIN, 2016). Nesse sentido, estudos tem demonstrado que a melhora do processo catabólico pode ser um dos possíveis mecanismos pelo qual o exercício exerce seus efeitos benéficos relacionados ao controle metabólico e diminuição do estresse oxidativo com consequente atenuação do dano renal (MIDAOUY et al., 1996; ITO et al., 2015; CONTI et al., 2015; GU et al., 2015). Adicionalmente, Silva et al. (2012) observaram que a piora da função renal ocorria concomitante com diminuição significativa da atividade do nervo simpático renal em animais diabéticos e que o treinamento físico realizado antes e após a indução do DM foi capaz de normalizar essa atividade do nervo com melhora na função renal. Peeri e colaboradores (2013) mostraram que o exercício aeróbico de intensidade moderada atenuou a deficiência de NO induzido pelo estresse oxidativo renal e ao mesmo tempo melhorou a biodisponibilidade de NO, sendo estes efeitos renoprotetores do exercício mediados pela redução da peroxidação lipídica em ratos. De Moraes e colaboradores (2004) propuseram ainda que os aumentos no débito cardíaco durante o exercício, e a vasoconstrição renal associada à regulação positiva da NOS endotelial, poderia aumentar o fluxo sanguíneo e a velocidade e tensão de cisalhamento na circulação renal. Assim, eles demonstraram em coelhos que o exercício promoveu hiperemia vascular renal e imediatamente após inativou EROs, consequentemente impedindo o aumento da produção de EROs e sua interação com NO. Assim a biodisponibilidade de NO pode ser aumentada pelo exercício como resultado do aumento da atividade/expressão de eNOS e/ou sua degradação reduzida devido à redução da interação com EROs (RIBEIRO; ALVES; OLIVEIRA, 2010). Além disso, estudo mais recente do nosso laboratório, demonstrou que o exercício aeróbico de intensidade moderada, realizado previamente à indução do DM, reduziu o número de linfócitos e de marcadores de estresse oxidativo e melhorou a biodisponibilidade de NO em ratas não-ovariectomizadas com DM1 induzido por STZ (AMARAL et al., 2018).

Diante do exposto, os estudos têm demonstrado os efeitos benéficos atribuídos ao exercício para prevenção e tratamento da doença renal diabética. Entretanto, até a presente data,

não existem estudos avaliando os efeitos do treinamento físico prévio sobre o estresse oxidativo, inflamação, deposição de proteínas de matriz extracelular e a função e estrutura renal em ratas com DM1 ovariectomizadas.

3 JUSTIFICATIVA

O DM1 é causado pela destruição autoimune seletiva das células beta produtoras de insulina do pâncreas (SLAUGHTER et al., 2013). Em modelos experimentais, a STZ é largamente utilizada para simular lesão renal induzida pelo DM1 (AYEPOLA et al., 2014).

A ND é considerada uma das mais graves complicações do DM e tornou-se a principal causa da doença renal terminal (DRT) em todo o mundo (SLAUGHTER et al., 2013). O primeiro sinal de ND é a microalbuminúria que sem intervenções específicas, pode progredir para proteinúria evidente ou síndrome nefrótica, e declínio na função renal (KURDAK et al., 2010). Morfologicamente, a ND é caracterizada pelo espessamento da membrana basal glomerular, por aumento na matriz mesangial e fibrose túbulo-intersticial (MAKINO et al., 2003).

O diabetes está associado com o aumento do estresse oxidativo e recrutamento de leucócitos no rim diabético (PERSSON et al., 2012; CAO et al., 2015). Esses fatores, por sua vez, estão relacionados à ativação do NF- κ B e aumento de TGF- β 1, o qual é considerado um mediador chave das alterações fibróticas na patogênese da ND (WANG et al., 2002; SOETIKNO et al., 2011; LU et al., 2014). Estudos demonstraram também que a deficiência de estrógeno em ratas diabéticas ovariectomizadas foi fundamental para o agravamento da ND (MARIC et al., 2004; MANKHEY et al., 2004).

Além disso, uma vez que a DRT é estabelecida, terapias caras, como hemodiálise ou transplante são necessárias (POLAT et al., 2016). Assim, a busca por terapias alternativas que visem tratar ou impedir o surgimento da ND tornou-se uma necessidade indispensável para a prevenção e gestão da DRT (PARK, 2014). Nesse contexto, o exercício físico surge como uma importante alternativa, pois, estudos têm demonstrado que o treinamento físico de animais experimentais com DM1 resultou em atenuação das complicações renais induzidas pelo diabetes (AMARAL et al., 2016; RODRIGUES et al., 2011). Entretanto, não existem ainda estudos demonstrando os efeitos do exercício físico prévio sobre as alterações de função e estrutura renal, peroxidação lipídica e inflamação em ratas diabéticas ovariectomizadas. Diante

disso, nós hipotetizamos que o exercício físico pode prevenir o surgimento dessas alterações renais nesse modelo experimental.

4 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos preventivos do exercício físico sobre as alterações funcionais, histológicas, a peroxidação lipídica e marcadores inflamatórios no tecido renal de ratas diabéticas ovariectomizadas.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a influência do exercício físico iniciado previamente a indução do DM sobre a capacidade física de ratas ovariectomizadas;

2. Analisar a influência do exercício físico iniciado previamente a indução do DM sobre peso corporal e glicemia de ratas ovariectomizadas;

3. Analisar a influência do exercício físico iniciado previamente a indução do DM sobre parâmetros de função renal de ratas ovariectomizadas;

5. Avaliar a influência do exercício físico iniciado previamente a indução do DM sobre alterações histopatológicas no tecido renal de ratas ovariectomizadas;

6. Avaliar o efeito do exercício físico iniciado previamente a indução do DM sobre a imunomarcagem para ED-1 (marcador de monócitos/macrófagos), CD43 (marcador de linfócitos T), NF- κ B, vimentina, TGF- β 1 e fibronectina no tecido renal de ratas ovariectomizadas;

7. Avaliar o efeito do exercício físico iniciado previamente a indução do DM sobre a expressão proteica de TGF- β 1 no tecido renal de ratas ovariectomizadas;

8. Analisar a influência do exercício físico iniciado previamente a indução do DM sobre os níveis de TBARS no tecido renal de ratas ovariectomizadas.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizadas 24 ratas *Wistar*, de 20 semanas de idade pesando entre 180-200 g, as quais foram mantidas no biotério da Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira em ambiente com controle de luz (12 horas claro, 12 horas escuro) e temperatura variando entre $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ e livre acesso à água e ração. O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IMS/UFBA (protocolo nº 008/2013; prorrogação aprovada em 24 de abril de 2018).

6.2 Procedimentos experimentais

Após uma semana de adaptação, os animais foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (remoção cirúrgica dos ovários). Duas semanas após a recuperação cirúrgica dos animais, foi realizado o teste de exaustão. Todos os animais foram aptos ao exercício e foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais e submetidos aos seguintes tratamentos:

GRUPO CSO (Controle sedentária ovariectomizada, n=6) - ratas ovariectomizadas, sem treinamento físico e eutanasiadas 8 semanas após injeção única de tampão citrato 0,1M;

GRUPO CPTO (Controle previamente treinada ovariectomizada, n=6) - ratas ovariectomizadas, submetidas ao treinamento físico antes e após injeção única de tampão citrato 0,1M e eutanasiadas 8 semanas após injeção;

GRUPO DSO (Diabética sedentária ovariectomizada, n=6) – ratas diabéticas ovariectomizadas, sem treinamento físico e eutanasiadas 8 semanas após injeção única de estreptozotocina na dose de 40 mg/kg;

GRUPO DPTO (Diabética previamente treinada ovariectomizada, n=6) – ratas diabéticas ovariectomizadas, submetidas ao treinamento físico antes e após indução do diabetes e eutanasiadas 8 semanas após injeção única de estreptozotocina na dose de 40 mg/kg.

Os animais do grupo CPTO e DPTO foram submetidos a quatro semanas de treinamento aeróbio previamente à indução do DM, enquanto os animais dos demais grupos foram mantidos sedentários. Após as quatro semanas foi realizada indução do DM nos animais dos grupos DSO e DPTO. O DM foi induzido pela administração de uma única injeção intravenosa, por meio da veia da cauda, de STZ (Sigma Aldrich, USA), na dose de 40 mg/kg, diluída em tampão citrato 0,1M, pH 4,5, após 12 horas de jejum, enquanto os animais dos grupos controles receberam uma única dose intravenosa de tampão citrato 0,1M, pH 4,5. A confirmação do DM foi realizada uma semana após a injeção de STZ ou veículo, através da glicemia capilar de jejum (GCJ),

mensurada por um glicosímetro digital e os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos (Accu-Check Active glucose strips, Roche - Mannheim, Germany).

Após a confirmação do diabetes, os grupos CPTO e DPTO foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbico por um período de oito semanas. Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta de urina de 24 horas. Após a coleta de urina, os animais foram eutanasiados por decapitação, tendo amostras de sangue coletadas. Os rins foram removidos, descapsulados e armazenados para posteriores análises, sendo o rim esquerdo fixado e destinado a estudos imunoistoquímicos e o rim direito a estudos de biologia molecular.

6.3 Procedimento cirúrgico

Para a realização da ovariectomia bilateral, os animais foram anestesiados com Xilazina® (2mg/ml) e Ketamina® (50mg/ml), nas doses de 2mg/Kg e 50mg/Kg, respectivamente, via intraperitoneal. Para tal, o animal foi colocado em decúbito lateral e feita uma pequena incisão longitudinal da pele e tecido celular subcutâneo para que fosse possível adentrar a cavidade peritoneal, possibilitando assim a visualização do ovário e remoção deste. Como medida profilática a infecção pós-operatória, os animais receberam uma dose de 5mg/Kg de antibiótico enrofloxacino (Flotril® 2,5%).

6.4 Protocolo de treinamento

6.4.1 Teste de Corrida Máxima

Inicialmente os animais foram mantidos em esteira motorizada (AVS Projetos - SP, Brasil) parada por três dias com finalidade de ambientação e climatização por outros cinco dias na esteira a 5 m/min. Todos os animais foram aptos ao exercício. Em seguida, os animais foram submetidos a um teste de corrida máxima (100% da intensidade) a fim de determinar a capacidade física e a intensidade do treinamento para cada animal (55 a 70% da intensidade máxima). Tal teste consistiu de corrida em 3 dias alternados, no qual o animal inicialmente permanece em esteira parada durante 5 minutos, tendo então a velocidade aumentada em 1 m/min a cada 6 segundos até atingir a velocidade de 10 m/min. A partir de então, o tempo foi disparado e a velocidade aumentada em 1m/min a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão. Foi considerado exausto o animal que parou de correr durante 2 segundos por 3 vezes em um minuto, ou quando ele permaneceu parado durante 10 segundos. Este teste foi realizado

no início, a cada 4 semanas, e no final do protocolo de treinamento para determinar a capacidade física e/ou ajustar a intensidade do exercício durante o protocolo de treinamento (AMARAL et al., 2016).

6.4.2 Protocolo de Exercício Físico Aeróbico

O treino prévio para os grupos CPTO e DPTO consistiu de corrida em esteira com um volume de 20 min na primeira semana, e acréscimos de 10 minutos semanais até que o animal atingisse o volume máximo de 1 h no final da quarta semana. Do mesmo modo, a intensidade de exercício também foi progressivamente aumentada de 55-70% da capacidade máxima atingida pelo animal no teste de corrida máxima (SILVA et al., 2012). Esse protocolo foi realizado com 0% de inclinação da esteira, durante cinco dias seguidos por semana, e é considerado como um exercício de intensidade moderada para ratos diabéticos (RODRIGUES et al., 2011, SILVA et al., 2012).

Uma semana após a indução do DM ou injeção de tampão citrato, o grupos CPTO e DPTO foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento descrito acima, durante um período de 8 semanas. Os animais dos grupos CSO e DSO foram colocados na esteira em movimento à 5 m/min durante 5min, em dias alternados, para mantê-los climatizados à esteira nos períodos dos testes de exaustão.

6.5 Determinação do Peso Corporal

As determinações de peso corporal foram realizadas semanalmente, com os animais conscientes, em ambiente livre de ruídos para evitar estresse e interferências nos resultados. Para a pesagem dos animais foi utilizada balança digital Acculab®.

6.6 Determinação dos níveis de estradiol e glicemia pós-prandial

Para a determinação dos níveis de 17β -estradiol e glicemia pós-prandial foram utilizadas amostras de soro. A dosagem do 17β -estradiol foi realizada por imunoenensaio automatizado (Beckman Coulter DXI 680) e da glicemia pós-prandial por fotometria automatizada (Beckman Coulter AU 480).

6.7 Análise da Função Renal

Para a determinação dos parâmetros de função renal foram utilizadas amostras de soro e de urina. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 horas para coleta da urina. O fluxo urinário foi determinado a partir do volume urinário de 24 horas. As

amostras de sangue foram obtidas durante a eutanásia pela coleta de sangue do tronco. O sangue foi coletado em tubos e em seguida centrifugado, para separação do soro. A urina e o soro foram armazenados a -70°C para análises da função renal.

6.7.1 Quantificação da proteinúria e glicosúria e creatinina, Na⁺, K⁺ e ureia nas amostras de sangue e de urina

As análises de proteinúria, glicosúria e as análises séricas e urinárias de creatinina, Na⁺, K⁺ e ureia foram realizadas por fotometria automatizada (Beckman Coulter AU480). A partir disso foi realizado cálculo para avaliação da taxa de filtração glomerular (¹TFG), determinada pelo *Clearance* de Creatinina. As cargas e frações de excreção (²FE) de Na⁺ e K⁺ foram também realizadas pós as determinações das concentrações séricas e urinárias destes íons. A determinação da ureia foi determinada pelo ³Clearance de ureia.

$${}^1\text{TFG} = \frac{\text{Concentração de Creatinina Urinária} \times \text{Volume}}{\text{Concentração de Creatinina Sérica}}$$

$${}^2\text{FENa} = \frac{\text{Concentração de Na}^+ \text{ Urinário} \times \text{Creatinina Plasmática}}{\text{Concentração de Na}^+ \text{ Sérico} \times \text{Creatinina Urinária}} \times 100$$

$${}^3\text{Clearance de ureia} = \frac{\text{Concentração de Ureia Urinária} \times \text{Volume Urinário}}{\text{Concentração de Ureia Sérica}}$$

6.8 Histologia Renal

Os animais foram eutanasiados 8 semanas após as injeções de STZ ou tampão citrato e tiveram os rins removidos para os estudos histológicos. Os rins foram fixados em solução de methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante um período de 24 horas e logo após o fixador foi substituído por álcool etílico hidratado 70%. O tecido renal foi parafinizado, cortado em secções de 4 µm de espessura e corado com Ácido Periódico de Schiff para avaliação da glomeruloesclerose segmentar focal e morfometria glomerular Tricrômio de

Masson para avaliação de fibrose glomerular, e Hematoxilina e Eosina, para avaliação do comprometimento túbulo-intersticial do córtex renal.

6.8.1 Índice Glomeruloesclerótico

Amostras do tecido renal dos animais foram fixadas em solução Methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30%, e 10% de ácido acético) e processadas para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4µm foram corados com o reagente ácido periódico de Schiff (PAS), contra-corados com hematoxilina, e examinadas sob microscopia de luz (Olympus BX51 - Japan). A glomeruloesclerose segmentar focal (GESF) foi evidenciada pelo aumento segmentar da matriz glomerular, obliteração segmentar ou dilatação da luz dos capilares glomerulares. Cem glomérulos por seção foram selecionados e analisados aleatoriamente e a GESF foi classificada de acordo com Saito e colaboradores (1987) numa escala de 0 a 4 (0 = grau glomérulos normais; grau 1 = área esclerótica até 25%; grau 2 = área esclerótica 25 a 50%; grau 3 = área esclerótica 50 a 75%; grau 4 = área esclerótica entre 75 e 100%). O índice glomeruloesclerótico (GSI) foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $GSI = (1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) + (4 \times N4) / NT$, onde nT é a soma dos glomérulos avaliado (SAITO et al., 1987). Tal análise foi realizada por um observador que desconhecia o grupo experimental ao qual o animal pertencia.

6.8.2 Morfometria Glomerular

Para analisar a área do tufo glomerular, cortes histológicos de 4µm foram corados com PAS e 70 glomérulos (50 corticais e 20 justamedulares) de cada animal foram fotografados através de uma câmera acoplada ao microscópio e enviadas para um computador. As bordas externas de cada tufo glomerular foram delimitadas manualmente, cujas áreas foram determinadas por morfometria computadorizada através do programa *Image J 1.44P* (National Institute of Health, USA).

6.8.3 Fibrose glomerular

Para avaliação da fibrose glomerular, cortes histológicos de 4µm foram corados com Tricrômio de Masson. Em seguida, 70 glomérulos (50 corticais e 20 justamedulares) de cada animal foram fotografados através de uma câmera acoplada ao microscópio (Olympus BX51 - Japan) e enviadas para um computador e as proporções das áreas positivas dos tecidos foram determinadas pelo limite de cor, obtidas utilizando-se o software *Image J 1.44P* (National Institute of Health, EUA), com os resultados expressos como percentagens.

6.8.4 Lesões túbulo-intersticiais

Para avaliar as lesões túbulo-intersticiais, cortes histológicos de 4µm foram coradas com hematoxilina-eosina, cujas lesões foram definidas como sinais de necrose tubular, dilatação do lúmen tubular, degeneração hidrópica e perda da borda em escova. Foram analisados 30 campos por córtex renal de cada animal, e as lesões foram classificadas de acordo o escore de Shih e colaboradores (1988) numa escala de 0 a 4 (0 = normal; 0,5 = pequenas áreas focais de lesão; 1 = comprometimento menor do que 10% do córtex; 2 = 10-25% de comprometimento; 3 = 25-75% de comprometimento; 4 = lesões extensas envolvendo mais do que 75% do córtex renal). Tal análise foi realizada por um observador que desconhecia os grupos experimentais. Após essa análise, foi realizada uma quantificação estratificada onde o número de túbulos com cada uma das alterações foi multiplicado por 100 e dividido pelo número total de túbulos por campo e o dado foi apresentado como porcentagem de túbulos lesados (KIM et al., 2010). Essa alterações foram determinadas por método computadorizado através do programa *Image J* 1.44P (National Institute of Health, USA).

6.9 Estudos Imunoistoquímicos

Cortes histológicos do tecido renal foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente o anticorpo anti-ED1 monoclonal (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e durante a noite a 4 °C com os seguintes anticorpos: anti-vimentina (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-6260) anti-TGF-β1 policlonal (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-146); anti-fibronectina policlonal (1:500) (Chemicon, Temecula, CA, USA; AB1954), anti-linfócito monoclonal (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-53044) e anti-p65NF-κB policlonal (1:100) (Abcam, Cambridge, UK; ab7970). O produto das reações foi detectado com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e revelado com 3,3-diaminobenzidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). As secções foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas e montadas. Como exceção para a reação com o anti-ED1, ligações não-específicas de proteínas foram bloqueadas por incubação com 20% de soro de cabra durante 30 min. Os controles negativos foram realizados por meio da substituição dos anticorpos primários com concentrações equivalentes de IgG de coelho normal. Para avaliar a imuno-reatividade das reações, 100 glomérulos e 30 campos do compartimento túbulo-intersticial (CTI) cortical foram lidos de cada lâmina para ED-1, CD43 e p65NF-κB. A quantificação da imuno-reatividade de vimentina, TGF-β1, fibronectina glomerular e CTI do córtex renal e do CTI do córtex renal p65NF-κB foi determinada usando o software *Image J* 1.44P (National Institute of Health, USA) e os resultados foram expressos como porcentagens,

em 70 glomérulos (50 corticais e 20 justamedulares) e 30 campos do compartimento túbulo intersticial do córtex renal (0,245 mm²).

6.10 Expressão proteica de TGF- β 1 por *Western blot*

6.10.1 Preparação de homogenato do tecido renal

As amostras de tecido renal foram homogeneizadas em solução de isolamento (manitol 200 mM, HEPES 80 mM e KOH 41 mM, pH 7,5) contendo um coquetel de inibidores de proteases (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) usando o homogeneizador (Polytron - PT 10–35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Os homogenatos foram centrifugados a 2000g durante 15 min a 4 °C para remoção de núcleos e detritos celulares. Os sobrenadantes foram isolados e a proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio Agency Laboratórios, São Paulo, Brasil) (GONÇALVES et al., 2014).

6.10.2 Eletroforese e imunoblotting

As proteínas foram separadas em geis de poliacrilamida por eletroforese. Após transferência por electroeluição para membranas de difluoreto de polivinilideno (GE Healthcare Limited, Little Chalfont, UK), as bandas foram bloqueadas por 60 minutos com leite em pó desnatado a 5% em solução salina tamponada com Tris. Os blots foram então incubados overnight com anticorpos anti-Actina (1:5000) e anti-TGF- β 1 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Após lavagem em TBS-T (Solução Salina Tamponada com Tris 0,15% e Tween 20), as proteínas foram incubadas com o anticorpo anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1:1000 e, em seguida as proteínas imunorreativas foram visualizadas por quimioluminescência por documentador de gel Alience 4.7 Uvitec (Cambridge, Cambs, UK). Foi utilizada densitometria para analisar quantitativamente os níveis de proteína, normalizando as bandas pela expressão da actina (GONÇALVES et al., 2014).

6.11 Estimativa do estresse oxidativo renal

6.11.1 Preparação de homogenato do tecido renal

O córtex renal do rim direito foi removido e imediatamente transferido para recipientes com gelo. Em seguida, o tecido renal foi homogeneizado em tampão RIPA (Sigma-Aldrich), centrifugado a 1600g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi colhido para realização do ensaio do ácido tiobarbitúrico (DRAPE et al., 1993). A concentração de proteínas no

homogenato renal foi determinada pelo kit comercial de proteínas totais monoreagente, seguindo as instruções do fabricante (Bioclin, Brasil).

6.11.2 Estimativa da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no homogenatodo córtex renal, utilizando o método de Draper e colaboradores (1993), e seguindo as orientações do kit comercial TBARS (TCA Method) Assay (Cayman Chemical, EUA). 100 μ L de homogenato do córtex renal foram misturados a 100 μ L de ácido tricloacético 10%, e 800 μ L de ácido tiobarbitúrico (53 mg dissolvidos em 100 mL de ácido acético 20%). A mistura reacional foi incubada por uma hora em água fervente; em seguida, os tubos foram transferidos para um banho de gelo a fim de interromper a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas (1600g, 10 minutos à 4°C) e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (BEL Biphotonics®) no comprimento de onda de 532 nm. Os níveis de TBARS foram calculados com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (Cayman Chemical, EUA). Por fim, a concentração de TBARS (μ M) do córtex renal foi normalizada pela concentração de proteínas (mg/mL) e expressa em μ M/mg/mL.

6.12 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade da distribuição, *Kolmogorov-Smirnov*, e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas pelo teste de *Bartlett*. Para a análise dos dados foi utilizada a análise de variância *Two-Way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, com exceções para, o dado de vimentina onde foi utilizado o teste não-paramétrico *Kruskal Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunn* e, dado de *western blot* onde foi utilizada a análise de variância *One-Way* seguido pelo pós-teste de *Newman Keuls*. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o *Graph Pad Prism*, versão 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

7 REFERÊNCIAS

- ADLER, S. G. et al. Glomerular type IV collagen in patients with diabetic nephropathy with and without additional glomerular disease. **Kidney International**, v. 57, n. 5, p.2084–2092, maio 2000.
- AGUILAR, C.; RODRÍGUEZ-DELFIN, L. Efecto de la administración de espironolactona sobre la pérdida de podocitos y la progresión de la nefropatía diabética experimental. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 29, n. 4, p.490-97, 2012.
- ALA-HOUHALA, I. Effects of exercise on glomerular passage of macromolecules in patients with diabetic nephropathy and in healthy subjects. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 50, p.27-33, 1990.
- AL-TRAD, B. et al. Progesterone ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic Rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 1, p.1-13, 2015.
- AMARAL, L. S. D. B. et al. Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. **Experimental Biology And Medicine**, v. 241, n. 4, p.437-445, 20 fev. 2015.
- AMARAL, L. S. D. B. et al. Previous Exercise Training Reduces Markers of Renal Oxidative Stress and Inflammation in Streptozotocin-Induced Diabetic Female Rats. **Journal Of Diabetes Research**, v. 2018, p.1-9, 2018.
- ANTUS, B. et al. Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p.54-61, 2003.
- AWAD, A. S. et al. Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 301, p.F1358-F1366, 2011.
- AYEPOLA, O. R. et al. Kolaviron, a biflavonoid complex of Garcinia kola seeds modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in diabetes-induced nephrotoxic rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 14, p.1785-1793, dez. 2014.
- BALLARD, D. J. et al. Epidemiology of persistent proteinuria in type II diabetes mellitus: population-based study in Rochester, Minnesota. **Diabetes**, v. 37, n.4, p.405–412, 1998.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p.405–412, 1991.
- BORTOLON, J. R. et al. Persistence of Inflammatory Response to Intense Exercise in Diabetic Rats. **Experimental Diabetes Research**, p.1-8, 2012.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p.813-20, 13 dez. 2001.
- BUMKE-VOGT, C.; BÄHR, V.; DIEDERICH, S. Expression of the progesterone receptor and progesterone- metabolising enzymes in the female and male human kidney. **J Endocrinol**, v. 175, 349-364, 2002.
- CAO, Q.; HARRIS, D. C.; WANG, Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. **Physiology**, v. 30, p.183–194, 2015.
- CHANG, A. S. et al. Transforming growth factor- β 1 and diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 310, p.F689-F696, 2016.

- CHEN, Q.; TAO, J.; XIE, X. Astaxanthin Promotes Nrf2/ARE Signaling to Inhibit HG-Induced Renal Fibrosis in GMCs. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p.117-134, 5 abr. 2018.
- CHIARELLI, F.; GASPARI, S.; MARCOVECCHIO, M. L. Role of Growth Factors in Diabetic Kidney Disease. **Hormone And Metabolic Research**, v. 41, n. 08, p.585-593, 18 maio 2009.
- CHIASERA, J. M. et al. Effect of aerobic training on diabetic nephropathy in a rat model of type 2 diabetes mellitus. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 30, p.346-353, 2000.
- CHIN, M. et al. Estrogen and Raloxifene, a Selective Estrogen Receptor Modulator, Ameliorate Renal Damage in db/db Mice. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 6, p.1-8, 2005.
- CHOW, F. et al. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: Correlation with diabetic state and progressive renal injury. **Kidney Int**, v. 65, p.116-128, 2004. *Kidney International*, Vol. 57 (2000), pp. 167–182
- CHRISTOPHER, Michael J. et al. Prevailing hyperglycemia is critical in the regulation of glucose metabolism during exercise in poorly controlled alloxan-diabetic dogs. **Journal Of Applied Physiology**, v. 98, n. 3, p.930-939, mar. 2005.
- COIMBRA, T. M. et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. **Kidney International**, v. 57, p. 167-182, 2000.
- COLEMAN et al. Skeletal muscle as a therapeutic target for delaying type 1 diabetic complications. *World J Diabetes*, v. 6, n. 17, p.1323-1336, 2015.
- DIAMOND-STANIC, M. K.; You, Y. H.; Sharma, K. Sugar, Sex, and TGF- β in Diabetic Nephropathy. **Semin Nephrol**, v. 32, n. 3, p.261–268, 2012.
- DIXON, A.; MARIC, C. 17 β -Estradiol attenuates diabetic kidney disease by regulating extracellular matrix and transforming growth factor-protein expression and signaling. **American Journal Of Physiology - Renal Physiology**, v. 293, n. 5, p.F1678–F1690, 2007.
- DOMINGUETI, C. P. et al. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. **J Diabetes Complications**, v. 30, p. 738–45, 2016.
- ESSAWY, M. et al. Myofibroblasts and the progression of diabetic nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 12, p.43-50, 1997.
- FINAMOR, I. A. et al. Effects of Parboiled Rice Diet on Oxidative Stress Parameters in Kidney of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 7, p.598-604, 2013.
- FORBES, J. M.; COUGHLAN, M. T.; COOPER, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p.1446–1454, 2008.
- FRIEDERICH-PERSSON, M. Kidney hypoxia, due to increased oxygen consumption, induces nephropathy independently of hyperglycemia and oxidative stress. **Hypertension**, v. 62, n. 5, p.1-16, 2013.
- GADES, M. D. et al. Estrogen accelerates the development of renal disease in female obese Zucker rats. **Kidney International**, v. 53, n. 1, p.130-135, 1998.

- GALKINA, E.; LEY, K. Leukocyte Recruitment and Vascular Injury in Diabetic Nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p.368-377, 2006.
- GONÇALVES, Janaína Garcia et al. Vitamin D Deficiency Aggravates Chronic Kidney Disease Progression after Ischemic Acute Kidney Injury. **Plos One**, v. 9, n. 9, p.1-13, 15 2014.
- GONZALEZ-RAMOS, M. et al. Intracellular redox equilibrium is essential for the constitutive expression of AP-1 dependent genes in resting cells: studies on TGF-beta1 regulation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, p.963–971, 2012.
- GHOSH, S. et al. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 296, p.F700–F708, 2009.
- GROSS, M. L. et al. Beneficial effects of estrogens on indices of renal damage in uninephrectomized SHRsp rats. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p.348–358, 2004.
- GU, L. et al. Fasudil Inhibits Epithelial-Myofibroblast Transdifferentiation of Human Renal Tubular Epithelial HK-2 Cells Induced by High Glucose. **Chem Pharm Bull**, v. 61, n. 7, p.688-694, 2013.
- GUNDUZ, F.; SENTURK, U. K. The effect of reactive oxidant generation in acute exercise-induced proteinuria in trained and untrained rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 90, p.526-532, 2003.
- GUO, Y.; et al. Infiltrating macrophages in diabetic nephropathy promote podocytes apoptosis via TNF- α -ROS-p38MAPK pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p.53276-53287, 2017.
- HAAN, J. B. Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, p.F544–F551, 2005.
- HARALDSSON, B.; NYSTRÖM, J.; DEEN, W. M. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. **Physiol Rev**, v. 88, p.451-487, 2008.
- HAYDEN, M. R.; TYAGI, S. C. Islet redox stress: the manifold toxicities of insulinresistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. **Journal Pancreas**, v. 3, p.86–108, 2002.
- HERMAN-EDELSTEIN, M. et al. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- β : a model for diabetic podocytopathy. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p.1779-88, 2011.
- HERRERA, M. et al. Inhibition of T-cell activation by the CTLA4-Fc Abatacept is sufficient to ameliorate proteinuric kidney disease. **American Journal Of Physiology-renal Physiology**, v. 312, n. 4, p.748-759, 2017.
- HUANG, C. et al. KCa3.1 mediates activation of fibroblasts in diabetic renal interstitial fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 29, n. 2, p.313-324, 2013.
- HUANG, C. et al. KCa3.1 mediates activation of fibroblasts in diabetic renal interstitial fibrosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, p.313–324, 2014.

- HUANG, H. et al. Allicin inhibits tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation under high glucose conditions in vitro. **Experimental And Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 1, p.254-262, 2017.
- ITO, D. et al. Chronic Running Exercise Alleviates Early Progression of Nephropathy with Upregulation of Nitric Oxide Synthases and Suppression of Glycation in Zucker Diabetic Rats. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p.e0138037, 2015.
- JHA, J. C. et al. NADPH Oxidase Nox5 Accelerates Renal Injury in Diabetic Nephropathy. **Diabetes**, v. 66, n. 10, p.2691-2703, 2017.
- JU, K. D. et al. Ethyl pyruvate ameliorates albuminuria and glomerular injury in the animal model of diabetic nephropathy. **American Journal Of Physiology-renal Physiology**, v. 302, n. 5, p.606-613, 2012.
- KAKKAR, R. et al. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, v. 151, p.113–119, 1995.
- KARL, M. et al. Autocrine activation of the local insulin-like growth factor I system is up-regulated by estrogen receptor (ER)-independent estrogen actions and accounts for decreased ER expression in type 2 diabetic mesangial cells. **Endocrinology**, v. 146, p.889-900, 2005.
- KIM, S. et al. The reno-protective effect of a phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin on streptozotocin-induced proteinuric renal disease rats. **Experimental And Molecular Medicine**, v. 44, n. 1, p.1-7, 2012.
- KLESSENS, C.Q. et al. Macrophages in diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Nephrol Dial Transplant**, v. 32, p.1322-1329, 2017.
- KOH, H. Regulation of exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. **Annals Of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 2, p.61-65, 2016. Korean Society of Pediatric Endocrinology.
- KOMALA, M. G. et al. Linagliptin Limits High Glucose Induced Conversion of Latent to Active TGF β through Interaction with CIM6PR and Limits Renal Tubulointerstitial Fibronectin. **Plos One**, v. 10, n. 10, p.1-15, 2015.
- KOLSET, S. O.; REINHOLT, F. P.; JENSSEN, T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. **J Histochem Cytochem**, v. 60, p.976-986, 2012.
- KRAG, S. et al. TGF-beta1-induced glomerular disorder is associated with impaired concentrating ability mimicking primary glomerular disease with renal failure in man. **Lab Invest**, v. 80, p.1855-1868, 2000.
- KUMAR, G.; BANU, G. S.; MURUGESAN, A. G. Antihyperglycaemic and antiperoxidative effect of *Helicteres igora* L. bark extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Appl Biomed**, v. 5, p.97–104, 2007.
- KURDAK, H. et al. The effects of regular aerobic exercise on renal functions in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 9, n. 2, p. 294-299, 2010.
- LAN, Y.; ZHOU, Q.; WU, Z. L. NF-kappa B involved in transcription enhancement of TGF-beta 1 induced by Ox-LDL in rat mesangial cells. *Chin Med J (Engl)*, v. 117, p.225-230, 2004.

- LEE, H. B. et al. Reactive oxygen species regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p.S241–S245, 2003.
- LI, L. et al. Fenofibrate attenuates tubulointerstitial fibrosis and inflammation through suppression of nuclear factor- κ B and transforming growth factor- β 1/Smad3 in diabetic nephropathy. **Experimental Biology And Medicine**, v. 235, n. 3, p.383-391, 2010.
- LOW, A. K. et al. Hormone replacement therapy and coronary heart disease in women: a review of the evidence. **Am J Med Sci**, v. 324, p.180–184, 2002.
- LU, Q. et al. Effects of Ginkgo biloba on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Acta Pharmacol**, v. 28, n. 6, p.818–828, 2007.
- LU, H. et al. Polysaccharides from Liriodendron Radix ameliorate streptozotocin-induced type I diabetic nephropathy via regulating NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p.1-12, 2014.
- LV, J.; et al. Renoprotective Effect of the Shen-Yan-Fang-Shuai Formula by Inhibiting TNF- α /NF- κ B Signaling Pathway in Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, p.1-11, 2017.
- MAKINO, H.; NAKAMURA, Y.; WADA, J. Remission and Regression of Diabetic Nephropathy. **Hypertension Research**, v. 26, n. 7, p.515-519, 2003.
- MANKHEY, R. W.; BHATTI, F.; MARIC, C. 17β -Estradiol replacement improves renal function and pathology associated with diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 288, p.F399-F405, 2005.
- MANSOURI, E. et al. Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Oxidative Stress Induced by Diabetes in Rat Kidney. **Iranian Biomedical Journal**, v. 15, n. 3, p.100-106, 2011.
- MAO, Y.; SCHWARZBAUER, J. E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. **Matrix Biol**, 24, p.389-99, 2005.
- MARIC, C.; SANDBERG, K.; HINOJOSA-LABORDE, C. Glomerulosclerosis and Tubulointerstitial Fibrosis are Attenuated with 17β -Estradiol in the Aging Dahl Salt Sensitive Rat. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p.1546-1556, 2004.
- MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 3, p.309-338, 2013.
- MENG, X. et al. Dose-dependent toxic effects of high-dose estrogen on renal and cardiac injury in surgically postmenopausal mice. **Life Sci**, v. 88, n. 3-4, p.178–186, 2011.
- MERZOUK, H. et al. Timecourse of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Clinical Science**, v. 98, p.21–30, 2000.
- MEZZANO, S. et al. NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, p.2505-12, 2004.
- MIDAOU, A.; TANCREDE, G.; NADEAU, A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. **Metabolism**, v. 45, p.810-816, 1996.

- MILLER, A. P. et al. Hormone replacement therapy and inflammation interactions in cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 42, p.657–663, 2003.
- MONTEZANO A. C. et al. Endothelin-1 contributes to the sexual differences in renal damage in DOCA-salt rats. **Peptides**, v. 26, p.1454-1462, 2005.
- MORITZ, R. J. et al. Macrophage TGF- β 1 and the Proapoptotic Extracellular Matrix Protein BIGH3 Induce Renal Cell Apoptosis in Prediabetic and Diabetic Conditions. **International Journal Of Clinical Medicine**, v. 07, n. 07, p.496-510, 2016.
- MORIYA, R.; MANIVEL, J. C.; MAUER, M. Juxtaglomerular apparatus T-cell infiltration affects glomerular structure in Type 1 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 47, n. 1, p.82-88, 2004.
- NARRES, M. et al. The Incidence of End-Stage Renal Disease in the Diabetic (Compared to the Non-Diabetic) Population: A Systematic Review. **Plos One**, v. 11, n. 1, p.1-28, 2016.
- NAVARRO-GONZALEZ, J. F. et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol**, v. 7, p.327-340, 2011.
- NGUYEN D. et al. Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p.226-231, 2006.
- NIELSEN, C. B. Decreases in Renal Functional Reserve and Proximal Tubular Fluid Output in Conscious Oophorectomized Rats: Normalization with Sex Hormone Substitution. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, v. 14, n. 12, p.3102-3110, 2003.
- NOBLE, J. A.; ERLICH, H. A. Genetics of Type 1 Diabetes. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 2, n. 1, p.1-15, 2012.
- O'BRIEN, S.F. et al. Exercise testing as a long-term predictor of the development of microalbuminuria in normoalbuminuric IDDM patients. **Diabetes Care**, v. 18, p.1602-1605, 1995.
- OH, J. H. Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis. **Kidney International**, v. 54, n. 6, p.1872–1878, 1998.
- PALM, F. et al. Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. **Diabetologia**, v. 46, n. 8, p.1153-1160, 2003.
- PARK, I. S. et al. Expression of transforming growth factor-b and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes**, v. 46, p.473-580, 1997.
- PARK, C. W. Diabetic Kidney Disease: From Epidemiology to Clinical Perspectives. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 38, n. 4, p.252-260, 2014.
- PEDRAM, A. et al. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. **Mol Biol Cell**, v. 17, p.2125–2137, 2006.
- PEERI, M. et al. Protective Effect of Aerobic Exercise Against L-Name-Induced Kidney Damage in Rats. **Archives Of Industrial Hygiene And Toxicology**, v. 64, n. 2, p.1-7, 2013.
- PENG, X. et al. IL-17A produced by both T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. **J Pathol**, v. 235, p.79-89, 2015.

- PECHTER, U. et al. Beneficial effects of water-based exercise in patients with chronic kidney disease. **International Journal of Rehabilitation Research**, v. 26, p.153-156, 2003.
- PERSSON, M. F. et al. Coenzyme Q10 prevents GDP-sensitive mitochondrial uncoupling, glomerular hyperfiltration and proteinuria in kidneys from db/db mice as a model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p.1535-1543, 2012.
- POLAT, S. B. et al. Evaluation of biochemical and clinical markers of endothelial dysfunction and their correlation with urinary albumin excretion in patients with type 1 diabetes mellitus. **Arch Endocrinol Metab**, v. 60, n. 2, p.117-124, 2016.
- POORTMANS, J.R.; VANDERSTRAETEN, J. Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. **Sports Medicine**, v. 18, p.419-37, 1994.
- POTIER, M. et al. Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, p.241–251, 2001.
- POTIER, M. et al. Estrogen-related abnormalities in glomerulosclerosis-prone mice: reduced mesangial cell estrogen receptor expression and prosclerotic response to estrogens. **Am J Pathol**, v. 160, p.1877–1885, 2002.
- POURGHASEM, M.; SHAFI, H.; BABAZADEH, Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 6, n. 3, p.120-127, 2015.
- PUNARO, G. R. et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 37, p.53-60, 2014.
- QIAN, Y. et al. From Fibrosis to Sclerosis: Mechanisms of Glomerulosclerosis in Diabetic Nephropathy. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p.1439-1445, 2008.
- REDDY, A. S. Diabetic Nephropathy: Theory & practise. East Hanover, NJ: College Book Publishers. L.L.C. 2004; 563.
- REDDY, M. A. et al. Epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Semin Nephrol**, v. 33, p.341-53, 2013.
- REEVES, W. B.; ANDREOLI, T. E. Transforming Growth Factor- β contributes to progressive diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p.7667–7669, 2000.
- RIAD, A. et al. Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. **Eur J Pharmacol**, v. 569, p.204-211, 2007.
- RODRIGUES, A. M.; et al. Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type I diabetic rats. **Experimental Biology And Medicine**, v. 236, n. 10, p.1180-1187, 2011.
- ROSSOUW, J. E. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 288, p.321-333, 2002.
- SAMENI, H. R.; et al. Effects of ethanol extract of propolis on histopathological changes and anti-oxidant defense of kidney in a rat model for type 1 diabetes mellitus. **J Diabetes Investig**, v. 7, n. 4, p.506-513, 2016.

- SANDHI, J. et al. Involvement of progesterone receptors in ascorbic acid-mediated protection against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. **J Surg Res**, v. 187, p.278-288, 2014.
- SATELLI A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, p.3033-3046, 2011.
- SEO, J.; et al. Mycophenolate Mofetil Ameliorates Diabetic Nephropathy in db/db Mice. **Biomed Research International**, v. 2015, p.1-11, 2015.
- SHARMA, K.; et al. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. **Diabetes**, v. 45, p.522-530, 1996.
- SIGAL, R.J. et al. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p.2518-2539, 2004.
- SINGH, D. K.; WINOCOUR, P.; FARRINGTON, K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. **Nature reviews Endocrinology**, v. 7, n. 3, p.176-84, 2011.
- SINGH, R. M.; et al. Type 1 diabetes mellitus induces structural changes and molecular remodelling in the rat kidney. **Molecular And Cellular Biochemistry**, p.1-17, 2018.
- SILVA, Kleiton Augusto dos Santos et al. Previous Exercise Training Has a Beneficial Effect on Renal and Cardiovascular Function in a Model of Diabetes. **Plos One**, v. 7, n. 11, p.1-10, 2012.
- SLAUGHTER, T. N. et al. Characterization of the development of renal injury in Type-1 diabetic Dahl salt-sensitive rats. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, v. 305, n. 7, p.727-734, 2013.
- SMITH, D. C. et al. Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. **N Engl J Med**, v. 293, p.1164-1167, 1975.
- SMITH A. C.; BURTON J. O. Exercise in kidney disease and diabetes: time for action. **Journal of Renal Care**, v. 38, n. 1, p.52-58, 2012.
- SOETIKNO, V. et al. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF-B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, p.35, 2011.
- SOURRIS, K. C.; FORBES, J. M. Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy - are these receptors valid therapeutic targets. **Curr Drug Targets**, v. 10, n. 1, p.42-50, 2009.
- SUGIMOTO, H. et al. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in diabetic rat glomeruli: glomerular hyperfiltration is a potential mechanism of ICAM-1 upregulation. **Diabetes**, v. 46, n. 12, p.2075-2081, 1997.
- SUMI, A. et al. Roles of coagulation pathway and factor Xa in the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. **Biol Pharm Bull**, v. 34, p.824-830, 2011.
- TOMIYOSHI, Y. et al. Different Effects of Castration and Estrogen Administration on Glomerular Injury in Spontaneously Hyperglycemic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. **Nephron**, v. 92, n. 4, p.860-867, 2002.

- TONG, F. et al. Quercetin nanoparticle complex attenuated diabetic nephropathy via regulating the expression level of ICAM-1 on endothelium. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 12, p.7799-7813, 2017.
- TSUCHIDA, K. I.; CRONIN, B.; SHARMA, K. Novel aspects of transforming growth factor-beta in diabetic kidney disease. **Nephron**, v.92, p.7-21, 2002.
- TUFESCU, A. et al. Combination of exercise and losartan enhances renoprotective and peripheral effects in spontaneously type 2 diabetes mellitus rats with nephropathy. **Journal Of Hypertension**, v. 26, n. 2, p.312-321, 2008.
- UTIMURA, R. et al. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. **Kidney Int**, v. 63, p.209-216, 2003.
- VIETINGHOFF, S. et al. Mycophenolate mofetil decreases atherosclerotic lesion size by depression of aortic T-lymphocyte and interleukin-17-mediated macrophage accumulation,” **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 21, p. 2194–2204, 2011.
- WACHI, T. et al. Progesterone induced mesenchymal differentiation and rescued cystic dilation of renal tubules of Pkd1^{-/-} mice. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 2, p.212-218, 2012.
- WADA, J.; MAKINO, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clinical Science**, v. 124, p.39-152, 2013.
- WANG, S. et al. Nitric Oxide and cGMP-dependent Protein Kinase Regulation of Glucose-mediated Thrombospondin 1-dependent Transforming Growth Factor- Activation in Mesangial Cells. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p.9880-9888, 2002.
- WANO, M. et al. Quantification of glomerular TGF-β1 mRNA in patients with diabetes mellitus. **Kidney Int**, v. 49, p.1120-1126, 1996.
- WARD, K. M.; MAHAN, J. D.; SHERMAN, W. M. Aerobic training and diabetic nephropathy in the obese Zucker rat. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 24, n. 3, p.266-277, 1994.
- WU, L. L. et al. Macrophage and myofibroblast proliferation in remnant increased progressively up to 16 weeks after nephrectomy-kidney: Role angiotensin II. **Kidney Int**, v. 52, p.S221–S225, 1997.
- YANES, L. L.; SARTORI-VALINOTTI, J. C.; RECKELHOFF, J. F. Sex steroids and renal disease: lessons from animal studies. **Hypertension**, v.51, p.976-981, 2008.
- YI, B.; HUANG, G.; ZHOU, Z. Different role of zinc transporter 8 between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Investig**, v. 7, n. 4, p.459-465, 2016.
- YOU, Hanning et al. Macrophages directly mediate diabetic renal injury. **American Journal Of Physiology-renal Physiology**, v. 305, n. 12, p.1719-1727, 2013.
- YOU, H. et al. Podocyte-specific chemokine (C-C motif) receptor 2 overexpression mediates diabetic renal injury in mice. **Kidney International**, v. 91, n. 3, p.671-682, 2017.
- ZHANG, L. et al. Paeonol Ameliorates Diabetic Renal Fibrosis Through Promoting the Activation of the Nrf2/ARE Pathway via Up-Regulating Sirt1. **Frontiers In Pharmacology**, v. 9, p.1-15, 2018.

ZIEL, H. K.; FINKLE, W. D. Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. **N Engl J Med**, v. 293, p.1167-1170, 1975.

ZIYADEH, F. N. et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p.8015-8020, 2000.

CAPÍTULO 1

Efeito preventivo do exercício físico na nefropatia diabética em ratas ovariectomizadas

Cláudia Silva Souza¹, Bianca Silva de Sousa Oliveira¹, Geovanildo Nascimento Viana¹, Thiago Macêdo Lopes Correia¹, Márcio Vasconcelos Oliveira¹, Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão¹, Lilianny Souza de Brito Amaral¹ e Telma de Jesus Soares¹

¹Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia 45029-094, Brasil. Programade Pós-Graduação em Biociências.

Autor Correspondente: Dra. Telma de Jesus Soares, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Rua Rio de Contas, 58, Candeias, CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. Tel: 55-77-3429-2709; Fax: 55-77-3429-2709; email: tejsouares@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do exercício físico regular moderado, iniciado previamente a indução do diabetes *mellitus* (DM), sobre a peroxidação lipídica, inflamação e a função e estrutura renal em ratas ovariectomizadas com diabetes *mellitus* do tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ). Para isso, vinte e quatro ratas *Wistar* foram anestesiadas e submetidas à ovariectomia bilateral. Após a recuperação cirúrgica, as ratas foram divididas em quatro grupos experimentais: CSO - ratas controles sedentárias ovariectomizadas; DSO - ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas; CPTO – ratas controle previamente treinadas ovariectomizadas; DPTO - ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas. Os grupos CPTO e DPTO foram submetidos a corrida em esteira por 4 semanas antes da indução do DM com STZ (40 mg/kg, i.v). Após confirmação do diabetes, os grupos CPTO e DPTO foram submetidos a mais oito semanas de treinamento físico. Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento foram coletadas amostras de urina. Amostras de sangue e os rins foram retirados, após a eutanásia, para a análise de função renal, histologia, morfometria, imunistoquímica e determinação dos níveis renais de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os nossos resultados mostraram que o exercício físico iniciado previamente à indução do DM reduziu a glicemia pós-prandial nas ratas do grupo DPTO. O grupo DPTO apresentou também melhora do peso corporal e da capacidade física induzida pelo exercício. Os dados de função renal demonstraram diminuição da creatinina sérica, da glicosúria e proteinúria induzida pelo exercício físico nas ratas do grupo DPTO. As alterações glomerulares e túbulo-intersticiais induzidas pelo diabetes nas ratas DSO foram atenuadas pelo exercício iniciado previamente à indução do DM nas ratas DPTO. As expressões de vimentina, macrófagos, linfócitos, fibronetina, TGF- β 1 e NF- κ B estavam elevadas nos glomérulos das ratas DSO. Essas expressões foram reduzidas nas ratas do grupo DPTO. O exercício reduziu também as expressões de vimentina, macrófagos, linfócitos e TGF- β 1 no compartimento túbulo-intersticial (CTI) do córtex renal do grupo DPTO. O aumento dos níveis de TBARS no córtex renal das ratas diabéticas foi prevenido pelo exercício prévio nas ratas DPTO. O exercício físico iniciado anteriormente à indução do diabetes, exerceu efeito renoprotetor ao desenvolvimento da nefropatia diabética em ratas ovariectomizadas.

Palavras-chave: Exercício físico, nefropatia diabética, ovariectomia

INTRODUÇÃO

A nefropatia diabética (ND) é uma complicação microvascular, considerada como uma das principais causas de doença renal terminal (PAPADOPOULOU-MARKETOU et al., 2018; TORIU et al., 2018). O primeiro sinal de ND é a microalbuminúria (GROSS et al., 2005), a qual, sem intervenções específicas, pode progredir para proteinúria, ou síndrome nefrótica, e declínio na função renal (KURDAK et al., 2010). Durante a progressão da ND são observadas características histopatológicas como espessamento da membrana basal glomerular, acúmulo de proteínas de matriz extracelular (MEC), glomeruloesclerose e alterações estruturais no CTI, as quais podem culminar em desenvolvimento de fibrose no parênquima renal (BRITO et al., 1998; KATZ et al., 2002; CHEN et al., 2018).

Múltiplos fatores têm sido implicados no desenvolvimento e progressão da ND, incluindo a ação de citocinas profibróticas, estresse oxidativo e infiltração de células inflamatórias (SCHMID et al., 2006). A hiperglicemia causada pelo DM aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais impulsionam o desenvolvimento da ND, e estão associadas à sinalizações que levam a progressão das complicações renais (LEE, 2003; KAWAHITO et al., 2009). Nesse sentido, altos níveis de EROs contribuem para a peroxidação lipídica de membranas celulares (PUNARO et al., 2014), causam anormalidades no endotélio vascular (SCHNACKENBERG, 2002), estimulam a expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias como o TGF- β 1 (LEE et al., 2003) e estão relacionados à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (BORGOHAIN et al., 2017). O NF- κ B é um importante regulador transcricional pró-inflamatório, considerado como um mediador chave para a infiltração de células inflamatórias e aumento da expressão de TGF- β 1 no rim diabético (BONIZZI, KARIN 2004; SOETIKNO et al., 2011).

O recrutamento de células inflamatórias para o tecido renal é uma característica crítica da ND (NAVARRO-GONZÁLEZ et al. 2011). O acúmulo de macrófagos e linfócitos em glomérulos e tecidos intersticiais correlacionam-se com o grau de lesão estrutural e disfunção renal na ND (NGUYEN et al., 2006; SEO et al., 2015). Estudos demonstraram que macrófagos e linfócitos infiltrantes contribuem para a progressão da ND por aumentar a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de ativar cascatas de sinalização profibrótica, favorecendo assim o desenvolvimento de esclerose e cicatrização renal (CAO et al., 2015; SEO et al., 2015). O TGF- β 1 intensifica a resposta inflamatória, estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de várias proteínas de MEC, incluindo fibronectina e colágenos (LI et al., 2010).

Evidências sugerem que a redução dos hormônios sexuais femininos parece ter papel importante na susceptibilidade e progressão da ND. Nesse sentido, estudos demonstraram que a ovariectomia foi associada ao desenvolvimento de albuminúria, expansão mesangial, acúmulo de matriz extracelular, glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial em ratas portadoras de DM do tipo 1 (MANKHEY et al., 2004; CHIN et al., 2005). Adicionalmente, Meng e colaboradores (2011) demonstraram que a redução de estrógeno contribuiu para o aumento do estresse oxidativo, o que mediou a lesão renal observada em camundongos ovariectomizados. Estudos demonstraram também que a falência química ovariana acentuou a hiperglicemia e contribuiu para a progressão acelerada da ND em camundongos com DM induzido por STZ (KECK et al., 2007; DIAMOND-STANIC et al., 2011).

Nessa perspectiva, o exercício físico de intensidade moderada surge como uma importante intervenção, uma vez que estudos têm demonstrado seus benefícios relacionados à atenuação de complicações microvasculares, aumento da sensibilidade à insulina, melhora da função renal (SILVA et al., 2012) e controle do estresse oxidativo (RODRIGUES et al., 2011).

Estudos demonstraram também que o exercício realizado previamente à indução do diabetes reduziu o número de linfócitos e reduziu a ativação do NF- κ B e a expressão de TGF- β 1 em rins de ratas com ND (AMARAL et al., 2016; AMARAL et al., 2018). Adicionalmente, Souza e colaboradores (2007) demonstraram que o exercício proporcionou melhora da função autonômica e redução da mortalidade em ratas diabéticas ovariectomizadas. Mais recentemente, Conti e colaboradores (2015) demonstraram também que o exercício físico atenuou as alterações metabólicas induzida por sobrecarga de frutose em ratas espontaneamente hipertensas ovariectomizadas. Entretanto, não foram encontrados estudos avaliando o papel do exercício físico iniciado previamente à indução do DM sobre a progressão da ND em ratas ovariectomizadas. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do exercício físico iniciado previamente à indução do DM sobre a peroxidação lipídica, inflamação, função e estrutura renal em ratas ovariectomizadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e cirurgia

Um total de 24 ratas *Wistar* de 20 semanas de idade, pesando entre 180 – 200 g, foram mantidas em ambiente (12 horas claro, 12 horas escuro) e temperatura de $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ com livre acesso à água e ração. As ratas foram anestesiadas com xilazina (6mg/kg) e ketamina (40mg/kg), e submetidas à ovariectomia bilateral (AMARAL et al., 2014). Duas semanas após a cirurgia, os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais (n=6/cada): CSO - ratas controles sedentárias ovariectomizadas; DSO - ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas; CPTO – ratas controle previamente treinadas ovariectomizadas; DPTO - ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas. O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do IMS/UFBA (Protocolo nº 008/2013).

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as recomendações do Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

Indução do diabetes *mellitus*

Após uma semana do procedimento cirúrgico, o diabetes *mellitus* do tipo 1 foi induzido pela administração de uma única injeção intravenosa de STZ (Sigma-Aldrich, EUA), na dose de 40 mg/kg, diluída em tampão citrato 0,1M. Os animais dos grupos controles receberam injeção intravenosa de tampão citrato 0,1M. Uma semana após a injeção de STZ, o diabetes foi confirmado pela determinação da glicemia capilar de jejum (GCJ) usando um glicosímetro digital (Accu-Check Active glucose strips, Roche - Mannheim, Germany). Os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos.

Teste de corrida máxima

Inicialmente os animais foram mantidos em esteira motorizada (AVS Projetos - SP, Brasil) parada durante 5 minutos por três dias com finalidade de ambientação, e climatização por outros cinco dias na esteira a 5 m/min. Após esse período, os animais foram submetidos a um teste de corrida máxima, onde a velocidade foi aumentada em 1m/min a cada 3 minutos até o animal atingir a exaustão. Este teste foi realizado em três dias alternados, no início, a cada 4 semanas, e no final do protocolo de treinamento para determinar a capacidade física e/ou ajustar a intensidade do exercício durante o protocolo de treinamento (AMARAL et al., 2016).

Protocolo de treinamento físico

O treino prévio à injeção da STZ ou veículo para os grupos DPTO e CPTO, respectivamente, consistiu de corrida em esteira com um volume de 20 min na primeira semana, e acréscimos de 10 minutos semanais até que o animal atingisse o volume máximo de 1 h no final da quarta semana. Do mesmo modo, a intensidade de exercício também foi progressivamente aumentada

de 55-70% da capacidade máxima atingida pelo animal no teste de corrida máxima (SILVA et al., 2012). Esse protocolo foi realizado com 0% de inclinação da esteira, durante cinco dias seguidos por semana, e é considerado como um exercício de intensidade moderada para ratos diabéticos (RODRIGUES et al., 2011, SILVA et al., 2012). Os grupos CPTO e DPTO foram submetidos a 4 semanas de exercício aeróbico em esteira antes da indução do diabetes. Após esse período, o diabetes foi induzido nos grupos DSO e DPTO. Uma semana após a indução do DM ou injeção de tampão citrato, o grupos CPTO e DPTO foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento descrito acima, durante um período de 8 semanas. Os animais dos grupos CSO e DSO foram colocados na esteira em movimento à 5 m/min durante 5min, em dias alternados, para mantê-los climatizados à esteira nos períodos dos testes de exaustão. Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta de urina de 24 horas. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de amostras de sangue. O rim esquerdo foi removido, pesado, fixado e destinado a estudos histológicos e imunoistoquímicos. O rim direito foi destinado a estudos da expressão proteica para TGF- β 1 e para o ensaio de estresse oxidativo.

Peso corporal e peso do rim

As determinações de peso corporal foram realizadas semanalmente, por meio de balança digital (Acculab®), com os animais conscientes, em ambiente livre de ruídos para evitar estresse e interferências nos resultados. Após a eutanásia, os rins foram removidos e pesados. O peso do rim foi avaliado pela média do peso do rim direito e esquerdo.

Glicemia pós-prandial, glicosúria e níveis séricos de 17 β -estradiol

O perfil glicêmico foi avaliado em amostras de soro coletado após eutanásia, pela glicemia pós-prandial. A glicosúria foi determinada em amostras de urina coletadas em gaiolas metabólicas, 48 horas após a última sessão do treinamento físico. As concentrações de 17 β -estradiol foram

analisadas nas amostras de soro coletadas após a eutanásia das ratas de todos os grupos experimentais. A glicemia e glicosúria foram dosados por fotometria automatizada (Beckman Coulter AU480) e os níveis séricos de 17β -estradiol por imunoenensaio (Beckman Coulter DXI 680).

Função Renal

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas. Após a eutanásia, amostras de sangue foram retiradas para determinação das concentrações de creatinina, ureia, sódio e potássio. O fluxo urinário foi determinado a partir do volume total de urina em 24h e a taxa de filtração glomerular (TFG) foi calculada através do *clearance* de creatinina. As dosagens de sódio e potássio foram determinadas e calculadas as frações de excreção desses íons. Além disso, foi realizada quantificação da proteína urinária. Esses parâmetros de função renal foram analisados usando um analisador bioquímico automático (Beckman Coulter AU 480).

Morfologia Renal

Índice glomeruloesclerótico

Após a eutanásia, os rins foram removidos para os estudos histológicos e morfométricos. O rim esquerdo removido foi fixado em solução de *Methacarn*. O tecido foi parafinizado, cortado em fatias de 4 μ m de espessura e corado com Ácido Periódico Shift (PAS) para avaliação da glomeruloesclerose e examinadas sob microscopia de luz (Olympus BX51 - Japan). A glomeruloesclerose segmentar focal (GESF) foi evidenciada pelo aumento segmentar da matriz glomerular, obliteração segmentar ou dilatação da luz dos capilares glomerulares. Cem glomérulos por animal foram selecionados e analisados aleatoriamente e a GESF foi classificada de acordo com Saito e colaboradores (1987) numa escala de 0 a 4 (0 = grau glomérulos normais; grau 1 = área esclerótica até 25%; grau 2 = área esclerótica 25 a 50%; grau

3 = área esclerótica 50 a 75%; grau 4 = área esclerótica entre 75 e 100%). O índice glomeruloesclerótico (GSI) foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $GSI = (1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) + (4 \times N4) / NT$, onde nX é número de glomérulos com determinado grau de lesão, e nT é a soma dos glomérulos avaliado (SAITO et al., 1987). Tal análise foi realizada por um observador que desconhecia o grupo experimental ao qual o animal pertencia.

Morfometria glomerular

Para analisar a área do tufo glomerular, cortes histológicos de 4µm foram corados com PAS e 70 glomérulos (50 corticais e 20 justamedulares) de cada animal foram fotografados através de uma câmera acoplada ao microscópio (Olympus BX51 - Japan). As bordas externas de cada tufo glomerular foram delimitadas manualmente, cujas áreas foram determinadas por morfometria computadorizada através do programa *Image J 1.44P* (National Institute of Health, USA) e os resultados foram expressos em percentagens.

Fibrose glomerular

Para avaliação da fibrose glomerular, cortes histológicos de 4µm foram corados com Tricrômio de Masson (TM). Em seguida, 70 glomérulos (50 corticais e 20 justamedulares) de cada animal foram fotografados através de uma câmera acoplada ao microscópio (Olympus BX51 - Japan). As áreas marcadas foram analisadas pelo software *Image J 1.44P* (National Institute of Health, USA) e os resultados expressos como percentagens.

Lesões túbulo-intersticiais

Para avaliar as lesões túbulo-intersticiais, cortes histológicos de 4µm foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), cujas lesões foram caracterizadas como dilatação do lúmen tubular, degeneração hidrópica, perda da borda em escova e necrose tubular. Foram analisados 30 campos por córtex renal de cada animal, e as lesões foram classificadas de acordo o escore de

Shih e colaboradores (1988) numa escala de 0 a 4 (0 = normal; 0,5 = pequenas áreas focais de lesão; 1 = comprometimento menor do que 10% do córtex; 2 = 10-25% de comprometimento; 3 = 25-75% de comprometimento; 4 = lesões extensas envolvendo mais do que 75% do córtex renal). Tal análise foi realizada por um observador que desconhecia os grupos experimentais. Após essa análise, foi realizada uma quantificação estratificada onde o número de túbulos com cada uma das alterações foi dividido pelo número total de túbulos por campo e multiplicado por 100. O dado foi apresentado como porcentagem de túbulos lesados (KIM et al., 2010). Essas alterações foram quantificadas por método computadorizado através do programa *Image J 1.44P* (National Institute of Health, USA).

Estudos Imunoistoquímicos

Cortes histológicos do tecido renal foram incubados durante 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo anti-ED1 monoclonal (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e durante a noite a 4 °C com os seguintes anticorpos: anti-vimentina (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-6260); anti-TGF- β 1 policlonal (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-146); anti-fibronectina policlonal (1:500) (Chemicon, Temecula, CA, USA; AB1954); anti-linfócitos monoclonal (1:100)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-53044) e anti-NF- κ B (p65)policlonal (1:100) (Abcam, Cambridge, UK; ab7970). O produto das reações foi detectado com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e revelado com 3,3-diaminobenzidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). As secções foram contra coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas. Com exceção para a reação com o anti-ED1, ligações não-específicas de proteínas foram bloqueadas por incubação com 20% de soro de cabra durante 30 min. Os controles negativos foram realizados por meio da substituição dos anticorpos primários com concentrações equivalentes de IgG de coelho normal. Para avaliar a imuno-reatividade das reações para ED-1, CD43 e p65NF- κ B, foi quantificado o número de células com marcação

positiva em 100 glomérulos e 30 campos do CTI cortical de cada lâmina. A quantificação da imuno-reatividade de vimentina, TGF- β 1, fibronectina glomerular e CTI do córtex renal e do CTI do córtex renal p65NF- κ B foi determinada usando o software *Image J* 1.44P (National Institute of Health, USA) e os resultados foram expressos como percentagens, em 70 glomérulos (50 corticais e 20 justamedulares) e 30 campos do CTI do córtex renal (0,245 mm²).

Preparação de homogenato do tecido renal para *Western blot*

As amostras de tecido renal foram homogeneizadas em solução de isolamento (manitol 200 mM, HEPES 80 mM e KOH 41 mM, pH 7,5) contendo um coquetel de inibidores de proteases (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) usando o homogeneizador (Polytron - PT 10–35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). Os homogenatos foram centrifugados a 2000g durante 15 min a 4 °C para remoção de núcleos e detritos celulares. Os sobrenadantes foram isolados e a proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio Agency Laboratórios, São Paulo, Brasil) (GONÇALVES et al., 2014).

Expressão proteica de TGF- β 1 por *Western blot*

As proteínas foram separadas em geis de poliacrilamida por eletroforese. Após transferência por electroeluição para membranas de difluoreto de polivinilideno (GE Healthcare Limited, Little Chalfont, UK), as bandas foram bloqueadas por 60 minutos com leite em pó desnatado a 5% em solução salina tamponada com Tris. Os blots foram então incubados overnight com anticorpos anti-Actina (1:5000) e anti-TGF- β 1 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Após lavagem em TBS-T (Solução Salina Tamponada com Tris 0,15% e Tween 20), as proteínas foram incubadas com o anticorpo anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1:1000 e, em seguida as proteínas imunorreativas foram visualizadas por quimioluminescência por documentador de gel Alience 4.7 Uvitec (Cambridge, Cambs,

UK). Foi utilizada densitometria para analisar quantitativamente os níveis de proteína, normalizando as bandas pela expressão da actina (GONÇALVES et al., 2014).

Preparação de homogenato do tecido renal para mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

O córtex renal do rim direito foi removido e imediatamente transferido para recipientes com gelo. Em seguida, o tecido renal foi homogeneizado em tampão RIPA (Sigma-Aldrich), centrifugado a 1600g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi colhido para realização do ensaio do ácido tiobarbitúrico (DRAPE et al., 1993). A concentração de proteínas no homogenato renal foi determinada pelo kit comercial de proteínas totais monoreagente, seguindo as instruções do fabricante (Bioclin, Brasil). Por fim, a concentração de TBARS (μM) do córtex renal foi normalizada pela concentração de proteínas (mg/mL) e expressa em $\mu\text{M/mg/mL}$.

Ensaio do ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no homogenato do córtex renal, utilizando o método de Draper e colaboradores (1993), e seguindo as orientações do kit comercial TBARS (TCA Method) Assay (Cayman Chemical, EUA). 100 μL de homogenato do córtex renal foram misturados a 100 μL de ácido tricloacético 10%, e 800 μL de ácido tiobarbitúrico (53 mg dissolvidos em 100 mL de ácido acético 20%). A mistura reacional foi incubada por uma hora em água fervente; em seguida, os tubos foram transferidos para um banho de gelo a fim de interromper a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas (1600g, 10 minutos à 4°C) e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (BEL Photonics®) no comprimento de onda de 532 nm. Os níveis de TBARS foram calculados com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (Cayman Chemical, USA).

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade da distribuição, *Kolmogorov-Smirnov*, e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas pelo teste de *Bartlett*. Para a análise dos dados foi utilizada a análise de variância *Two-Way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*, com exceções para, o dado de imunomarcção para vimentina no CTI do cótex renal onde foi utilizado o teste não-paramétrico *Kruskal Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunn* e, dado de *western blot* onde foi utilizada a análise de variância *One-Way* seguido pelo pós-teste de *Newman Keuls*. Os dados são expressos como média±desvio padrão (DP) e o nível de significância adotado foi de $p<0,05$. O programa estatístico utilizado foi o *Graph Pad Prism*, versão 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

Capacidade física, peso corporal e peso do rim

O exercício iniciado previamente aumentou a capacidade física e o peso corporal nas ratas do grupo DPTO quando comparado ao grupo DSO ($p<0,001$). O treinamento melhorou também a capacidade física do grupo controle CPTO comparado ao grupo sedentário CSO ($p<0,001$) (Tabela 1). Os animais dos grupos diabéticos (DSO e DPTO) apresentaram aumento do peso relativo dos rins quando comparado aos seus respectivo controles ($p<0,001$) (Tabela 1).

Glicemia pós-prandial, glicosúria e concentração sérica de 17β -estradiol

As ratas diabéticas do grupo DSO apresentaram aumento significativo da glicemia pós-prandial quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$), mas esse aumento não foi associado ao consumo da dieta, uma vez que não houve diferença no consumo de ração entre os grupos experimentais (Dados não mostrados). O exercício físico reduziu a glicemia pós-prandial no grupo DPTO quando comparado ao grupo DSO ($p<0,001$) (Tabela 1). A glicosúria foi também

atenuada pelo exercício físico nas ratas do grupo DPTO em relação ao grupo DSO ($p < 0,05$). Conforme esperado, não houve diferenças nas concentrações séricas de 17β -estradiol entre os grupos experimentais (CSO - $37,83 \pm 0,9$; CPTO - $35,33 \pm 2,1$; DSO - $32,67 \pm 1,2$; DPTO - $41,67 \pm 4,8$; dados em pg/ml), confirmando a eficiência da ovariectomia.

Função renal

O grupo DSO apresentou aumento nas concentrações séricas de creatinina quando comparado ao grupo CSO ($p < 0,001$). O exercício físico reduziu esse efeito nas ratas do grupo DPTO ($p < 0,05$) (Tabela 2). Todas as ratas diabéticas ovariectomizadas, sedentárias ou treinadas, apresentaram elevação da TFG ($p < 0,01$), da excreção urinária de ureia ($p < 0,05$), do fluxo urinário em relação aos seus respectivos controles, não havendo influência do exercício sobre esses parâmetros (Tabela 2). A fração de excreção de Na^+ e a proteinúria estavam elevadas somente no grupo DSO em relação ao seu controle ($p < 0,001$). Contudo, o exercício físico iniciado previamente reduziu a excreção urinária de proteínas no grupo DPTO quando comparado ao grupo DSO ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Morfologia Renal

O índice glomerulosclerótico foi maior nos grupos diabéticos quando comparado aos seus respectivos controles ($p < 0,001$). No entanto, o exercício atenuou a glomerulosclerose segmentar focal no grupo DPTO em relação ao grupo DSO ($p < 0,05$) (Tabela 3, Figura 1). Os animais do grupo DSO apresentaram maior área de fibrose glomerular quando comparado ao grupo CSO ($p < 0,001$). O exercício reduziu também a marcação para fibrose no grupo DPTO quando comparado ao grupo DSO ($p < 0,001$) (Tabela 3, Figura 1). Os resultados dos estudos histológicos do córtex renal demonstraram que os animais diabéticos apresentaram maior escore de LTI quando comparados aos animais controles ($p < 0,001$). O exercício atenuou essas lesões no grupo DPTO quando comparado ao grupo DSO ($P < 0,001$) (Tabela 3, Figura 1). Os

resultados da quantificação estratificada das LTI evidenciaram ainda que os grupos diabéticos apresentaram maiores percentagens de túbulos acometidos com degeneração hidrópica, dilatação da luz tubular, perda da borda em escova e necrose epitelial em relação aos seus respectivos controles ($p < 0,05$). Todas essas alterações foram atenuadas pelo exercício no grupo DPTO quando comparado ao grupo DSO ($p < 0,05$) (Tabela 3, Figura 1).

Estudos imunoistoquímicos

Nossos dados demonstraram aumento da expressão glomerular para fibronectina no grupo DSO quando comparado com o grupo CSO ($p < 0,01$). O exercício reduziu essa expressão no grupo DPTO quando comparado com o grupo DSO ($p < 0,001$), e no grupo CPTO quando comparado com o grupo CSO ($p < 0,01$) (Tabela 4, Figura 2). Não foi detectada marcação para para fibronectina no CTI do córtex renal das ratas. A imunomarcação elevada de TGF- β 1 nos glomérulos ($p < 0,001$) e no CTI ($p < 0,05$) do córtex renal das ratas do grupo DSO foi reduzida pelo exercício prévio no grupo DPTO em relação ao grupo DSO ($p < 0,01$) (Tabela 4, Figura 2 e 4). O grupo DSO apresentou aumento no número de células ED-1 e CD43 positivas tanto no glomérulo ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) quanto no CTI do córtex renal ($p < 0,001$), ($p < 0,05$), respectivamente, quando comparado ao grupo CSO. O exercício reduziu o número dessas células nos glomérulos ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) e no CTI ($p < 0,01$), ($p < 0,05$) respectivamente, nas ratas do grupo DPTO (Tabela 4, Figura 3). O exercício também reduziu a imunomarcação nuclear de células NF- κ B (p65) positivas nos glomérulos do grupo DPTO quando comparado ao grupo DSO ($p < 0,01$). Além disso, os dados demonstraram aumento da imunomarcação citoplasmática para esse fator no CTI dos grupos DSO e DPTO quando comparado aos seus controles ($p < 0,05$) (Tabela 4, Figura 3). Os animais diabéticos apresentaram aumento da imunomarcação para vimentina no CTI do córtex renal quando comparado aos grupos controles ($p < 0,05$) (Tabela 4, Figura 2). Contudo, o exercício não alterou a expressão desse marcador de miofibroblasto.

Expressão proteica de TGF- β 1 no córtex renal

As ratas sedentárias do grupo DSO apresentaram maior expressão proteica de TGF- β 1 no córtex renal quando comparada as ratas do grupo CSO ($p < 0,001$). O exercício prévio preveniu esse aumento nas ratas previamente treinadas do grupo DPTO ($p < 0,001$) (Figura 4). Como não foi demonstrada alteração dos parâmetros histológicos, imunoistoquímicos e de função, não foi realizada a expressão proteica nos animais do grupo DPTO.

Níveis de TBARS no córtex renal

Os níveis de TBARS foram mais elevados no córtex renal das ratas do grupo DSO quando comparado ao grupo CSO ($p < 0,001$). Contudo, o exercício preveniu esses níveis no grupo DPTO ($p < 0,001$). Além disso, o exercício físico reduziu também os níveis de TBARS nos animais do grupo CPTO quando comparado ao grupo CSO ($p < 0,001$) (Figura 5).

DISCUSSÃO

Este estudo investigou o impacto do exercício físico aeróbico moderado iniciado previamente à indução do diabetes *mellitus* sobre a peroxidação lipídica, inflamação e a função e estrutura renal em ratas *wistar* ovariectomizadas. Os nossos resultados demonstram que o exercício físico prévio evitou a perda de peso e melhorou o desempenho físico, os níveis glicêmicos e a glicosúria. Além disso, o exercício reduziu as concentrações séricas de creatinina, a proteinúria, as alterações histológicas e morfométricas, os marcadores de inflamação e da matriz extracelular e a peroxidação lipídica nas ratas diabéticas treinadas ovariectomizadas.

A eficácia da ovariectomia, no nosso estudo, foi comprovada pelas baixas concentrações do 17 β -estradiol em todas as ratas dos diferentes grupos experimentais. O exercício físico aeróbico iniciado previamente à indução do DM atenuou a perda de peso corporal, os níveis glicêmicos

e a glicosúria, além de aumentar a capacidade física dos animais do grupo DPTO. É importante ressaltar que não houve diferença do consumo alimentar entre as ratas diabéticas sedentárias e treinadas (Dados não mostrados), o que confirma a eficácia do exercício na redução da glicemia pós-prandial nos animais treinados. Em concordância com nossos achados, estudos anteriores também demonstraram que o treinamento físico iniciado previamente à indução do DM atenuou a glicemia, perda de peso, glicosúria e aumentou a capacidade física em animais portadores de DM induzido por STZ (SILVA et al., 2012; AMARAL et al., 2016; 2018). Os mecanismos pelos quais o exercício medeia esses efeitos não estão totalmente esclarecidos, contudo estudos têm demonstrado que o treinamento aeróbico de intensidade moderada aumenta a capacidade energética em mitocôndrias do músculo esquelético de ratos diabéticos (MIDAUI et al., 1996), aumenta a função mitocondrial em rins de ratos espontaneamente hipertensos (GU et al., 2015), melhora a sensibilidade a insulina em ratas ovariectomizadas espontaneamente hipertensas com sobrecarga de frutose (CONTI et al., 2015) e estimula a captação de glicose no músculo de ratas *Zucker* diabéticas obesas ovariectomizadas (BERGERANET al., 2014). Entretanto, não existem estudos avaliando os efeitos do exercício físico iniciado previamente à indução do DM sobre o controle metabólico em ratas diabéticas ovariectomizadas.

As alterações da função renal foram constatadas pelo aumento da creatinina sérica, da fração de excreção de sódio, do *clearance* de ureia e da proteinúria nas ratas sedentárias diabéticas ovariectomizadas. O aumento da proteinúria e albuminúria em animais diabéticos está associado ao comprometimento de proteínas estruturais e da permeabilidade glomerular desencadeada pela hiperglicemia (ITO et al., 2015; SALEH et al., 2016). No entanto, o exercício físico preveniu o aumento da proteinúria e creatinina sérica nas ratas do grupo DPTO. Estudo anterior do nosso laboratório demonstrou também que o exercício prévio aeróbico reduziu a proteinúria de ratas não-ovriectomizadas diabéticas (AMARAL et al., 2016). Adicionalmente, estudos demonstraram que o exercício realizado após indução do diabetes

reduziu a creatinina sérica e a proteinúria de ratos (KURDAK et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011). Os efeitos benéficos do exercício físico podem ser atribuídos à redução da hiperglicemia, do estresse oxidativo e melhora da biodisponibilidade do óxido nítrico em animais diabéticos (RODRIGUES et al., 2011; SILVA et al., 2012; ITO et al., 2015; AMARAL et al., 2018).

Apesar da diminuição de estrógenos estar associada ao desenvolvimento da glomeruloesclerose em mulheres na pós-menopausa e em ratas ovariectomizadas (ANTUS et al., 2003; ELLIOT et al., 2003; CHIN et al., 2005), a condição de hiperglicemia e o estabelecimento da ND são também determinantes para o desenvolvimento de lesões glomerulares (LAGRANHA, 2007; AL-TRAD et al., 2015). Os nossos estudos histopatológicos demonstraram que o DM induziu danos estruturais nos glomérulos compatíveis com glomeruloesclerose segmentar focal. Entretanto, o exercício iniciado previamente à administração de STZ atenuou tais alterações no grupo DPTO. Mankhey e colaboradores (2005) também demonstraram que ratas diabéticas ovariectomizadas sedentárias apresentaram aumento do espessamento da membrana basal glomerular e expansão mesangial, enquanto que a reposição de 17β -estradiol reduziu as lesões nessas ratas. A reposição do 17β -estradiol foi também benéfica no tratamento de doenças renais diabéticas e da hipertensão arterial (MARIC et al., 2004; MANKHEY et al., 2005). Entretanto, recentemente tem-se focado na inclusão de abordagens não farmacológicas, tais como exercício físico, no intuito de prevenir e/ou retardar a progressão de doenças renais. Rodrigues e colaboradores (2011) demonstraram que o exercício iniciado após a indução do diabetes foi capaz de reduzir as alterações glomerulares em ratos machos. Amaral e colaboradores (2016) demonstraram que o exercício físico moderado reduziu o índice glomeruloesclerótico em ratas não-ovriectomizadas com diabetes induzido por STZ. Contudo, não foram encontrados estudos avaliando os efeitos do exercício físico iniciado previamente à indução do DM em ratas ovariectomizadas.

As lesões túbulo-intersticiais estavam também mais pronunciadas no córtex renal das ratas DSO. Fernandes e colaboradores (2016) observaram fibrose túbulo-intersticial, expansão mesangial, aumento da matriz extracelular, lesões túbulo-intersticiais e aumento da peroxidação lipídica em ratos diabéticos unifrectomizados. Mankhey e colaboradores (2005) demonstraram que as alterações túbulo-intersticiais induzidas pelo DM em ratas ovariectomizadas foram atenuadas pela reposição do 17β -estradiol. Contudo, em nosso estudo, as lesões túbulo-intersticiais foram reduzidas pelo exercício físico prévio em ratas diabéticas ovariectomizadas do grupo DPTO. O exercício físico aeróbico, realizado após indução do DM1 promoveu redução das alterações degenerativas vacuolares tubulares em ratos machos (RODRIGUES et al., 2011), diminuiu as lesões túbulo-intersticiais em um modelo de doença renal crônica (CAO et al., 2016) e marcação para α -SMA (um marcador de lesão tubulointersticial) em ratos *Zucker* com ND (ITO et al., 2015). Além disso, foi demonstrado, que o exercício físico prévio reduziu também as lesões no CTI do córtex renal de ratas não-ovriectomizadas diabéticas (AMARAL et al., 2016). Contudo, como as lesões induzidas pelo diabetes são mais predominantes em glomérulos, poucos estudos avaliam os efeitos do exercício sobre as alterações túbulo-intersticiais, principalmente o exercício prévio, na condição de redução dos hormônios sexuais femininos.

A expansão da matriz mesangial na fase inicial da nefropatia diabética está associada ao acúmulo excessivo de proteínas da matriz, tais como a fibronectina e o colágeno do tipo IV (MASON; WAHAB, 2003). A fibronectina é a primeira proteína a ser depositada em doenças renais fibróticas, constituindo-se num suporte para a deposição de outras proteínas além de atuar como um quimioatratador de fibroblastos (ZEISBERG; NEILSON, 2010). Nossos resultados demonstraram aumento da expressão de fibronectina no glomérulo e da fibrose glomerular nas ratas DSO. O aumento da deposição de MEC, em nosso estudo, pode estar contribuindo para o desenvolvimento de alterações glomerulares, com consequente proteinúria

e disfunções renais nas ratas DSO. Contudo, o exercício físico prévio reduziu as expressões de fibronectina e a fibrose glomerular nas ratas do grupo DPTO. Nossos dados são consistentes com outros estudos que também demonstraram que o exercício aeróbico atenuou o acúmulo de proteínas de MEC em glomérulos (AMARAL et al., 2016, FALEIROS et al., 2017) e retardou o desenvolvimento de danos estruturais em ratos portadores de doença renal crônica (CAO et al., 2016). Os nossos dados demonstraram também aumento da expressão de vimentina no CTI do córtex renal de todas as ratas diabéticas. A expressão de vimentina em células intersticiais representa ativação de miofibroblastos em fibroblastos intersticiais renais (ESSAY et al., 1997), os quais podem induzir a produção de proteínas da MEC. O exercício prévio reduziu a expressão de vimentina no CTI das ratas DPTO, mas essa alteração não foi significativa quando comparada ao grupo DSO.

Em nosso estudo, o aumento da expressão proteica de TGF- β 1 no córtex renal do grupo DSO foi reduzido pelo exercício físico iniciado previamente à indução do DM nas ratas do grupo DPTO. O TGF- β 1 é considerado uma das principais citocinas mediadoras do acúmulo de MEC, expansão mesangial e desenvolvimento de fibrose tecidual na ND (SHARMA; MCGOWAN, 2000; DIXON, MARIC et al., 2007). Estudos demonstraram que o TGF- β 1 estimulou a produção de elastina, fibronectina e colágenos tipos I, III e IV, sendo esses efeitos relacionados à inibição de metaloproteinases de matriz e ativação de inibidores de proteases em ratos com diabetes do tipo 1 (CHEN et al., 2004; SINGH et al., 2018). O aumento de TGF- β 1 promove inflamação, estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de várias proteínas de MEC, resultando em hipertrofia glomerular e expansão da matriz mesangial observadas na ND experimental (LI et al., 2010; LEE et al., 2010). Amaral e colaboradores (2016) demonstraram expressão reduzida de TGF- β 1 nos glomérulos e diminuição de lesões glomerulares em ratas diabéticas não-ovriectomizadas submetidas ao exercício físico prévio. O efeito do exercício físico sobre a expressão de TGF- β 1 em ratos diabéticos, ainda é pouco documentado. Além

disso, até o momento, não foram encontrados estudos analisando os efeitos do exercício prévio em ratas diabéticas ovariectomizadas.

O número de monócitos/macrófagos e linfócitos em glomérulos e no CTI do córtex renal estava elevado nas ratas do grupo DSO. O exercício reduziu essas alterações no grupo DPTO. O aumento de monócitos/macrófagos e linfócitos tem sido demonstrado em glomérulos e no interstício renal em estudos clínicos e em modelos experimentais de ND (MEZZANO et al., 2004; AWAD et al., 2006; MAEDA et al., 2008; AWAD et al., 2011; AMARAL et al., 2018). O acúmulo de monócitos/macrófagos, linfócitos e fibroblastos e os produtos derivados dessas células são responsáveis pela inflamação no rim diabético (SURYAVANSHI, KULKARNI, 2017). A resposta imune subsequente leva à deposição de matriz e fibrose na injúria renal progressiva (KATZ et al., 2002; CHOW, 2005). O treinamento físico reduziu a expressão da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) no tecido renal e a infiltração de macrófagos nos glomérulos e na área túbulo-intersticial em ratos com diabetes *mellitus* tipo 2 (ISHIKAWA et al., 2012).

O nosso estudo demonstrou aumento da peroxidação lipídica no córtex renal e da imunomarcagem para NF- κ B no glomérulo e no CTI do córtex renal das ratas DSO, enquanto as ratas DPTO apresentaram uma redução desses marcadores. Rodrigues e colaboradores (2011) evidenciaram que o exercício físico, realizado após a indução do diabetes, promoveu redução dos níveis de TBARS plasmático e urinário em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1. A hiperglicemia está fortemente associada ao aumento da produção de EROs, os quais contribuem para a peroxidação lipídica em membranas celulares, e também são responsáveis pela ativação do NF- κ B (PUNARO et al., 2014). Lee e colaboradores (2010) demonstraram acúmulo de EROs e aumento da ativação de NF- κ B e TGF- β 1 em glomérulos e túbulos proximais renais em ratos diabéticos. Adicionalmente, Mezzano e colaboradores (2004) demonstraram que a ativação do NF- κ B se correlacionou com aumento da expressão de genes pró-inflamatórios

(MCP-1 e RANTES), principalmente em células epiteliais tubulares de pacientes com ND, o que pode ter contribuído para o aumento da proteinúria e a infiltração de células imunes intersticiais nesses pacientes. Estudo recente do nosso laboratório demonstrou que o exercício aeróbico melhorou a biodisponibilidade de óxido nítrico, reduziu a peroxidação lipídica renal e o número de células marcadas para linfócitos no CTI do córtex renal de ratas intactas com DM induzido por STZ (AMARAL et al., 2018). Até o presente momento, não existem estudos demonstrando o efeito do exercício prévio sobre o estresse oxidativo e a inflamação renal em ratas ovariectomizadas com diabetes do tipo 1. Diante disso, a redução da peroxidação lipídica pode estar contribuindo para a diminuição da expressão do NF- κ B, TGF- β 1 e da inflamação em ratas diabéticas ovariectomizadas previamente treinadas com consequente melhora dos parâmetros de função e estrutura renal analisados nesse estudo.

Em conclusão, nossos dados sugerem que o exercício físico de intensidade moderada, iniciado previamente à indução do diabetes, pode retardar a progressão da nefropatia diabética, preservando a estrutura e a função renal através da redução da peroxidação lipídica e inflamação renal nos rins de ratas diabéticas ovariectomizadas.

REFERÊNCIAS

AL-TRAD, B. et al. Progesterone ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic Rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 1, p.1-13, 2015.

AMARAL, L. S. D. B. et al. Renal changes in the early stages of diet-induced obesity in ovariectomized rats. **Physiol Res**, v. 63, n. 6, p.723-32, 2014.

AMARAL, L. S. D. B. et al. Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 4, p.437-445, 2016.

AMARAL, L. S. D. B. et al. Previous Exercise Training Reduces Markers of Renal Oxidative Stress and Inflammation in Streptozotocin-Induced Diabetic Female Rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, p.1-9, 2018.

ANTUS, B. et al. Estradiol is nephron protective in the rat remnant kidney. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p.54-61, 2003.

AWAD, Alaa S. et al. Adenosine A2A receptor activation attenuates inflammation and injury in diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 290, n. 4, p.828-837, 2006.

AWAD, A. S. et al. Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 301, p.F1358-F1366, 2011. BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol**, v. 25, p.280–288, 2004.

BORGOHAIN, M. P. et al. Small Molecule Inhibiting Nuclear Factor-kB Ameliorates Oxidative Stress and Suppresses Renal Inflammation in Early Stage of Alloxan-Induced Diabetic Nephropathy in Rat. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, n. 5, p.442-449, 2017.

BRITO, P. et al. Proximal tubular basementmembranewidth in insulin-dependent diabetesmellitus. **KidneyInt**, v. 53, p.754–761, 1998.

CAO, Q.; HARRIS, D. C.; WANG, Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. **Physiology**, v. 30, p.183–194, 2016.

Chen X, Moeckel G, Morrow JD, Cosgrove D, Harris RC, Fogo AB, Zent R, Pozzi A. Lack of integrin alpha1beta1 leads to severe glomerulosclerosis after glomerular injury. **Am J Pathol**, v. 165, p.617–630, 2004.

CHEN, Q.; TAO, J.; XIE, X. AstaxanthinPromotes Nrf2/ARE SignalingtoInhibit HG-Induced Renal Fibrosis in GMCs. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p.117-134, 5 abr. 2018.

CHIN, M. et al. Estrogen and Raloxifene, a Selective Estrogen Receptor Modulator, Ameliorate Renal Damage in db/db Mice. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 6, p.1-8, 2005.

CHOW, F. Y. Intercellular Adhesion Molecule-1 Deficiency Is Protective against Nephropathy in Type 2 Diabetic db/db Mice. **Journal of The American Society of Nephrology**, v. 16, n. 6, p.1711-1722, 2005.

CONTI, F. F. et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. **American Journal of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, v. 309, n. 12, p.1532-1539, 2015.

DIAMOND-STANIC, M. K.; YOU, Y. H.; SHARMA, K. Sugar, Sex, and TGF- β in Diabetic Nephropathy. **Semin Nephrol**, v. 32, n. 3, p.261–268, 2012.

DIXON, A.; MARIC, C. 17 β -Estradiol attenuates diabetic kidney disease by regulating extracellular matrix and transforming growth factor-protein expression and signaling. **American Journal Of Physiology - Renal Physiology**, v. 293, n. 5, p.F1678–F1690, 2007.

DRAPER, H. H. et al. A comparativeevaluationofthiobarbituricacidmethods for thedeterminationofmalondialdehyde in biologicalmaterials. **FreeRadicBiolMed**, v. 15, n. 4, p.353-63, 1993.

- FALEIROS, C. M. et al. Effectsofpreviousphysical training onadriamycin nephropathy and its relationship with endothelial lesions and angiogenesis in the renal cortex. **Life sciences**, v. 169, p.43-51, 2017.
- FERNANDES, S. M. et al. The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 5, p.443-449, out. 2016.
- GONÇALVES, Janaína Garcia et al. Vitamin D Deficiency Aggravates Chronic Kidney Disease Progression after Ischemic Acute Kidney Injury. **Plos One**, v. 9, n. 9, p.1-13, 15 2014.
- GROSS, M. L. et al. Beneficial effectsof estrogenon indicesof renal damage in uninephrectomizedSHRsprats. **J AmSocNephrol**, v. 15, p.348–358, 2005.
- GU, L. et al. Fasudil Inhibits Epithelial-Myofibroblast Transdifferentiation of Human Renal Tubular Epithelial HK-2 Cells Induced by High Glucose. **Chem Pharm Bull**, v. 61, n. 7, p.688-694, 2013.
- ISHIKAWA, Yuji et al. Effect of Exercise on Kidney Function, Oxidative Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetic KK-AyMice. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p.1-10, 2012.
- ITO, D. et al. Chronic Running Exercise Alleviates Early Progression of Nephropathy with Upregulation of Nitric Oxide Synthases and Suppression of Glycation in Zucker Diabetic Rats. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p.e0138037, 2015.
- JU, K. D. et al. Ethyl pyruvate ameliorates albuminuria and glomerular injury in the animal model of diabetic nephropathy. **American Journal Of Physiology-renal Physiology**, v. 302, n. 5, p.606-613, 2012.
- KATZ, A. et al. Anincrease in thecellcomponentofthe cortical interstitiumantedates interstitialfibrosis in type 1 diabeticpatients. **KidneyInternational**, v. 61, p.2058–2066, 2002.
- KAWAHITO, S. et al. Problems associated with glucose toxicity:role of hyperglycemia-induced oxidative stress. **World Journal Gastroenterology**, v. 15, n. 33, 4137, 2009.
- KECK,M. et al. Hormonal status affects the progression of STZ-induced diabetes and diabeticrenal damage in the VCD mouse model of menopause. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 293, p.F193–F199, 2007.
- KIM, S. et al. The reno-protective effect of a phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin on streptozotocin-induced proteinuric renal disease rats. **Experimental And Molecular Medicine**, v. 44, n. 1, p.1-7, 2012.
- KURDAK, H. et al. The effectsof regular aerobicexerciseon renal functions in streptozotocininduceddiabeticrats. **Journalof Sports Science and Medicine**, v. 9, n. 2, p.294-299, 2010.
- LEE, H. B.Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy.**Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 90003, p. 241S–2245, 2003.
- LEE, Wen-chin et al. Cilostazol Ameliorates Nephropathy in Type 1 Diabetic Rats Involving Improvement in Oxidative Stress and Regulation of TGF-β and NF-κB. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 74, n. 7, p.1355-1361, 2010.

- LI, L. et al. Fenofibrate attenuates tubulointerstitial fibrosis and inflammation through suppression of nuclear factor- κ B and transforming growth factor- β 1/Smad3 in diabetic nephropathy. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 3, p.383-391, 2010.
- MAEDA, S. Do inflammatory cytokine genes confer susceptibility to diabetic nephropathy? **Kidney Int**, v.74, p.413–5, 2008.
- MANKHEY, R. W.; BHATTI, F.; MARIC, C. 17β -Estradiol replacement improves renal function and pathology associated with diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 288, p.F399-F405, 2005.
- MARIC, C.; SANDBERG, K.; HINOJOSA-LABORDE, C. Glomerulosclerosis and Tubulointerstitial Fibrosis are Attenuated with 17β -Estradiol in the Aging Dahl Salt Sensitive Rat. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p.1546-1556, 2004.
- MASON, R. M.; WAHAB, N. A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, 14, p.1358–1373, 2003.
- MENG, X. et al. Dose-dependent toxic effects of high-dose estrogen on renal and cardiac injury in surgically postmenopausal mice. **Life Sci**, v. 88, n. 3-4, p.178–186, 2011.
- MEZZANO, S. et al. NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, p.2505-12, 2004.
- MIDAOU, A.; TANCREDE, G.; NADEAU, A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. **Metabolism**, v. 45, p.810–816, 1996.
- MILLER, Charles G. et al. Effects of high glucose on integrin activity and fibronectin matrix assembly by mesangial cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 16, p.2342-2350, 2014.
- NAVARRO-GONZALEZ, J. F. et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol**, v. 7, p.327-340, 2011.
- NGUYEN, D. et al. Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy. **Nephrology**, v. 11, p.226-231, 2006.
- OH, J. H. Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis. **Kidney International**, v. 54, n. 6, p.1872–1878, 1998.
- PAPADOPOULOU-MARKETOU, N. et al. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes. **Minerva Med**, v. 109, n. 3, p. 218-228, Jun 2018.
- PUNARO, G. R. et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 37, p.53-60, 2014.
- RODRIGUES, A. M. et al. Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type I diabetic rats. **Experimental Biology And Medicine**, v. 236, n. 10, p.1180-1187, 2011.
- SAITO, T. et al. The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. **Kidney Int**, v. 32, p.691–9, 1987.
- SALEH, Mohamed A. et al. Free radical scavenging decreases endothelin-1 excretion and glomerular albumin permeability during type 1 diabetes. **Physiological Reports**, v. 4, n. 24, p.1-9, 2016.

- SCHMID, H. Modular Activation of Nuclear Factor- κ B Transcriptional Programs in Human Diabetic Nephropathy. **Diabetes**, v. 55, 2006.
- SCHNACKENBERG, C. G. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, p.R335–R342, 2002.
- SEO, J. et al. Mycophenolate Mofetil Ameliorates Diabetic Nephropathy in db/db Mice. **Biomed Research International**, v. 2015, p.1-11, 2015.
- SHARMA K, MCGOWAN TA. TGF-beta in diabetic kidney disease: role of novel signaling pathways. **Cytokine Growth Factor**, v. 11, p.115–23, 2000.
- SHIH, W.; HINES, W. H.; NEILSON, E. G. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. **Kidney Int**, v. 33, p.1113–8, 1988.
- SILVA, K. A. S. et al. Previous Exercise Training Has a Beneficial Effect on Renal and Cardiovascular Function in a Model of Diabetes. **Plos One**, v. 7, n. 11, p.1-10, 2012.
- SINGH, R. M. et al. Type 1 diabetes mellitus induces structural changes and molecular remodelling in the rat kidney. **Molecular And Cellular Biochemistry**, p.1-17, 23 fev. 2018.
- SOETIKNO, V. et al. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF-B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. **Nutrition & Metabolism**, v. 8, p.35, 2011.
- SOUZA, S. B. C. et. al. Role of Exercise Training in Cardiovascular Autonomic Dysfunction and Mortality in Diabetic Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p.786-791, 2007.
- SUMI, A. et al. Roles of coagulation pathway and factor Xa in the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. **Biol Pharm Bull**, v. 34, p.824-830, 2011.
- SURYAVANSHI, S. V.; KULKARNI, Y. A. NF- κ β : A Potential Target in the Management of Vascular Complications of Diabetes. **Frontiers In Pharmacology**, v. 8, p.1-12, 2017.
- TORIU, N. et al. Preservation of renal function by intensive glycemic control. **Endocrinology, Diabetes And Metabolism Case Reports**, p.1-5, 2018.
- ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, p.1819–34, 2010.

Tabela 1. Teste de corrida máxima, peso corporal, peso dos rins, glicemia pós-prandial, glicosúria, e concentração de 17 β -estradiol de ratas controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratas controles previamente treinada ovariectomizadas (CPTO), ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO).

	CSO	CPTO	DSO	DPTO
Teste de corrida máxima	17,11 \pm 3,3	28,11 \pm 1,7 ^{***}	16,33 \pm 2,2	23,67 \pm 3,4 ^{#†††}
Peso corporal	318,5 \pm 14	339,4 \pm 24	182,0 \pm 29	279,0 \pm 10 ^{†††}
Peso dos rins	0,23 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	0,53 \pm 0,07 ^{***}	0,59 \pm 0,1 ^{###}
Glicemia pós-prandial	107,5 \pm 8	116,1 \pm 9	926,4 \pm 83 ^{***}	665,3 \pm 133 ^{###†††}
Glicosúria	1,402 \pm 0,7	0,7634 \pm 0,4	2377 \pm 330,2 ^{***}	1781 \pm 652,0 ^{###†}

Os dados são apresentados como média \pm DP, n=6 por grupo. Teste de corrida máxima (m/min); peso corporal (g); peso dos rins (g/100g de peso corporal); glicemia pós-prandial (mg/dl); glicosúria (mg/24 h); ^{***}p<0,001 *versus* CSO; [#]p<0,05 e ^{###}p<0,001 *versus* CPTO; ^{†††}p<0,001 *versus* DSO.

Tabela 2. Dados de função renal de ratas controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratas controles previamente treinada ovariectomizadas (CPTO), ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO).

	CSO	CPTO	DSO	DPTO
Creat S	0,71±0,06	0,83±0,25	1,87±0,54 ^{***}	1,29±0,39 [†]
TFG	0,24±0,04	0,21±0,14	0,90±0,41 ^{***}	0,68±0,24 ^{##}
Fluxo U	4,1±2,2	3,6±2,6	78,8±50,4 ^{***}	85,2±23,1 ^{###}
FENa⁺	0,48±0,16	0,65±0,22	1,09±0,41 [*]	0,86±0,41
FEK⁺	32,90±4,7	34,05±34,4	30,11±7,9	40,52±33,1
Ureia	11,7± 11,4	9,2±8,3	727,7±627,3 ^{**}	622,3±433,0 [#]
Proteinúria	1,9±0,77	4,7±5,77	29,5±13,3 ^{***}	15,2±6,06 [†]

Os dados são apresentados como média±DP, n=6 por grupo. Creat S, creatinina sérica (mg/dL); TFG, taxa de filtração glomerular (ml/min/100g); Fluxo U, fluxo urinário (µl/min); FENa⁺, fração de excreção de sódio; FEK⁺, fração de excreção de potássio; ureia (mg/24 h); Proteinúria (mg/24 h). * p<0,05 e *** p<0,001 *versus* CSO; # p<0,05, ## p<0,01 e ### p<0,001 *versus* CPTO; † p<0,05 *versus* DSO.

Tabela 3. Dados de Histologia e Morfometria Renal de ratas controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratas controles previamente treinada ovariectomizadas (CPTO), ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO).

	CSO	CPTO	DSO	DPTO
IG	1,6±0,16	1,7±0,16	3,3±0,26 ^{***}	2,8±0,35 ^{###†}
Área_{GT}	9174±519	10077±1005	10585±1218 [*]	10107±526
Fibrose glomerular	6,51±1,35	5,28±0,92	10,79±1,67 ^{***}	4,95±0,13 ^{†††}
LTI	0,32±0,07	0,24±0,03	1,9±0,25 ^{***}	1,1±0,16 ^{###†††}
Necrose epitelial	0,34±0,35	0,11±0,09	1,97±0,79 ^{***}	0,98±0,78 [†]
Dilatação tubular	2,17±0,56	3,4±0,58	16,83±3,9 ^{***}	11,92±5,3 ^{###††}
Perda de borda	3,93±2,0	2,06±0,47	24,07±6,7 ^{***}	17,83±2,1 ^{###†}
Deg. hidrópica	ND	ND	8,47±1,85 ^{***}	4,48±1,68 ^{###†††}

Os dados são apresentados como média±DP, n=6 por grupo. IG, índice glomerulosclerótico; Área_{GT}, área do tufo glomerular (µm²); LTI, lesões túbulo-intersticiais; Deg. hidrópica, degeneração hidrópica; ND, não detectado. * p<0,05. ** p<0,001 e *** p<0,001 *versus* CSO; # p<0,05; ## p<0,01 e ### p<0,001 *versus* CPTO; † p<0,05; †† p<0,01 e ††† p<0,001 *versus* DSO.

Tabela 4. Imunomarcção de ED-1, CD43, NF-κB (p65), TGF-β1, vimentina e fibronectina no tecido renal de ratas controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratas controles previamente treinada ovariectomizadas (CPTO), ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO).

	CSO	CPTO	DSO	DPTO
Vimentin_G	27,91±7,8	18,84±8,3	22,06±0,83	25,46±5,9
Vimentin_{CTI}	0,0(0,0; 0,09)	0,0(0,0;0,44)	9,29(0,28;20)*	1,19(0,78;6,4)
Fibronectin_G	7,29±0,55	5,16±0, 0,85**	18,63±1,58***	6,935±0,74 ^{†††}
TGF- β1_G	11,31±2,8	9,539±1,1	20,11±3,13***	12,99±3,94 ^{††}
TGF- β1_{CTI}	12,95±4,46	15,53±1,51	19,97±5,49*	8,82±3,33 ^{##†††}
ED-1_G	0,93±0,17	0,98±0,41	4,30±1,15***	2,06±0,99 ^{†††}
ED-1_{CTI}	3,52±0,60	3,91±1,25	8,73±1,45***	5,30±2,10 ^{††}
CD43_G	2,0±0,96	1,53±0,73	4,11±0,93**	2,0±0,99 ^{††}
CD43_{CTI}	5,76±2,25	7,10±2,36	10,48±2,84*	5,97±2,96 [†]
NF-κB_G	0,75±0,43	0,49±0,18	3,16±1,61***	1,29±0,44 ^{††}
NF-κB_{CTI}	14,71±6,49	16,21±2,16	22,25±3,96*	23,66±5,19 [#]

Os dados são apresentados como média±DP e em mediana e percentil 25 e 75 para Vimentin_{CTI}, n=6 por grupo. G, glomerular; CTI, compartimento túbulo-intersticial; ED-1, marcador de monócitos/macrófagos; CD43, marcador de linfócitos; TGF- β1, fator de crescimento transformante beta 1; NF-κB, fator nuclear kappa B. *p<0,05. **p<0,001 e ***p<0,001 *versus* CSO; #p<0,05; ##p<0,01 *versus* CPTO; †p<0,05; ††p<0,01 e †††p<0,001 *versus* DSO.

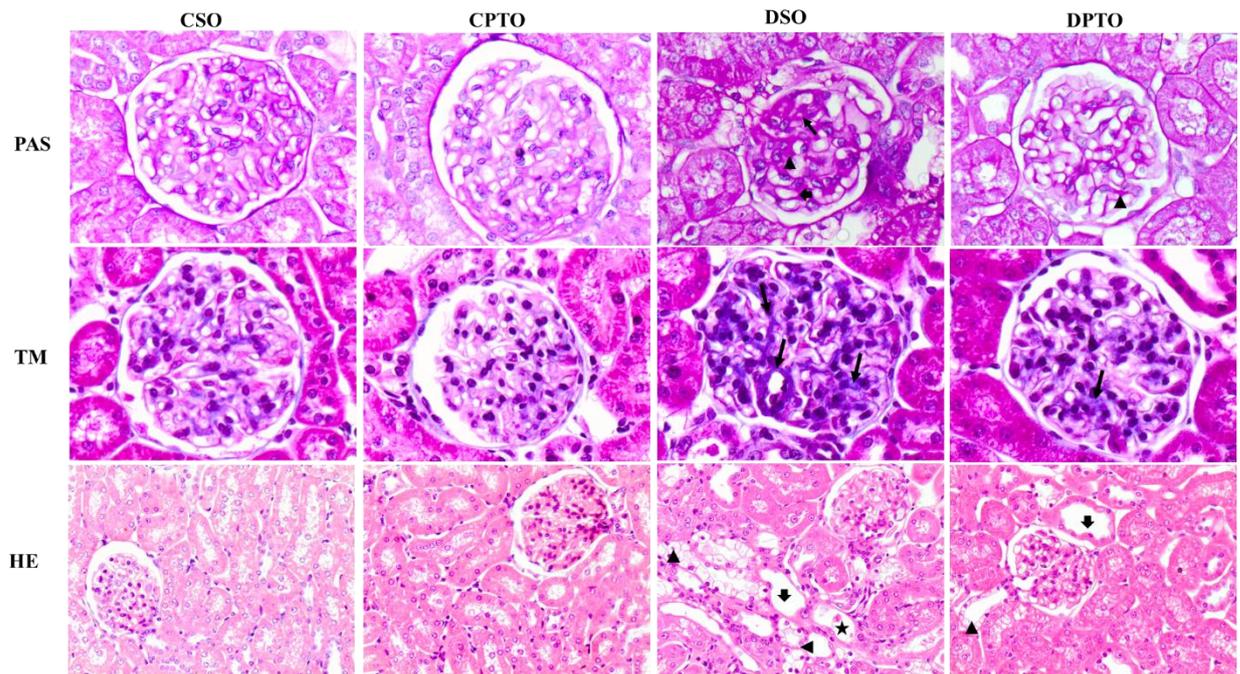


Figura 1. Fotomicrografias representativas de alterações histológicas glomerulares (coloração com PAS), seta fina - obliteração da luz dos capilares glomerulares, seta espessa - dilatação dos capilares glomerulares, ponta de seta - acúmulo de matriz extracelular; de fibrose glomerular (coloração com Tricrômio de Masson), seta fina - áreas de fibrose; e de lesões túbulo-intersticiais (coloração com HE), ponta de seta - degeneração hidrópica, seta espessa - dilatação da luz tubular e perda da borda em escova, estrela - túbulos em necrose; de ratos controles diabéticos sedentários ovariectomizados (CSO), ratos controles previamente treinada ovariectomizados (CPTO), ratos diabéticos sedentários ovariectomizados (DSO) e ratos diabéticos previamente treinados ovariectomizados (DPTO). Foi possível observar redução das alterações glomerulares e túbulo intersticiais no grupo DPTO. Coloração com PAS e Tricrômio de Masson, aumento x400; coloração com HE, aumento x200.

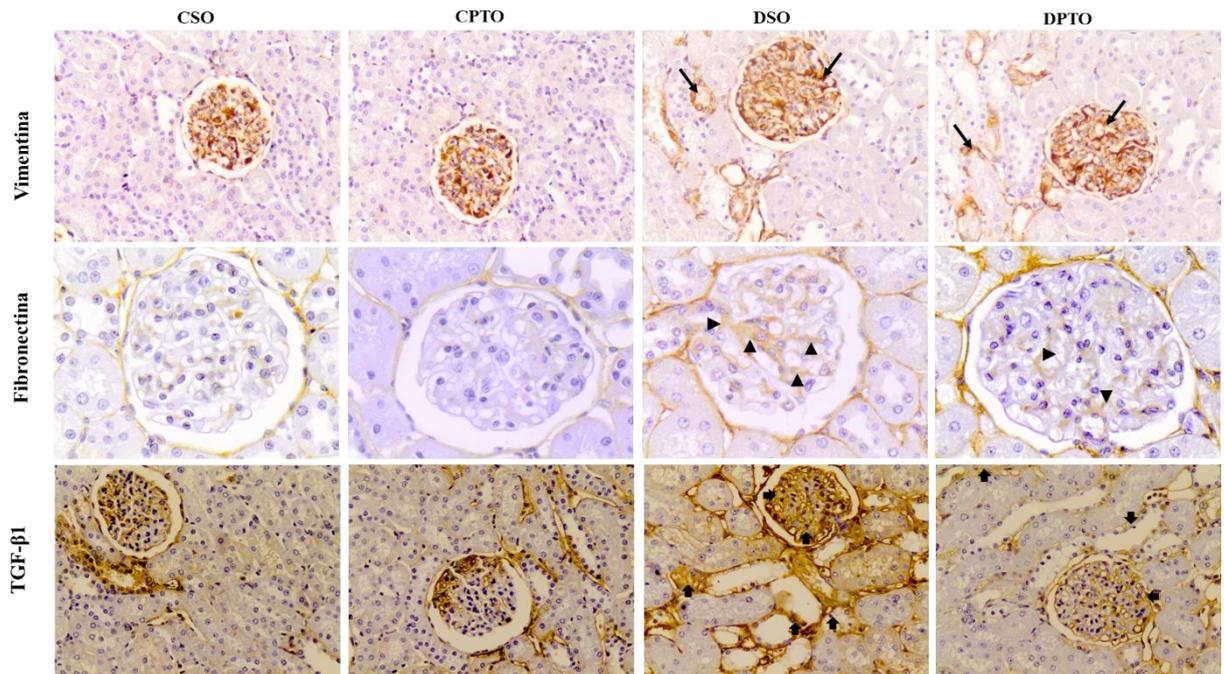


Figura 2. Imunolocalização para vimentina e TGF- β 1 no glomérulo e CTI do córtex renal; e para fibronectina no glomérulo; de ratas controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratas controles previamente treinada ovariectomizadas (CPTO), ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO). Setas finas indicando marcação para vimentina no glomérulo e CTI do córtex renal. Aumento x200. Houve menor intensidade de imunomarcção de fibronectina (ponta de seta) no glomérulo do grupo DPTO. Aumento x400. Houve menor intensidade de marcação de TGF- β 1 (seta) no glomérulo e CTI do córtex renal do grupo DPTO. Aumento x200.

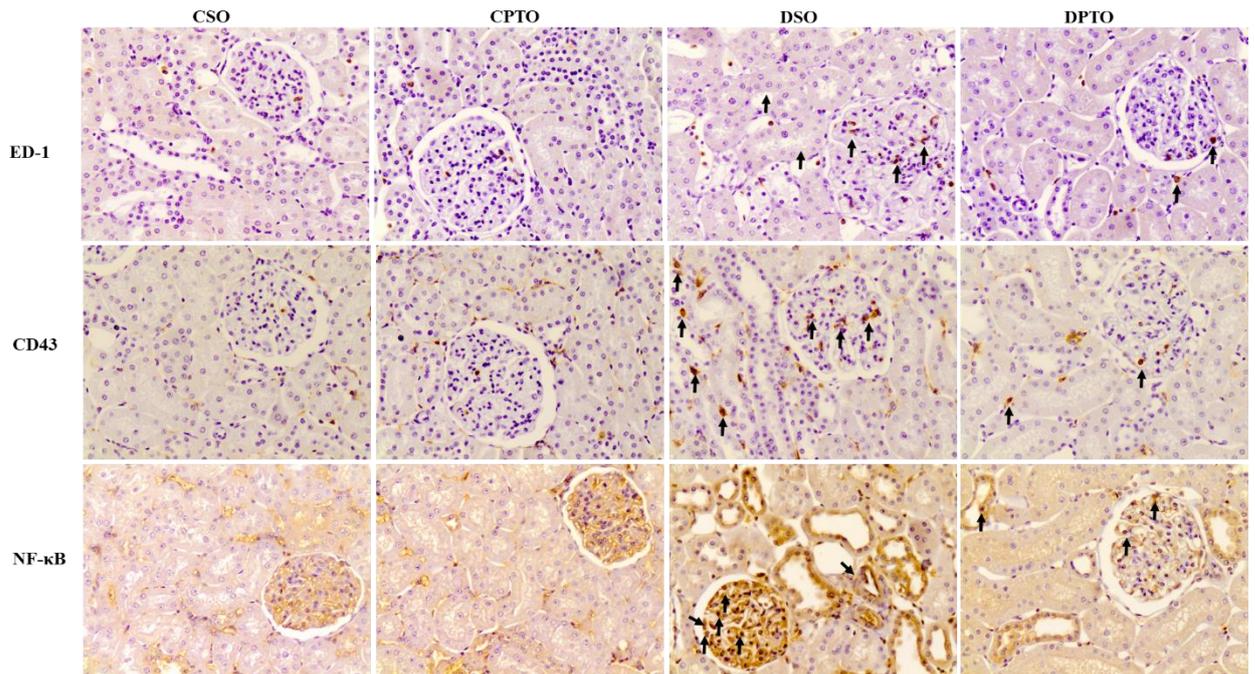


Figura 3. Imunolocalização para células ED-1 positivas, células CD43 positivas e NF-κB (p65), no glomérulo e CTI do córtex renal de ratas controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratas controles previamente treinada ovariectomizadas (CPTO), ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO). Foi possível observar redução da marcação para células ED-1 e CD43 positivas no glomérulo e CTI do córtex renal. Aumento x200. Foi observada menor intensidade de imunomarcção nuclear de células NF-κB (p65) positivas no glomérulo do grupo DPTO. Aumento x200.

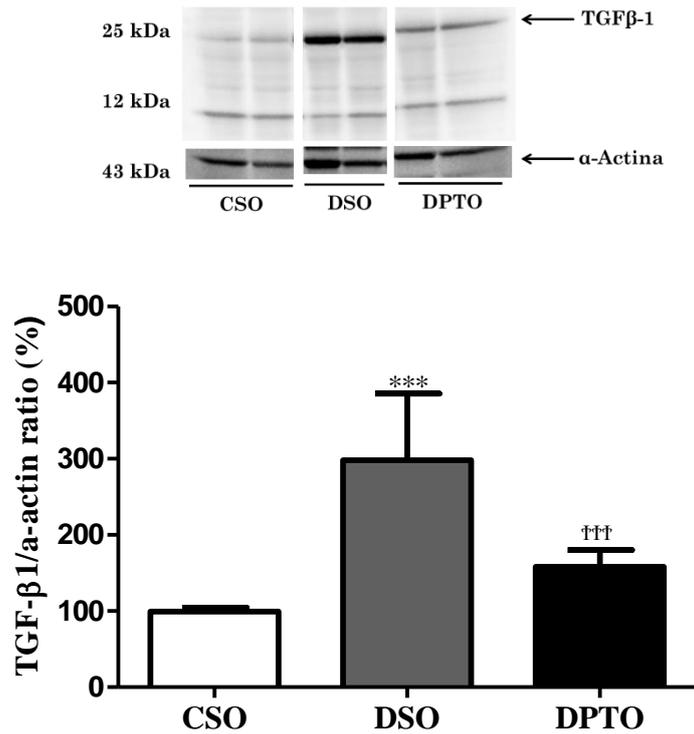


Figura 4. Expressão proteica de TGF-β1 no córtex renal de ratos controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratos diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratos diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO). Os dados são expressos como média±DP. *** $p < 0,001$ versus CSO; ††† $p < 0,001$ versus DSO.

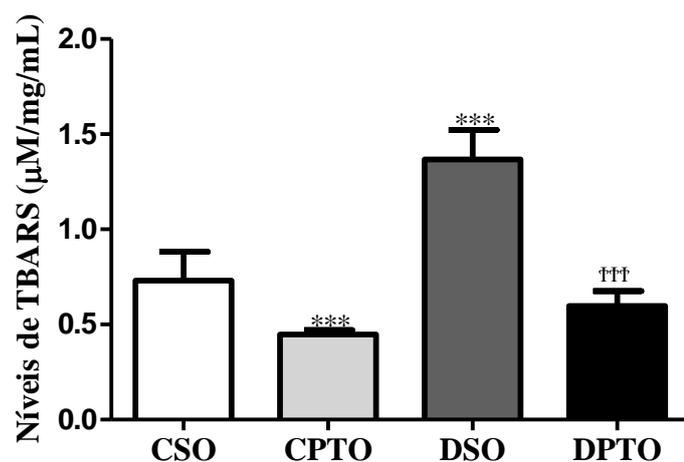


Figura 5. Níveis de TBARS no córtex renal de ratas controles diabéticas sedentárias ovariectomizadas (CSO), ratas controles previamente treinada ovariectomizadas (CPTO), ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e ratas diabéticas previamente treinadas ovariectomizadas (DPTO). Os dados são expressos como média±DP. ***p<0,001 versus CSO; †††p<0,001 versus DSO.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, analisamos o efeito do exercício físico moderado iniciado previamente a indução do diabetes sobre as alterações de função e estrutura renal em ratas ovariectomizadas. Nossos dados demonstram que o exercício prévio melhorou parâmetros funcionais, histológicos, inflamatórios e reduziu a peroxidação lipídica em ratas diabéticas ovariectomizadas.