



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

MAYANE OLIVEIRA REBOUÇAS DA SILVEIRA

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIS E ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATAS OVARIETOMIZADAS COM
DIABETES *MELLITUS* TIPO 1:
EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO

Vitória da Conquista - BA

2017

MAYANE OLIVEIRA REBOUÇAS DA SILVEIRA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIIS E ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS COM
DIABETES *MELLITUS* TIPO 1:
EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biociências, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências

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

Universidade Federal da Bahia

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

Universidade Federal da Bahia

Vitória da Conquista – BA

2017

MAYANE OLIVEIRA REBOUÇAS DA SILVEIRA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES RENAIS E ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATAS OVARIECTOMIZADAS COM
DIABETES *MELLITUS* TIPO 1:
EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO MODERADO**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 28 Março de 2017.

Prof.^a Dr.^a. Telma de Jesus Soares

Universidade Federal da Bahia

Prof.^a Dr.^a.Liliany Souza de Brito Amaral

Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Amélia Cristina M. de Magalhães Gusmão

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Rafael Pereira de Paula

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

A minha família, professores e amigos que contribuíram para que eu pudesse me dedicar na concretização deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo amor e benção. Por me permitir concretizar cada sonho ao seu tempo.

À minha orientadora, Telma Soares, pelo apoio, confiança e compreensão. Um exemplo de ser humano e profissional que faz acreditar sempre mais que, Deus coloca as pessoas certas, na hora certa em nosso caminho profissional.

À minha co-orientadora, Lilianny Amaral, por compartilhar seu conhecimento e experiências tão importantes na minha busca pelo conhecimento.

Aos colegas do grupo de pesquisa e laboratório (Samira, Halanna, Jéssica, Edilene, Gabriela, Israel, Thiago). Sem o apoio e conhecimento de vocês esse projeto não seria possível.

Professores e colegas do programa por compartilharem conhecimento e vivência profissional.

Ao meu esposo, Daniel, meu companheiro de todos os momentos. Maior incentivador nesta jornada. Sem seu apoio e parceria me impulsionando sempre para frente não poderia concluir essa etapa.

Ao meu filho, Felipe, maior realização da minha vida, fonte da minha alegria e motivação.

Aos meus pais (Messias e Maria José), meus irmãos (Marília, Mariana, Maísa e Marcos). Cada um, a seu modo, de todas as formas possíveis, foram definitivos e indispensáveis para que eu conseguisse dar seguimento a esse trabalho.

Aos meus sogros (Péricles e Sônia) e meus cunhados Rafael e André, minha família adotiva, por todo tempo e carinho que dedicaram ao meu filho para que eu pudesse estudar.

Aos amigos, pelos momentos únicos e palavras de ânimo.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

SILVEIRA, M. O. R. **Estudo das alterações renais e estresse oxidativo em ratas ovariectomizadas com diabetes *mellitus* tipo 1: Efeito do exercício físico moderado.** Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico progressivo, de intensidade moderada, sobre a função e estrutura renal de ratas *Wistar* ovariectomizadas portadoras de DM1 induzido por estreptozotocina (STZ). Para tanto, 18 ratas foram divididas em 3 grupos: CSO – ratas controles sedentárias ovariectomizadas; DSO – ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas; e DTO – ratas diabéticas treinadas ovariectomizadas. O DM1 foi induzido por meio de uma injeção única de STZ (40mg/kg, IV). Após a comprovação do diabetes, o grupo DTO foi submetido a oito semanas de exercício aeróbico moderado e progressivo. As ratas foram colocadas em gaiolas metabólicas para a coleta de urina de 24h, e, após a eutanásia foram coletados os rins e amostras de sangue para a análise dos parâmetros de função e estrutura renal. Os estudos morfológicos foram realizados a partir das colorações em Ácido Periódico *Shift* (PAS) e Hematoxilina (HE). A imunomarcagem para fibronectina, vimentina, macrófagos e alfa-actina foi avaliada no córtex renal. Para avaliação do estresse oxidativo foram determinados os níveis das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Os nossos resultados demonstraram redução do ganho de peso avaliado pelo delta peso nas ratas DSO e DTO quando comparadas ao grupo CSO ($p < 0,05$). Houve aumento no peso do rim nos grupos DSO e DTO ($p < 0,001$) e o exercício não reduziu esse parâmetro. O baixo índice uterino entre os grupos comprovou a efetividade da ovariectomia. O exercício físico não atenuou o aumento da glicemia pós-prandial observado nas ratas DSO e DTO. A glicosúria foi reduzida no grupo DTO em relação ao grupo DSO ($p < 0,05$). A frequência cardíaca e pressão arterial não apresentaram diferença entre os grupos. Quanto aos dados de função renal, a proteinúria foi maior nos animais do grupo DSO ($p < 0,001$), e o exercício físico reduziu esse parâmetro no grupo DTO ($p < 0,05$). Os grupos diabéticos apresentaram aumento do fluxo urinário ($p < 0,01$) e das frações de excreção de sódio e potássio ($p < 0,05$), contudo, o exercício não reduziu esses parâmetros. A creatinina plasmática e a taxa de filtração glomerular não apresentaram alterações entre os grupos. A glomeruloesclerose segmentar focal (GESF) ($p < 0,05$), a área do tufo dos glomérulos justamedulares ($p < 0,01$) e as lesões túbulo-intersticiais (LTI) ($p < 0,05$) foram reduzidas no grupo DTO comparadas às ratas DSO. Em relação à análise estratificada das LTI, o grupo DTO apresentou uma tendência a redução da degeneração hidrópica, dilatação/achatamento e necrose tubular comparado ao grupo DSO, apesar de não ter sido significativo. Contudo, o exercício induziu redução significativa da perda de borda em escova e do debridamento das células tubulares ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nos estudos de imunomarcagem realizados. As ratas do grupo DSO apresentaram aumentos das concentrações urinárias ($p < 0,05$) e plasmáticas de TBARS. O exercício físico diminuiu o estresse oxidativo nas ratas do grupo DTO em relação ao grupo DSO. Os nossos resultados demonstram efeito benéfico do exercício físico sobre alguns parâmetros da função e estrutura renal em ratas diabéticas ovariectomizadas, o qual pode estar sendo mediado, em parte, pela redução do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 1. Ovariectomia. Rim. Exercício físico.

ABSTRACT

SILVEIRA, M. O. R. **Study of renal alterations and oxidative stress in ovariectomized rats with type 1 diabetes *mellitus*: effect of moderate physical exercise.** Dissertation (Master in Biosciences) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

The objective of this study is to evaluate the effects of progressive aerobic physical exercise, of moderate intensity, on the function and renal structure of ovariectomized *Wistar* rats with streptozotocin (STZ) induced DM1. For this, 18 rats were divided into 3 groups: OSC - ovariectomized sedentary control rats; OSD - ovariectomized sedentary diabetic rats; and OTD - ovariectomized trained diabetic rats. DM1 was induced by a single injection of STZ (40mg / kg, IV). After verifying diabetes, the OTD group underwent eight weeks of exercise. The rats were placed in metabolic cages to collect urine for 24 hours and, after euthanasia, the kidneys and blood samples were collected for the analysis of parameters of renal function and structure. The morphological studies were performed with the Periodic Acid-Schiff (PAS) and Hematoxylin (HE). Immunostaining for fibronectin, vimentin, macrophages and alpha-actin was evaluated in the renal cortex. To evaluate the oxidative stress, the levels of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) were determined. Our results demonstrated a reduction of the weight gain assessed by the delta weight in the OSD and ODT rats when compared to the OSC group ($p < 0.05$). There was an increase in kidney weight in the OSD and ODT groups ($p < 0.001$) and exercise did not reduce this parameter. The low uterine index between the groups confirmed the effectiveness of ovariectomy. Exercise did not attenuate the increase in postprandial blood glucose observed in the OSD and OTD rats. The glycosuria was reduced in the OTD group in relation to the OSD group ($p < 0.05$). Heart rate and blood pressure did not differ between groups. Regarding renal function data, proteinuria was higher in the OSD group ($p < 0.001$), and physical exercise reduced this parameter in the OTD group ($p < 0.05$). Diabetic groups showed increased urinary flow ($p < 0.01$) and sodium and potassium excretion fractions ($p < 0.05$), however, exercise did not reduce these parameters. Plasma creatinine did not change between groups. Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) ($p < 0.05$), tuftes area of the juxtamedullary glomeruli ($p < 0.01$) and tubulointerstitial lesions (TIL) ($p < 0.05$) were reduced in the OTD group compared to rats OSD. In relation to the stratified LTI analysis, the OTD group showed a tendency to reduce hydropic degeneration, dilatation / flattening and tubular necrosis compared to the OSD group, although it was not significant. However, exercise induced a significant reduction of brush border loss and debridement of tubular cells ($p < 0.05$). No significant differences were observed in the immunostaining studies performed. The rats of the OSD group showed increases in urinary ($p < 0.05$) and plasma concentrations of TBARS. Physical exercise decreased the oxidative stress in the rats of the OTD group in relation to the OSD group. Our results demonstrate a beneficial effect of exercise on some parameters of renal function and structure in ovariectomized diabetic rats, which may be mediated, in part, by the reduction of oxidative stress.

Keywords: Diabetes mellitus type 1. Ovariectomy. Kidney. Exercise training.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	NEFROPATIA DIABÉTICA	18
2.2	INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS	22
2.3	EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO	26
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS	31
4.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	31
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	31
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	31
4.5	INDUÇÃO DO DIABETES	32
4.6	PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO	32
4.6.1	TESTE DE CORRIDA MÁXIMA	32
4.6.2	PROTOCOLO DE TREINAMENTO	32
4.7	PESO CORPORAL, ÍNDICE UTERINO E PESO DO RIM	33
4.8	PRESSÃO ARTERIAL, GLICEMIA PÓS-PRANDIAL E GLICOSÚRIA	32
4.9	ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL	34
4.9.1	QUANTIFICAÇÃO DA CREATININA PLASMÁTICA E URINÁRIA	34
4.9.2	QUANTIFICAÇÃO DE NA ⁺ E K ⁺ PLASMÁTICA E URINÁRIA	35

4.9.3	QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA URINÁRIA	35
4.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA RENAL	35
4.10.1	ÍNDICE DE GLOMERULOESCLEROSE	36
4.10.2	ANÁLISE MORFOMÉTRICA GLOMERULAR	36
4.10.3	LESÕES TÚBULO-INTERSTICIAIS	36
4.11	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	37
4.12	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	38
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	REFERÊNCIAS	40
	CAPÍTULO 1	50
	CAPÍTULO 2	80
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG II	Angiotensina II
AGEs	Produtos da Glicosilação Avançada
ANP	Peptídeo natriurético atrial
CP	Cisplatina
CSO	Controles sedentárias ovariectomizadas
CTI	Compartimento túbulo-intersticial
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2
DSO	Diabéticas sedentárias ovariectomizadas
DTO	Diabéticas treinadas ovariectomizadas
ECA	Enzima conversora da angiotensina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER	Receptor de estradiol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FEK ⁺	Fração de excreção de potássio
FENa ⁺	Fração de excreção de sódio
FPR	Fluxo plasmático renal
HE	Hematoxilina e eosina
IGE	Índice Glomeruloesclerótico

IL- 6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LTI	Lesões túbulo- intersticiais
MCP-1	Fator quimiotático para monócitos e macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
NFκ-B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OVX	Ovariectomia
PA	Pressão arterial
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PAS	Ácido periódico shift
PAS	Pressão arterial sistólica
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PKC	Proteína quinase C
RAGE	Receptor de Produtos da Glicosilação Avançada
RE- α	Receptor de estrógeno tipo alfa
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema renina- angiotensina- aldosterona

STZ	Estreptozotocina
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF- α	Fator transformador de crescimento alfa
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEFG-A	Fator de crescimento endotelial vascular – A

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Desenho do protocolo experimental. **76**
- Figura 2 Fotomicrografias respresentativas das alterações histológicas glomerulares e lesões túbulo-intersticiais de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (A e D), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (B e E) e diabéticas treinadas ovariectomizadas (C e F). **77**
- Figura 3 Concentração de TBARS plasmático (A), TBARS urinário (B), e análises das correlações de Pearson entre Proteinúria *versus* Índice Glomeruloesclerótico (C) e Proteinúria *versus* TBARS urinário (D) de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO). **78**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de Peso Glicemia Pós- Prandial, Glicosúria, Frequência Cardíaca, Pressão Arterial Sistólica, Pressão Arterial Diastólica e Pressão Arterial Média de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO), diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO).	73
Tabela 2	Parâmetros de função renal de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO), diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO).	74
Tabela 3	Parâmetros de histologia e morfometria renal de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO), diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO).	75
Tabela 4	Estudos imuno-histoquímicos em região cortical de ratas experimentais CSO, DSO e DTO.	81

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, decorrente da destruição auto-imune das células beta pancreáticas (KAZEMI et al., 2016; LI, HUANG, GAO, 2017) e deficiência absoluta da produção e secreção de insulina, com consequentes alterações no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios (SCHMATZ et al., 2012). As complicações crônicas do diabetes *mellitus* (DM) atingem principalmente os sistemas cardiovascular e renal, sendo a nefropatia diabética a complicação mais importante e principal causa de morte entre os pacientes portadores do DM1 (MARIC, SULLIVAN, 2008).

Os estágios iniciais da nefropatia diabética são caracterizados por alterações na estrutura e função renal, incluindo hiperfiltração glomerular, expansão mesangial, hipertrofia renal adaptativa e microalbuminúria (BANGSTAD et al., 1993; SHARMA, MCGOWAN, 2000; VOLPINI et al., 2003). Com a progressão da doença, a perda da seletividade da barreira de filtração e redução da superfície filtrante resultam em densa proteinúria e progressiva queda da taxa de filtração glomerular (TFG) (TREVISAN, BARNES, VIBERTI, 1997). Estudos têm demonstrado que os processos fisiopatológicos renais ocorrem principalmente nos glomérulos caracterizados por expansão da matriz mesangial, espessamento da membrana basal glomerular e lesão dos podócitos (BANGSTAD et al., 1993; COIMBRA et al., 2000). Contudo, o estado hiperglicêmico crônico também provoca alterações morfológicas nos túbulos renais e ativação de células imunes, como os macrófagos/monócitos no compartimento túbulo-intersticial do rim diabético (BARUTTA et al., 2014).

Devido à complexidade entre fatores genéticos e ambientais, a análise genética de DM é difícil e pouco compreendida em seres humanos. Dado o impacto da DM e da nefropatia diabética para a saúde pública, os modelos animais de diabetes são, portanto, muito úteis e vantajosos em estudos biomédicos, pois oferecem possibilidades de novas descobertas sobre o diabetes em humanos (SRINIVASAN, RAMARAO, 2007). Estudos têm relatado intensa peroxidação lipídica e comprometimento do sistema de defesa antioxidante em modelos experimentais com ratos e diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) (SABU, KUTTAN, 2002; SALEH et al., 2016; KUNASEGARAN et al, 2017). A hiperglicemia favorece não somente o quadro típico de nefropatia diabética, como também liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e alterações na histologia renal. Acredita-se que essa pode ser a principal via para o desenvolvimento de lesões renais (FERNANDES et al., 2016).

Tem sido documentado que as mudanças nas concentrações hormonais durante a transição da menopausa influenciam no desenvolvimento do DM com maior prevalência em mulheres a partir dos 50 anos de idade (SZTEJNSZNAJD et al., 2006; MACHADO et al., 2012;) e na patogênese e progressão dos danos renais (STEFANSKA, BERGMANN, SYPNIEWSKA, 2015). Keck e colaboradores (2007) sugerem um maior risco para o desenvolvimento de nefropatia diabética em mulheres durante o período da pós-menopausa devido à perda da renoproteção feminina conferida pelos hormônios ovarianos. A ovariectomia é associada também à progressão mais rápida da nefropatia tanto em ratas diabéticas, quanto em outros modelos de doenças renais (AMARAL et al., 2014). Portanto, sugere-se que, pertencer ao sexo feminino, antes da menopausa, pode ser um fator protetor, e que o sexo masculino pode ser um fator de risco para o desenvolvimento e progressão da doença renal não diabética (MARIC, SULLIVAN, 2008). No entanto, essa associação não foi completamente elucidada.

O exercício é considerado uma peça chave associado à dieta e terapia farmacológica para o controle do DM. Tikkanen-Dolenc e colaboradores (2017) mostram que pessoas fisicamente ativas possuem maior longevidade e menor taxa de mortalidade e morbidade para doenças cardiovasculares e DM1. Nos rins, o exercício promove uma melhor adaptação das suas funções ao favorecer o equilíbrio dos fatores vasoconstritores e otimização da resposta hemodinâmica (CLAUSEN et al., 1973; GUSMÃO et al., 2003). Desse modo, exercício físico contínuo, preferencialmente o aeróbio, é utilizado como abordagem não farmacológica na prevenção e/ou no tratamento de diversas doenças, dentre elas o DM (ZANESCO, ZAROS, 2009). Na nefropatia diabética, tem sido destacado o efeito benéfico do exercício físico moderado ao promover redução da albuminúria e do estresse oxidativo, e consequente melhora da biodisponibilidade de NO e da função renal (RODRIGUES et al., 2011).

Diante do impacto do DM1 para a saúde pública e dos poucos estudos relacionando a nefropatia diabética à condição de privação dos hormônios ovarianos e a influência do exercício físico como medida terapêutica, torna-se relevante investigar a relação entre esses fatores. Portanto, o presente estudo visa analisar o impacto do exercício aeróbico progressivo, de intensidade moderada, sobre a função e estrutura renal, bem como sua influência sobre o estresse oxidativo em ratas *Wistar* ovariectomizadas portadoras de diabetes *mellitus* do tipo 1 induzido por STZ. Desse modo, espera-se contribuir para que novas terapias sejam propostas para o tratamento do DM em mulheres após a menopausa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nefropatia Diabética

O DM1 é caracterizado como uma doença metabólica crônica e uma das complicações mais importantes do diabetes, geralmente diagnosticado em idade jovem com deficiência de insulina (KAZEMI et al., 2016; LI, HUANG, GAO, 2017). O seu desenvolvimento tem origem na destruição auto- imune das células beta pancreáticas (EISENBARTH, 2010; SCHMATZ et al., 2012). Com a deficiência de insulina, a hiperglicemia crônica está associada ao maior risco para inflamação, disfunção endotelial e alterações na coagulação, e consequente suscetibilidade para doenças cardiovasculares e renais. Por isso, o DM1 está associado à mortalidade precoce (MARIC, SULLIVAN, 2008; KUPFER et al., 2017).

A doença renal diabética tornou-se um problema de saúde pública mundial (SUAREZ et al., 2013; WANG et al., 2014). Esse termo abrange não somente a nefropatia diabética clássica, mas também a disfunção renal devido à nefrosclerose (HIRAKAWA, TANAKA, NANGAKU, 2017). A nefropatia diabética é considerada uma importante complicação microvascular do diabetes mellitus por apresentar alta morbidade e alta prevalência atingindo um terço dos pacientes diabéticos (WANG et al., 2014; ROSSI et al., 2017). Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento da nefropatia diabética, embora não estejam totalmente esclarecidos, são didaticamente classificados como de origem hemodinâmica e metabólica (BANGSTAD et al., 1993; SHARMA, MCGOWAN, 2000). Estes dois insultos provocam resposta inflamatória e danos oxidativos no rim, responsável pela lesão ao glomérulo e ao túbulo renal.

A elevação dos níveis de glicose, bem como a hiperglicemia crônica, está relacionada com a lesão renal e pode estimular direta ou indiretamente alterações em componentes estruturais, como na viabilidade das células mesangiais e nos depósitos de matriz extracelular (MEC) (LAGRANHA et al, 2007). As alterações metabólicas e hemodinâmicas do diabetes ativam os podócitos para aumentar a produção de MEC, levando ao espessamento da membrana basal glomerular. Logo, acredita-se que as células epiteliais parietais, por mecanismo semelhante, causem também espessamento da cápsula de *Bowman* (HOLDERIED et al, 2014). Em estágios iniciais da nefropatia diabética, os primeiros sintomas podem aparecer em até dois anos e as alterações histológicas são predominantemente glomerulares (POURGHASEM, SHAFI, BABAZADEH, 2015). Contudo, principalmente em ratos machos

diabéticos induzidos por STZ foi demonstrado dilatação, atrofia, apoptose e fibrose intersticial (CHOW et al., 2004). Rodrigues e colaboradores (2011) evidenciaram lesões degenerativas vacuolares em ratos diabéticos sedentários. No entanto, Ortolan e colaboradores (2011) relataram somente o acúmulo de glicogênio nas células de túbulos proximais sem alterações estruturais em ratos diabéticos. O aumento do volume tubular e a proliferação celular foram demonstrados também em ratas diabéticas (CHEN et al., 2008; FERNANDES et al., 2016).

No estágio inicial da doença renal ocorre aumento da TFG em função do desequilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores, culminando em elevação da pressão glomerular, com consequente aumento na filtração pelo néfron e passagem de proteínas através da barreira de filtração (TREVISAN, BARNES, VIBERTI, 1997; BJORNSTAD, CHERNEY, MAAHS, 2014). A proteinúria já está presente, antes mesmo que a perda de função renal seja detectada. Por isso, a progressão da doença renal está diretamente correlacionada ao aumento da proteinúria, sendo esta um importante marcador de função renal (GUIMARÃES et al., 2007; MURUSSI et al., 2008; MENON, CHUANG, HE, 2012). Esses fatores, associados ao diabetes, agravam o prognóstico da doença renal (MENDE, BREGMAN, 2010). Saleh e colaboradores (2016) relataram a ocorrência de proteinúria e aumento da permeabilidade glomerular em modelo de DM1 induzida por STZ em ratos. Ito e colaboradores (2015) demonstraram também a ocorrência de proteinúria associada ao comprometimento de proteínas estruturais glomerulares em ratos *Zucker* diabéticos. Apesar dos diferentes mecanismos de estabelecimento da nefropatia diabética tipo 1 e tipo 2, ambas têm igual impacto sobre os níveis de glicemia e proteinúria, conforme evidenciado em modelo experimental de coelhos diabéticos induzidos por aloxano, altas doses de glicose e dieta hiperlipídica, respectivamente (WANG et al., 2014).

As alterações hemodinâmicas do DM estão associadas ao desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores. O aumento da produção de angiotensina II (ANG II) intrarenal na fase inicial da nefropatia diabética induz vasoconstrição da arteríola eferente, resultando em aumento da TFG, hipertrofia glomerular e passagem de proteínas através da barreira de filtração (TREVISAN, BARNES, VIBERTI, 1997; STIEGER, WORTHMANN, SCHIFFER, 2011). Por outro lado, o óxido nítrico (NO), fator de relaxamento derivado do endotélio, regula muitas funções celulares e pode se comportar como um mediador de danos celulares quando exposto aos radicais livres, devido à geração de peroxinitrito nessa reação (PACHER, BECKMAN, LIAUDET, 2007). O aumento do NO em decorrência da

hiperglicemia e do processo inflamatório local (RODRIGUEZ et al., 2016), em estágios iniciais da nefropatia diabética, provoca dilatação preferencial da arteríola aferente, contribuindo para a hiperfiltração glomerular observada nesta fase da doença, em modelo experimental de diabetes induzida por STZ com ratos machos (VEELKEN et al., 2000). O estresse mecânico é provocado também pelas alterações hemodinâmicas do diabetes e promove lesões por cisalhamento constante do endotélio, sendo um importante estímulo para a produção de moléculas-chaves envolvidas no acúmulo de matriz mesangial, lesão podocitária e aumento da resposta inflamatória renal (STIEGER, WORTHMANN, SCHIFFER, 2011).

Quanto aos mecanismos metabólicos envolvidos na nefropatia diabética, o acúmulo de produtos da glicosilação avançada (AGEs) tem sido muito documentado. Os AGEs derivam da glicosilação não-enzimática de proteínas após exposição prolongada ao meio hiperglicêmico, podendo acumular-se nos rins, estimulando a síntese de MEC (MIYATA et al., 1998; THROCKMORTON et al., 1995; ITO et al., 2015). Os AGEs podem também se ligar aos seus receptores (RAGE), presentes nos macrófagos, podócitos e nas células mesangiais, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais ativam o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (LIN, 2006; CHEN et al, 2008), que por sua vez induz a síntese de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) (GOLDIN et al., 2006; TANG et al, 2017). Além disso, a hiperglicemia crônica pode ativar a via dos polióis, gerando aumento da relação de dinucleótido de nicotinamida e adenina NADH/NAD⁺ e estimulando a síntese de diacilglicerol, principal ativador fisiológico da proteína quinase C (PKC), a qual está envolvida em diversas vias que culminam em estresse oxidativo, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento de lesões renais (HENRY et al., 1999; BARBOSA, OLIVEIRA, SEARA, 2008).

Dentre os mecanismos envolvidos na nefropatia diabética, o aumento do estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, o que desencadeia danos celulares e compromete a sinalização redox, sendo associado a processos fisiopatológicos e progressão de doenças crônicas (DEBEVEC, MILLET, PIALOUX, 2017). Por isso, o estresse oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas da nefropatia diabética. Estudos mostram a elevação de parâmetros de avaliação do estresse oxidativo, inflamação e lesões estruturais no rim associada ao diabetes, com melhora dessas alterações

em modelos com uso de terapias antioxidantes (GOMES et al., 2015; BAHADIR et al., 2016; FERNANDES et al., 2016; SALEH et al., 2016). De acordo com Saleh e colaboradores (2016), o estresse oxidativo contribuiu para o aumento da permeabilidade glomerular à albumina e endotelina -1 (ET-1) sendo o tratamento com o antioxidante responsável por induzir menor excreção urinária de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), menor produção de superóxido glomerular e diminuição da excreção de ET-1 urinária renal em ratos com DM1 induzido por STZ. De modo similar, Karanovic e colaboradores (2016), evidenciaram redução do estresse oxidativo sistêmico, da proteinúria e glomeruloesclerose em modelo de ratos espontaneamente hipertensos com nefropatia em estágio inicial tratados com antioxidante. A nefropatia no DM1 está associada também à redução da biodisponibilidade de NO, geração anormal de ERO, aumento da peroxidação lipídica, da tensão e do consumo de oxigênio renal, além de hipertrofia renal e aumento da filtração glomerular em ratos com DM induzido por STZ. Alguns desses efeitos foram reduzidos pela terapia com vitamina E, cuja ação previne a formação excessiva de ERO (PALM et al., 2003).

O estresse oxidativo pode também ser ativado pela ANG II. A enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), ativada pela ANG II, além de atuar como mediadora do estresse oxidativo, é responsável também por aumentar o metabolismo de NO à peroxinitrito, sugerindo uma estreita ligação entre as alterações vasculares e as alterações metabólicas típicas do DM (RODRIGUES et al., 2011, AGARWAL et al., 2012; KARANOVIC et al., 2016). Além disso, o aumento da expressão da isoforma óxido nítrico sintase (NOS) induzível (iNOS) está relacionado ao estresse oxidativo e processo inflamatório característico da nefropatia diabética (PUNARO et al., 2014). A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), expressa nas células endoteliais dos glomérulos, além de contribuir com as funções renais normais, pode estar também envolvida nos estágios iniciais da nefropatia diabética (SLYVKA et al, 2016; POULOS, LI, 2017). Contudo, Lagranha e colaboradores (2007) afirmam que a relação estabelecida entre o estresse oxidativo e o diabetes são dependentes das características de cada modelo de estudo como: espécies experimentais estudadas, o tempo do diabetes, controle metabólico, tratamento ou não com insulina e método de avaliação do NO e NOS utilizados.

A via inflamatória e a via do estresse oxidativo podem estar associadas à nefropatia diabética. O perfil inflamatório tem sido cada vez mais elucidado correlacionando a nefropatia diabética à infiltração renal de monócitos e macrófagos, aumento da expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas inflamatórias em estudos clínicos e com animais experimentais

(BADAL, DANESH, 2015). Como essa inflamação na nefropatia diabética apresenta-se em baixo grau quando comparada a doenças inflamatórias clássicas, é denominada microinflamação (BARUTTA et al., 2014). O infiltrado de células inflamatórias, principalmente macrófagos, está presente no rim diabético e o seu acúmulo está associado à progressão da injúria renal e fibrose na nefropatia diabética em modelos de DM2 induzido por STZ (CHOW et al., 2004). Esse acúmulo de macrófagos pode promover proliferação de fibroblastos, além de serem células potencialmente capazes de produzir vários produtos citotóxicos, incluindo ERO, espécies reativas de nitrogênio, quimiocinas, citocinas e ANG II, os quais podem promover e intensificar a lesão tecidual (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2004). Diante do importante papel dos macrófagos nesse processo, a descoberta do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) como um novo regulador da transcrição de genes mediada por elementos de resposta antioxidante é apontado como alternativa na busca por terapias (YUKITAKE, TAKIZAWA, KIMURA, 2017).

De acordo com Lagranha e colaboradores (2007), não existe terapêutica específica para a nefropatia diabética, bem como não é possível controlar todos os fatores e mecanismos associados à sua gênese e progressão. Desse modo, espera-se que, as pesquisas direcionadas à compreensão desses mecanismos moleculares permitam a descoberta de terapias mais apropriadas que, posteriormente, possam vir a ser testadas em humanos.

2.3 Influência dos Hormônios Sexuais Femininos

Estudos demonstram uma importante influência dos hormônios sexuais sobre a incidência e progressão das doenças renais, apontando os estrógenos como um fator renoprotetor, tanto em animais experimentais, quanto em ensaios clínicos envolvendo mulheres em idade fértil (NEUGARTEN, ACHARYA, SILBINGER, 2000; KECK et al., 2007; PÉREZ-TORRES et al., 2009; AMARAL et al., 2014; CLOTET et al., 2016). O período anterior à menopausa pode ser um fator protetor para o desenvolvimento e progressão da doença renal não diabética, enquanto o sexo masculino pode ser um fator de risco (PEREIRA et al., 2016). Keck e colaboradores (2007) demonstraram um aumento progressivo nas concentrações de glicose sanguínea, diminuição gradual de estrogênio, metaloproteinase -9 da matriz, aumento do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), além de proliferação celular em córtex renal durante a transição hormonal entre a peri-menopausa e pós-menopausa em ratas com diabetes induzido por STZ e com falha ovariana induzida por diepóxido de 4-vinilciclo-hexeno

(VDC). O risco associado ao sexo masculino foi demonstrado por Clotet e colaboradores (2016) ao evidenciar que a gonadectomia atenuou a albuminúria, a expansão da matriz extracelular, a perda de podócitos, o acúmulo de alfa-actina e a deposição de colágeno no córtex renal em ratos com diabetes induzido por STZ. Ohta e colaboradores (2014) demonstraram que o aumento da glicose e diminuição da insulina plasmática foi observado mais cedo em ratos machos, além de progressão mais rápida das complicações do diabetes, como microangiopatia e nefropatia, quando comparado às fêmeas em modelos de diabetes do tipo 2. No entanto, quando se trata de doença renal diabética, essa diferença de sexo na incidência e progressão da doença renal ainda não foi totalmente estabelecida (MARIC, SULLIVAN, 2008; DIAMOND-STANIC, YOU, SHARMA et al., 2012).

Essa relação ainda não está bem definida, pois existem poucos estudos demonstrando os níveis hormonais em pacientes de ambos os sexos correlacionando ao DM1 e suas complicações. A puberdade precoce no sexo feminino, quando comparado ao sexo masculino pode estar relacionada também ao aparecimento do DM1 (MARIC, 2009). Alguns estudos confirmam isso ao demonstrar maior incidência de nefropatia diabética em homens quando comparados às mulheres de mesma idade o que pode ser explicado pela incidência mais lenta de microalbuminúria devido à presença dos hormônios femininos (NEUGARTEN; ACHARYA; SILBIGER, 2000; JAFAR et al., 2003; MANKHEY; BHATTI; MARIC, 2005; DIAMOND-STANIC, YOU, SHARMA et al., 2012). Contudo, outros estudos não observaram qualquer diferença na incidência de nefropatia diabética entre homens e mulheres de mesma idade ou referem maior risco de desenvolvimento de lesões renais em mulheres diabéticas comparadas a homens diabéticos (SCHULTZ et al. 1999; LARON-KENET et al., 2001).

De acordo com Uyanik e colaboradores (2010), a associação da hiperglicemia e ovariectomia aumentou a ativação de NF- κ B e os níveis de peroxidação lipídica, além de reduzir a enzima antioxidante superóxido dismutase nos tecidos renais das ratas ovariectomizadas diabéticas com sepse. Ulas e Cay (2011) verificaram aumento nas concentrações de malondialdeído e diminuição das enzimas antioxidantes incluindo a glutatona, catalase, superóxido dismutase dependente de zinco, vitamina A e beta-caroteno no rim de ratas ovariectomizadas e diabéticas. Mankhey e colaboradores (2005) evidenciaram que a deficiência de estrógeno induz alterações renais mais pronunciadas em ratas diabéticas incluindo severa glomerulosclerose, aumento de fibrose túbulo-intersticial, da matriz extracelular e de TGF- β , em ratas ovariectomizadas com diabetes induzido por STZ. Foi demonstrado também, além

dessas alterações, aumento da glicemia e albuminúria, diminuição dos níveis de estradiol e da expressão de proteínas estruturais glomerulares em ratas ovariectomizadas em modelo de diabetes *mellitus* do tipo 2. Estudos têm demonstrado que a reposição de estrógeno diminuiu a peroxidação lipídica e a produção renal de radicais livres (DUBEY, JACKSON, 2001; MANKHEY, BHATTI, MARIC, 2005; SARTORI-VALINOTTI et al., 2008; DIAMOND-STANIC, YOU, SHARMA, 2012) e aumentou os níveis de fatores antioxidantes como a glutatona e a catalase, e induziu a diminuição nos níveis de malondialdeído, sendo esta melhora potencializada com o uso de vitamina E (ULAS, CAY, 2011).

O estrógeno modula processos celulares de modo que, as concentrações mais baixas de estradiol podem acelerar a progressão da nefropatia diabética através do aumento da síntese de matriz extracelular, de fatores inflamatórios como interleucina 10 (IL-10) e interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e VEGF em jovens com diabetes *mellitus* tipo 1 (RYBA-STANISŁAWOWSKA et al., 2014). A redução das concentrações séricas de 17 β -estradiol está associada ao acúmulo de MEC e desenvolvimento de fibrose túbulo-intersticial em ratas *Wistar* diabéticas (MANKHEY, BHATTI, MARIC, 2005; DIXON, MARIC, 2007). Estudos com reposição hormonal comprovam o efeito protetor dos hormônios ovarianos. A reposição com 17 β -estradiol atenuou a glomerulosclerose, a fibrose túbulo-intersticial, o aumento de matriz extracelular e TGF- β em ratas ovariectomizadas com DM1 (MANKHEY, BHATTI, MARIC, 2005), reduziu a hiperglicemia, a albuminúria e a expressão de proteínas estruturais glomerulares em ratas ovariectomizadas com DM2 (CHIN et al., 2005). Além desses benefícios, o 17 β -estradiol reduziu também a creatinina plasmática, o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) (RIAZI, MARIC, ECELBARGER, 2006; AL-TRAD, ASHANKYTY, ALARAJ, 2015), e aumentou a concentração de sódio plasmático e a expressão dos transportadores renais de sódio em ratas ovariectomizadas com DM induzido por STZ (RIAZI, MARIC, ECELBARGER, 2006).

Além disso, os moduladores seletivos de receptores de estrogênio têm sido utilizados como alternativa capaz de simular somente os efeitos benéficos do estrogênio e melhoraram a doença renal em modelos animais e em mulheres no período da pós-menopausa (CHIN et al., 2005; NEUGARTEN, GOLESTANEH, 2013). Outra condição que tem efeito sobre os receptores de estrógeno são os polimorfismos em genes PvuII e XbaI de receptores de estrogênio do tipo α (ER- α) que, em alguns casos, podem alterar a função do receptor e a ação do estrogênio. Foi estabelecida uma importante correlação entre os níveis de estradiol e as

concentrações de citocinas, além de maior risco individual ao câncer de mama e à sobrevivência em mulheres após a menopausa com DM1 e DM2, associados a esses polimorfismos (SOUZA et al., 2012). Além disso, o estrógeno, ao se ligar a seu receptor, forma um complexo cujas sequências da região promotora dos genes de receptores podem promover a regulação da expressão gênica. Logo, esses receptores tem papel importante quanto ao efeito do estrógeno e processos fisiológicos. Esses polimorfismos estão associados a aumento da glicemia de jejum e alterações do perfil lipídico, com aumento no colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade, sugerindo a relação do polimorfismo desses genes com o desenvolvimento do DM2 (MOTAWI et al, 2015).

Contudo, ainda existem muitas controvérsias quanto à modulação dos hormônios sexuais femininos sobre o desenvolvimento da doença renal e a DM. Além disso, existem muito mais estudos experimentais sobre nefropatia diabética com modelos machos do que em fêmeas, o que torna relevante que mais estudos com fêmeas sejam realizados.

2.4 Efeito do Exercício Físico

Apesar da eficácia das terapias farmacológicas com alvo nos controles glicêmicos e da pressão arterial, ainda se observa aumento da incidência da nefropatia diabética (PARK, 2014). Além disso, devido ao fato da comunidade médica vir reconsiderando os riscos cardiovasculares advindos da terapia de reposição hormonal (SOUZA et al., 2007, ORDONEZ et al., 2008), novas estratégias terapêuticas com base em abordagens não-farmacológicas precisam ser urgentemente investigadas visando o reconhecimento de novas terapias adjuvantes para prevenir ou retardar a progressão da nefropatia diabética, sem, no entanto, aumentar os riscos de eventos cardiovasculares.

O exercício tem sido apontado como peça fundamental associado à dieta e a medicação no tratamento de doenças crônicas, dentre elas as doenças cardiovasculares (KRETZSCHMAR et al., 2014) e o diabetes (TAIROVA, LORENZI, 2011; TURKSOY et al., 2015; CONTI et al, 2016). Os mecanismos pelos quais o exercício desempenha um papel protetor sobre as doenças renais, sobretudo sobre a doença renal diabética, não estão totalmente esclarecidos. Contudo, além de melhorar o controle glicêmico (SILVA et al., 2012; MATSHIPI, MONYEKI, KEMPER, 2017), existem evidências indicando que a atividade física parece ser capaz de aumentar a produção e biodisponibilidade de NO e consequente controle da pressão

arterial (ZANESCO, ZAROS, 2009; RODRIGUES et al., 2011), reduzir a apoptose celular (MIYAGI et al., 2014), modular benéficamente o sistema renina- angiotensina- aldosterona (SRAA) (CIAMPONE et al., 2011); melhorar o estado redox (ZANESCO, ZAROS, 2009; PEERI et al., 2013); e inflamatório (SHIRAISHI et al., 2012).

De acordo com Peeri e colaboradores (2013), o aumento de TBARS e diminuição da atividade da superóxido dismutase renal e nitrito/ nitrato sérico foi corrigido pelo exercício físico, além de proteger contra danos renais decorrentes da deficiência de óxido nítrico induzido por N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Rodrigues e colaboradores (2011) evidenciaram que o exercício físico também reduziu a albuminúria e melhorou a biodisponibilidade de NO, o estresse oxidativo e a função renal em ratos com DM1 induzido por STZ. No entanto, o exercício físico de alta intensidade tanto tem sido associado a efeitos benéficos (LUZACK et al., 2017) como a indução de riscos relacionados a mudanças na hemodinâmica renal e excreção de proteína (KURDAK et al., 2010), assim como as diferentes modalidades de exercício (aeróbico, resistido e combinado) (ROSSATO et al., 2007; BORGES, ARAÚJO, CUNHA, 2010; CONTI et al., 2015; DAVY et al., 2017). Por isso, os efeitos do exercício sobre a nefropatia diabética ainda são controversos devido às alterações do fluxo sanguíneo renal e da TFG (GAWRECKI et al., 2017), além de promover também aumento do estresse oxidativo (DEBEVEC, MILLET, PIALOUX, 2017).

A alta intensidade do treinamento pode ser, portanto, um dos fatores determinantes das alterações hemodinâmicas renais, da proteinúria e estresse oxidativo induzidos pelo exercício. Contudo, evidências têm demonstrado que o exercício aeróbico regular de intensidade moderada (70% da capacidade máxima) não promove grandes alterações hemodinâmicas e exerce efeitos protetores no rim diabético, prevenindo a proteinúria e atenuando o estresse oxidativo local tanto no DM experimental (ALBRIGHT et al., 1995, RODRIGUES et al., 2011, SILVA et al., 2012) quanto em outros modelos de doenças renais (AGARWAL et al., 2012., PEERI et al., 2013). O exercício de intensidade moderada demonstrou também efeito ao diminuir N épsilon – carboximetil – lisina, um produto da glicosilação avançada, contribuindo para a redução da expansão glomerular mesangial e fibrose túbulo-intersticial, além de aumentar o metabolismo aeróbio em um modelo de ratos obesos *Zucker* com nefropatia diabética inicial. No entanto, não demonstraram diferença na glicemia, insulina e perfil lipídico nesses animais (BOOR et al., 2009).

Zanesco e Zaros (2009) demonstraram também que o exercício melhorou o estado *redox* característico no diabetes ao promover o aumento das enzimas antioxidantes catalase, glutathiona peroxidase, superóxido dismutase 1 dependente de Cobre (Cu)/ Zinco (Zn), no núcleo e no citosol; a superóxido dismutase 2 dependente de manganês (Mn), presente na mitocôndria; e a superóxido dismutase 3 dependente de Cu/Zn, presente na matriz extracelular; que participam da inativação das espécies reativas de oxigênio tornando-as menos reativas ou neutralizadas. Ghorbanzadeh (2016) demonstrou que a associação do tratamento com crocina, um carotenoide de ação antioxidante, e o exercício físico diminuíram os níveis de malondialdeído e aumentaram a atividade de superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase, além de aumentar os níveis de antioxidantes no tecido cardíaco em ratos com DM2 induzido pela dieta e STZ.

O exercício físico pode modular também as alterações de marcadores inflamatórios no rim. Agarwal e colaboradores (2012) demonstraram reduções da expressão de TNF- α e da atividade do NF- κ B em ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao exercício aeróbico. Além disso, foi demonstrado que o exercício aeróbico reduziu a expressão de TNF- α e aumentou benéficamente os níveis de interleucina 6 (IL-6) e heme-oxigenase 1 em um modelo de nefrotoxicidade induzida por cisplatina (MIYAGI et al., 2014). Também tem sido relatado que o exercício reduziu a albuminúria associado à diminuição da expressão de proteína quimiotática de monócitos -1 (MCP-1), a infiltração de macrófagos, além de aumentar os níveis séricos de superóxido dismutase e preservar os podócitos em camundongos com nefropatia diabética, sem induzir, no entanto, melhoras no sobrepeso e na hiperglicemia (ISHIKAWA et al., 2012; FURUKAWA et al., 2013). A intervenção do exercício em paralelo a dieta mostrou efeitos ainda melhores ao reduzir a reação inflamatória e retardar a progressão do diabetes tipo 2 e da nefropatia diabética inibindo a ativação de NF- κ B e a desregulação da expressão de MCP-1 (LIANG, 2016).

De acordo com Sharifi e colaboradores (2017), a menopausa tem impactos negativos sobre o estado de saúde e qualidade de vida para as mulheres. Porém, a atividade física regular em condições adequadas de treinamento, tem se mostrado eficaz na melhoria do estado geral de saúde em mulheres na menopausa. Foi demonstrado que, a intervenção de educação em saúde combinando dieta e exercício supervisionado melhora os sintomas da perimenopausa em estudo com mulheres diagnosticadas com síndrome perimenopáusicas (LIN et al., 2016). Em resposta ao exercício, é relatado também alterações na expressão gênica de fatores de regulação miogênicos responsáveis pela diferenciação e reparação muscular e diminuição de

fatores miogênicos associados à apoptose e indução da atrofia muscular em mulheres menopausadas, benefícios estes que foram potencializados com o uso da terapia hormonal (DIELI-CONWRIGHT et al., 2009).

Em modelos experimentais, Antus e colaboradores (2003) demonstraram proteinúria grave e glomerulosclerose no rim de ratas ovariectomizadas. Além disso, foi demonstrado aumento do acúmulo de matriz extracelular com predominância da laminina, alteração da arquitetura glomerular, aumento da infiltração de macrófagos no mesângio e diminuição da expressão dos receptores de estrogênio glomerular em ratas ovariectomizadas (ELLIOT et al., 2003). O exercício teve efeito benéfico ao contribuir para o aumento da massa de células beta pancreáticas e diminuição da apoptose em ratas ovariectomizadas com pancreatectomia de 90% em modelo de diabetes tipo 2. Contudo, a associação do exercício físico com a reposição de estrogênio promoveu maiores benefícios sobre as células pancreáticas e a apoptose nessas ratas (CHOI, JANG, PARK, 2005).

Quinteiro e colaboradores (2015) mostraram que a função sistólica e diastólica foi prejudicada em ratas diabéticas ovariectomizadas sedentárias, e apenas as ratas do grupo diabéticas ovariectomizadas submetidas ao exercício aeróbico foi capaz de reverter esta disfunção além de melhorar a peroxidação lipídica e o equilíbrio redox da glutathione em modelo de diabetes induzido por STZ. Foi observado também redução da mortalidade em ratas diabéticas ovariectomizadas submetidas ao exercício aeróbico, a qual pode ser explicada pelo aumento da capacidade física e benefícios cardiovasculares e autonômicos após o treinamento, independentemente de qualquer melhora no controle glicêmico (SOUZA et al., 2007). Adicionalmente, o treinamento aeróbico promoveu maiores benefícios para a função cardiovascular quando comparado ao treinamento de resistência em estudo avaliando o treino aeróbico, o treino resistido e o treino combinado em ratas diabéticas ovariectomizadas (SANCHES et al., 2015). De acordo com Bergeron e colaboradores (2014), o exercício físico reduziu os níveis de glicose e insulina de jejum, melhorou a tolerância à glicose e estimulou a captação de glicose no músculo esquelético, alterações estas que foram induzidas pelo diabetes do tipo 2 em ratas obesas ovariectomizadas.

Contudo, existem poucos estudos associando os efeitos do exercício físico sobre alterações renais e do estresse oxidativo induzidas pelo diabetes *mellitus* tipo 1 na ausência dos hormônios sexuais femininos. Em estudos anteriores do nosso laboratório foi verificado que o exercício físico moderado melhorou o controle metabólico, atenuou a taxa de filtração

glomerular a proteinúria, reduziu a hipertrofia glomerular e a injúria glomerular e tubular, ao reduzir a expressão de fibronectina, colágeno IV, e TGF- β 1 em ratas intactas com diabetes *mellitus* tipo 1 (AMARAL et al., 2016). Diante do impacto do DM1 para a saúde pública e das evidências de agravamento das lesões renais em condições de diminuição dos hormônios femininos, torna-se relevante avaliar o impacto do exercício físico sobre o estresse oxidativo, e alterações de função e estrutura renal em ratas *Wistar* ovariectomizadas portadoras de diabetes *mellitus* do tipo 1 induzida por STZ.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico moderado sobre as alterações da função e estrutura renal, analisando o estresse oxidativo em ratas *Wistar* ovariectomizadas portadoras de DM1 induzido por STZ.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos do exercício físico sobre a pressão sanguínea e o peso corporal de ratas *Wistar* ovariectomizadas portadoras de DM1 induzido por STZ;
2. Analisar os efeitos do exercício físico sobre o perfil glicêmico dos animais experimentais;
3. Determinar os efeitos do exercício físico sobre os parâmetros de função renal em ratas *Wistar* ovariectomizadas portadoras de DM1 induzido por STZ;
4. Avaliar os efeitos do exercício físico sobre as alterações glomerulares e do compartimento túbulo-intersticial de ratas *Wistar* ovariectomizadas portadoras de DM1 induzido por STZ;
5. Avaliar as expressões de vimentina, fibronectina, macrófagos e alfa-actina no tecido renal desses animais;
6. Analisar os efeitos do exercício físico sobre a concentração plasmática e urinária de TBARS;
7. Correlacionar os efeitos do exercício sobre o estresse oxidativo e às possíveis alterações de função e estrutura renal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas 18 ratas *Wistar* de 10 semanas de idade, com peso corporal inicial em torno de 180 a 200 gramas. Os animais são provenientes do biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira/IMS/UFBA, onde os mesmos foram mantidos em ambiente com ciclo de claro/escuro (12 horas luz, das 7 às 19h) e controle de temperatura ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à água e ração. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal Experimental do IMS/CAT/UFBA com protocolo de nº 008/2013.

4.2 Procedimentos Experimentais

Para dar início ao protocolo de treinamento, os animais foram ambientados à esteira por 5 dias (esteira parada) e climatizados por outros 5 dias (esteira ligada à 5m/min). Após esse procedimento, houve uma seleção dos animais aptos ao exercício, e aqueles animais que demonstraram inaptidão foram excluídos do estudo.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Os animais selecionados para o estudo foram anestesiados com Xilazina (6 mg/kg) e Ketamina (40 mg/kg), via intraperitoneal, e passaram por uma cirurgia de ovariectomia bilateral. Foram feitas incisões bilaterais de aproximadamente 1cm nos flancos dos animais, até a cavidade abdominal, os ovários foram removidos e o músculo e a pele, suturados (AMARAL et al., 2014). Como medida profilática de infecção pós-operatória, os animais receberam a dose de 5mg/Kg de antibiótico Enrofloxacino (Flotril® 2,5%).

4.4 Grupos Experimentais

Após sete dias de recuperação cirúrgica, todos os animais passaram por um teste de esforço, que consistiu em um teste de corrida máxima (intensidade 100%), com o intuito de determinar a intensidade do treinamento para cada animal (55 a 70% da intensidade máxima). Logo em

seguida, os animais foram randomizados e divididos em três grupos experimentais: Controles Sedentárias Ovariectomizadas (CSO- ratas ovariectomizadas que receberam o tampão de citrato e não foram submetidas ao protocolo de treinamento n=6); Diabéticas Sedentárias Ovariectomizadas (DSO- ratas ovariectomizadas que receberam STZ e não foram submetidas ao protocolo de treinamento n=6) e Diabéticas Treinadas Ovariectomizadas (DTO- ratas ovariectomizadas que receberam STZ e foram submetidas ao protocolo de treinamento n=6).

4.5 Indução do Diabetes

O diabetes foi induzido por uma única injeção intravenosa de STZ, na dose de (40 mg/kg), diluída em tampão citrato 0,1M nos animais de todos os grupos diabéticos. O grupo controle recebeu dose única intravenosa do veículo, tampão citrato 0,1M. Uma semana após a injeção de STZ ou veículo, a glicose sanguínea de jejum (GSJ) foi mensurada, e aqueles animais que receberam STZ cujo valor da GSJ estava acima de 250mg/dL foram considerados diabéticos. Todos os animais foram eutanasiados 10 semanas após a indução do diabetes (AMARAL et al., 2016).

4.6 Protocolo de Exercício Físico

4.6.1 Teste de Corrida Máxima

Testes de corrida máxima foram realizados no início, com 4 semanas e no final do experimento com o objetivo de avaliar a capacidade física dos animais e/ou ajustar a intensidade do exercício. Tais testes foram realizados em 3 dias alternados, no qual o animal inicialmente permaneceu na esteira parada durante 5 minutos, tendo a velocidade aumentada em 1m/min a cada 6 segundos até atingir a velocidade de 10m/min. A partir de então, o tempo foi disparado e a velocidade é aumentada em 1m/min a cada 3 minutos até que o animal atinja a exaustão. Foi considerado exausto o animal que parou a corrida por 2 segundos, por 3 vezes em um minuto, ou quando ele permaneceu parado por 10 segundos (AMARAL et al., 2016).

4.6.2 Protocolo de Treinamento

O treino para o grupo DTO 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 do exercício também foi progressivamente aumentada de 55-70% da capacidade máxima atingida pelo animal no teste de corrida máxima, sendo acrescentados 5% a cada semana (SILVA et al., 2012). Esse protocolo foi realizado com 0% de inclinação da esteira, durante cinco dias consecutivos por semana, e é considerado como um exercício de intensidade moderada progressivo para ratos diabéticos (SOUZA et. al., 2007; RODRIGUES et al., 2011, SILVA et al., 2012; AMARAL et al., 2016).

Uma semana após a indução do diabetes, o grupo DTO foi submetido ao 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 5m/min durante 5min, em dias alternados, para mantê-los climatizados à esteira durante os períodos dos testes de exaustão, conforme desenho experimental (Figura 1).

4.7 Peso Corporal, Índice Uterino e Peso do Rim

O peso corporal foi determinado semanalmente, antes de cada sessão de exercício. O valor de peso é apresentado em Delta peso (ZAMBOM et al., 2009) que leva em consideração o peso inicial e final dos animais.

$$\text{Delta peso} = \frac{\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}}{\text{Peso Inicial}} \times 100$$

Após a eutanásia, o útero das ratas foi removido e pesado para determinação do índice uterino com a finalidade de confirmar a ovariectomia pela atrofia uterina decorrente da privação dos hormônios ovarianos. Os rins também foram removidos e pesados. O peso do rim foi avaliado pela média do peso do rim direito e esquerdo corrigido pelo peso corporal. Posteriormente, foram fixados para estudos histológicos.

4.8 Pressão Arterial, Glicemia Pós- Prandial e Glicosúria

A pressão arterial foi mensurada no final de cada semana, antes das sessões de exercício, pelo método de pletismografia de cauda (LE 5001 Electro-Esfigmomanômetro - Panlab, Espanha). As mensurações foram realizadas com os animais conscientes e pré-aquecidos a 37°C durante 5 min, em ambiente tranquilo e livre de ruídos. A média de três leituras consecutivas da pressão foi registrada para cada medição semanal. Diante da impossibilidade de determinar a glicemia de jejum devido ao estado debilitado das ratas em decorrência do diabetes, a avaliação da glicemia pós-prandial foi utilizada nesse estudo. A mesma foi mensurada a partir do sangue do tronco colhido imediatamente após a eutanásia. A glicosúria foi analisada por método colorimétrico (Abbott Diagnostics *Kit*) utilizando um analisador bioquímico automático (Abbott Diagnostics C.4100 - Saint-Laurent, Quebec, Canadá) para determinação da glicemia pós-prandial e da glicosúria.

4.9 Estudo da Função Renal

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento, amostras de sangue e urina foram coletadas para a análise de parâmetros da função renal. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais onde permaneceram para coleta de amostras de urina de 24 horas. O fluxo urinário foi então determinado a partir do volume urinário coletado no período de 24 horas. Após a coleta de urina, os animais foram eutanasiados por decapitação para a coleta de sangue do tronco em tubos também heparinizados e submetidos à centrifugação e refrigeração a - 20°C para análise da função renal. Foram realizadas dosagens de creatinina, Na⁺ e K⁺ na urina e no sangue, e proteína nas amostras de urina.

4.9.1 Quantificação da creatinina plasmática e urinária

A análise foi realizada pelo método colorimétrico utilizando ácido pícrico (HAYGEN, 1953). O princípio dessa técnica se fundamenta no fato da creatinina e outros cromógenos do plasma reagirem com o ácido pícrico em meio alcalino formando o picrato de creatinina e os cromógenos- picrato, respectivamente, dando à solução uma coloração amarelada. A coloração foi medida em espectrofotômetro e absorção máxima de 510nm. O plasma foi acidificado para quantificar a creatinina plasmática. A análise da creatinina urinária foi feita seguindo o mesmo princípio descrito acima, excluindo a etapa de acidificação. A TFG foi determinada pelo *Clearance* de Creatinina.

$$\text{TFG} = \frac{\text{Concentração de Creatinina Urinária} \times \text{Volume urinário}}{\text{Concentração de Creatinina Plasmática}}$$

4.9.2 Quantificação de Na⁺ e K⁺ plasmática e urinária

A dosagem de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) foi realizada por fotometria de chama (Mod. 910, *Analyser*, São Paulo, Brasil). Essa técnica baseia-se na espectroscopia atômica, na qual a aspiração da amostra diluída contendo cátions é nebulizada e levada a uma chama. A radiação emitida possui diferentes comprimentos de onda, que são característicos para cada elemento químico contido na amostra. O fotômetro permite a separação das radiações com comprimentos de onda distintos, de modo que o comprimento de onda emitido por um determinado íon é proporcional à sua concentração na solução (OKUMURA, CAVALHEIRO, 2004). Após as determinações das concentrações plasmáticas e urinárias dos íons Na⁺ e K⁺ foram calculadas as cargas e as frações de excreção (FE). O mesmo cálculo aplicado para a FENa⁺ foi aplicado para a FEK⁺.

$$\text{FENa}^+ = \frac{\text{Concentração de Sódio Urinário} \times \text{Fluxo Urinário}}{\text{TFG} \times \text{Concentração de Sódio Plasmático}} \times 100$$

4.9.3 Quantificação da proteína urinária

A quantificação da proteína urinária foi realizada pelo método colorimétrico, utilizando o *kit* comercial *Sensiprot* (*Labtest*®, MG, Brasil). Esse teste baseia-se na formação de um complexo resultante da reação entre o vermelho de pirogalol e o molibdato de sódio. Tal complexo, quando combinado com a proteína existente na urina (meio ácido), desenvolve um cromóforo azul. A intensidade da coloração formada foi quantificada em absorbância de 600nm, sendo proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

4.10 Análise da Histologia Renal

Os rins removidos após a eutanásia foram utilizados para estudos histológicos, morfológicos e imuno-histoquímicos. O rim esquerdo removido foi fixado em solução de *Methacarn* (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%), durante um período de 24 horas e, após esse período, o fixador foi substituído por álcool etílico hidratado 70° INPM. Ao final, o tecido foi parafinado e cortado em fatias de 4µm de espessura. Os cortes foram corados com

Ácido Periódico *Shift* (PAS) para análise das alterações morfológicas glomerulares e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação das alterações histológicas túbulo-intersticiais.

4.10.1 Índice Glomeruloesclerótico (IGE)

A avaliação do IGE de glomérulos com glomeruloesclerose segmentar focal (GESF) foi determinada pela análise em microscópico óptico de 100 glomérulos do córtex renal dos animais, através de escores que refletem alterações caracterizadas por aumento da matriz mesangial, obliteração e dilatação dos vasos, a partir da coloração PAS. Foi utilizado o método semi-quantitativo descrito por Saito e colaboradores (1987) a partir do escore 0, glomérulo normal; escore 1, área esclerótica até 25% (esclerose mínima); escore 2, área esclerótica de 25 a 50% (esclerose moderada); escore 3, área esclerótica de 50 a 75% (esclerose moderada a severa); escore 4, área esclerótica de 75% a 100% (esclerose severa). O IGE foi calculado segundo a fórmula: $IGE = (1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) + (4 \times n4) / nT$, onde n1 representa o número de glomérulos com escore 1, n2 representa o número de glomérulos com escore 2, n3 representa o número de glomérulos com escore 3, n4 representa o número de glomérulos com escore 4 e nT representa o número total de glomérulos avaliados.

4.10.2 Análise Morfométrica Glomerular

A análise morfométrica glomerular foi feita pela medida da área do tufo glomerular. A análise morfométrica do espaço capsular foi feita pela medida do corpúsculo renal subtraída a área do tufo glomerular. Ambas as análises foram feitas de 30 glomérulos da região cortical e 20 da região justamedular de cada animal. As imagens foram obtidas pela microscopia de luz captadas por meio de vídeo-câmera conectada a um analisador de imagens (*Olympus BX51* - Japan) utilizando a objetiva de 40X. A área do tufo glomerular e do corpúsculo renal foi delimitada manualmente e determinada por morfometria computadorizada através de um *software (Image J)*.

4.10.3 Lesões Túbulo-intersticiais

A avaliação das Lesões Túbulo-Intersticiais (LTI) foi realizada em 30 campos corticais/animal através de escores que refletem a extensão de alterações caracterizadas por dilatação, achatamento, perda de borda em escova, necrose, debridamento das células tubulares e presença de degeneração hidrópica. Essas alterações foram quantificadas de duas formas: a primeira por escore semiquantitativo (SHIH, HINES, NEILSON; 1988). Escore 0: nenhuma lesão; escore 0,5: pequenas áreas de lesões discretas e focais; escore 1: lesão atingindo uma área < 10% do córtex; escore 2: lesão atingindo uma área de 10-25%; escore 3: lesão atingindo uma área de 25-75% e escore 4: lesão extensa e difusa atingindo uma área > que 75%. A segunda foi pela análise quantitativa da porcentagem de cada tipo de lesão por animal.

4.11 Estudo de Imunoistoquímica

Os cortes dos tecidos foram desparafinizados e incubados com anticorpos primários: Anti-ED-1(macrófagos/monócitos - 1:1000), monoclonal, AbDserotec®; Anti-vimentina (1:100), monoclonal, marcador de regeneração tubular, Dako®; Anti α - SMA (1:1000), monoclonal, marcador de alterações nos vasos renais; Anti-desmina (1:100, 1:50), monoclonal, marcador de lesão de podócitos; Anti-linfócitos (1:200, 1:100 e 1:50), monoclonal, Harlan Sera-Lab® e Anti-fibronectina (1:500), policlonal, marcador de fibrose glomerular. Os anticorpos secundários: Anti-mouse (1:200), Vector Laboratories, Burlingame® para ED-1, Vimentina, Linfócitos, Desmina e Alfa-actina; e Anti- rabbit (1:400), Vector Laboratories, Burlingame® para Fibronectina. No entanto, os testes para Desmina e Linfócitos não revelaram marcação em nenhum dos grupos estudados.

Foi realizado um controle negativo para cada reação de imunoistoquímica, submetendo os cortes de tecido às mesmas condições da reação, omitindo-se, entretanto, a incubação do anticorpo primário. O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (*Vector Laboratories, Burlingame®*, CA, USA) e a cor foi desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina (*Easypath®*). A contra coloração foi feita com Hematoxilina (ED-1, Vimentina e Alfa-actina) e *Metil green* (Fibronectina).

A avaliação dos resultados da imunorreação foi feita através de escores que refletem a extensão da área do córtex renal e do compartimento túbulo-intersticial marcada, ou através da contagem do número de células positivas. Para a quantificação de ED-1 foi realizada a

contagem de células positivas em 100 glomérulos corticais e 50 campos do compartimento túbulo-intersticial cortical para cada animal, sendo a contagem de células dividida pelo número de campos para obter a média do animal. A quantificação de Vimentina foi realizada a partir da imagem de 30 campos do compartimento túbulo-intersticial cortical e aplicação de escores que refletem a extensão da área do córtex renal marcada, graduado da seguinte forma: escore 0, representa 0 a 5% do campo marcado; escore 1, representa 5 a 25% do campo marcado; escore 2 representa 25 a 50% do campo marcado; escore 3 representa 50 a 75% do campo marcado e 4 representa 75 a 100% do campo marcado. Foram analisados 30 campos seguidos e determinado um escore médio para cada rato (LEWERS et al., 1970). Para Alfa-actina foram utilizados 50 campos corticais por animal e *threshold* de 140 (ITO et al., 2015). A marcação de Fibronectina foi quantificada a partir de 50 glomérulos por animal utilizando *threshold* de 130 (AMARAL et al., 2016).

4.12 Avaliação do Estresse Oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo, foram determinados os níveis plasmáticos e urinários das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para isso foi utilizando o ensaio do ácido tiobarbitúrico (OHKAWA et al., 1979). Foram adicionados 1000ml de ácido tricloroacético (TCA) a 17,5% e 1000ml de ácido tiobarbitúrico a 0,6%, pH 2,0, à 1000ml das amostras de soro e urina. As amostras de soro e urina foram diluídas em água destilada na proporção de 1/20. Em seguida, as amostras foram submetidas ao banho-maria à 100°C por 15 min. Após o resfriamento em gelo, foi adicionado TCA a 70%, seguido por um período de incubação de 20 min. A solução foi então centrifugada por 15 min a 2000RPM e a densidade óptica do sobrenadante foi lida em um comprimento de onda de 534nm por espectrofotometria. A quantidade de TBARS em nanomoles foi calculada utilizando-se um coeficiente de extinção $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os dados de TBARS urinário foram corrigidos pelo volume urinário.

4.13 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPadPrism 5*. Foram realizados o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para avaliar a normalidade de distribuição dos dados e o teste

de *Bartlett* para analisar a homogeneidade das variâncias. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* com comparações múltiplas pelo teste de *Dunn*, expressos como mediana e percentil 25 e 75, ou à análise de variância ANOVA *One-way*, seguida pelo teste de comparações múltiplas *Newman-Keuls*, e expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). Foram utilizados os testes de *Pearson* ou *Spearman* para análise das correlações. A significância estatística foi definida por $p < 0,05$.

5. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, D. et al. **Chronic exercise preserves renal structure and hemodynamics in spontaneously hypertensive rats.** *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 16, n. 2, p. 139-152, 2012.
- ALBRIGHT, A. L.; MAHAN, J. D.; WARD, K. M.; SHERMAN, W. M.; ROEHRIG, K. L. **Diabetic nephropathy in an aerobically trained rat model of diabetes.** *Med Sci Sports Exerc*, v. 27, p. 1270-1277, 1995.
- AL-TRAD, B.; ASHANKYTY, I. M.; ALARAJ, M. **Progesterone ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic Rats.** *Diabetol Metab Syndr*, v. 7, n. 97, p. 1-13, 2015.
- AMARAL, L. S. B. et al. **Renal changes in the early stages of diet-induced obesity in ovariectomized rats.** *Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, v. 63, n. 6, p. 723-732, 2014.
- AMARAL, L. S. et al. **Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats.** *Experimental Biology and Medicine*, v. 241, p. 437-445, 2016.
- ANTUS, B. et al. **Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney.** *Nephrol Dial Transplant*, v. 18, p. 54–61, 2003.
- BADAL, S. S.; FARHAD, R.; DANESH, M. D. **New Insights Into Molecular Mechanisms of Diabetic Kidney Disease.** *Am J Kidney Dis.*, v. 62, n. 202, p. S63-S83, 2014.
- BAHADIR, M. V. et al. **The potential beneficial effects of ethyl pyruvate on diabetic nephropathy: an experimental and ultrastructural study.** *Pol J Pathol*. V. 67, n. 3, p. 250-257, 2016.
- BANGSTAD, H. J. et al. **Early glomerulopathy is present in young, type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria.** *Diabetologia*, v. 36, n. 6, p. 523-529, 1993.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. **O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGES) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes.** *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.52, n. 6, p. 940-950, 2008.
- BARUTTA, F. et al. **Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment.** *Endocrine Rewiew*, 2014.
- BERGERON, R. et al. **Loss of ovarian estrogens causes only mild deterioration of glucose homeostasis in female ZDF rats preventable by voluntary running exercise.** *Horm Metab Res.*, v. 46, n. 11, p. 774-781, 2014.

BJORNSTAD, P. ; CHERNEY, D.; MAAHS, D.M. Early diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes – New Insights. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*, v. 21, n. 4, p. 279–286, 2014.

BOOR, P. et al. Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats. *Metabolism.*, v. 58, n. 11, p. 1669–1677, 2009.

BORGES, G. A.; ARAÚJO, S. F.; CUNHA, R. M. Os benefícios do treinamento resistido para portadores de diabetes mellitus tipo II. *EFDeportes.com*, v. 15, n. 151, 2010.

CHEN, L. et al. Improvement of Inflammatory Responses Associated with NF-κB Pathway in Kidneys From Diabetic Rats. *Inflammation Research*, v. 57, n. 5, p. 199–204, 2008.

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, 2005.

CHOI, S. B.; JANG, J. S.; PARK, S. Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology.*, v. 146, n. 11, p. 4786–4794, 2005.

CHOW, F. Y. et al. Macrophages in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy: potential role in renal fibrosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 19, n. 12, p. 2987–2996, 2004.

CIAMPONE, S. et al. Long-Term Exercise Attenuates Blood Pressure Responsiveness and Modulates Kidney Angiotensin II Signalling and Urinary Sodium Excretion in SHR. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, v. 12, n. 4, p. 394–403, 2011.

CLAUSEN, J. O.; KLAUSEN, K.; RASMUSSEN, B.; TRAP-JENSEN, J. Central and peripheral circulatory changes after training of the arms or legs. *Am J. Physiol.* v. 225, p. 675–682, 1973.

CLOTET, S. et al. Ras and sex differences in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 2016.

COIMBRA, T. M. et al. Early Events Leading to Renal Injury in Obese Zucker (fatty) Rats with Type II Diabetes. *Kidney international*, v. 57, n. 1, p. 167–182, 2000.

CONTI, F. F. et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 309, p. R1532–R1539, 2015.

DAVY, B. M. et al. Resist diabetes: A randomized clinical trial for resistance training maintenance in adults with prediabetes. *PLoS ONE*, v. 12, n. 2, 2017.

DEBEVEC, T.; MILLET, G. P.; PIALOUX, V. Hypoxia-Induced Oxidative Stress Modulation with Physical Activity. *Frontiers in Physiology*, v. 8, n. 84, February 2017.

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

DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al. **Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women.** *J Appl Physiol* (1985), v. 107, n. 5, p. 1381–1388, 2009.

DIXON, A.; MARIC, C. **17 β -Estradiol Attenuates Diabetic Kidney Disease by Regulating Extracellular Matrix and Transforming Growth Factor- β Protein Expression and Signaling.** *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 293, n. 5, p. 1678-1690, 2007.

DUBEY, R. K.; JACKSON, E. K. **Estrogen-Induced Cardiorenal Protection: Potential Cellular, Biochemical, and Molecular Mechanisms.** *American Journal of Physiology*. v. 280, p. 365-388. 2001.

EISENBARTH, G. S. **Banting Lecture 2009: An Unfinished Journey: Molecular Pathogenesis to Prevention of Type 1A Diabetes.** *Diabetes*, v. 59, n. 4, p. 759–774, 2010 Apr.

ELLIOT, S. J. et al. **Estrogen Deficiency Accelerates Progression of Glomerulosclerosis in Susceptible Mice.** *American Journal of Pathology*, v. 162, n. 5, May 2003.

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, 443-449, 2016.

FURUKAWA, M. et al. **Pathogenesis and Novel Treatment from the Mouse Model of Type 2 Diabetic Nephropathy.** *The ScientificWorld Journal*, 2013.

GAWRECKI, A. et al. **High-intensity Exercise in Men with Type 1 Diabetes and Mode of Insulin Therapy.** *Int J Sports Med.*, 2017

GHORBANZADEH, V. et al. **Protective effect of crocin and voluntary exercise against oxidative stress in the heart of high-fat diet-induced type 2 diabetic rats.** *Physiol Int.*, v. 103, n. 4, p. 459-468, 2016 Dec.

GOLDIN, A. et al. **Advanced Glycation End Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury.** *Circulation.*, v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006.

GOMES, I. B. S. et al. **The protective effects of or allowdose quercetin on diabetic nephropathy in hypercholesterolemic mice.** *Original Research*, v. 6, n. 247, 2015.

GUIMARÃES, J. et al. **NEFROPATIA DIABÉTICA: Taxa de Filtração Glomerular Calculada e Estimada.** *Acta Med Port*, v. 20, p. 145-150, 2007.

GUSMÃO, L.; GALVÃO, J.; POSSANTE, M. **A resposta do rim ao esforço físico.** *Rev Port Nefro Hipert.* v. 17, p. 73-80, 2003.

HAYGEN, H. N. **The determination of “endogenous creatinine” in plasma and urine.** *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 5, p.48–57, 1953.

HENRY, D. N. et al. **Glucose Transporters Control Gene Expression of Aldose Reductase, PKC α , and GLUT1 in Mesangial Cells in Vitro.** American Journal of Physiology-Renal Physiology, v. 277, n. 1, p. F97-F104, 1999.

HIRAKAWA, Y.; TANAKA, T.; NANGAKU, M. **Mechanisms of metabolic memory and renal hypoxia as a therapeutic target in diabetic kidney disease.** J DIABETES INVESTIG., 2017.

HOLDERIED, A. et al. **Glomerular parietal epithelial cell activation induces collagen secretion and thickening of Bowman's capsule in diabetes.** Laboratory Investigation, v. 95, p. 273–282, 2014.

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, 2015.

ISHIKAWA, Y. et al. **Effect of Exercise on Kidney Function, Oxidative Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetic KK-Ay Mice.** Hindawi Publishing Corporation Experimental Diabetes Research, 2012.

JAFAR, T. H. et al. **The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis.** Nephrol Dial Transplant, v. 18, n. 10, p. 2047-2053, 2003.

KARANOVIC, D. et al. **Effects of single and combined losartan and tempol treatments on oxidative stress, kidney structure and function in spontaneously hypertensive rats with early course of proteinuric nephropathy.** PLoS One., v. 11, n. 8, 2016.

KAZEMI, S. et al. **Evaluating the effectiveness of peer-based intervention in managing type I diabetes mellitus among children and adolescents: A systematic review.** Med J Islam Repub Iran, v. 30, n. 442, 2016 November.

KECK, M. et al. **Hormonal Status Affects the Progression of STZ-induced Diabetes and Diabetic Renal Damage in the VCD Mouse Model of Menopause.** American Journal of Physiology – Renal Physiology, v. 293, n. 1, p. 193-199, 2007.

KRETZSCHMAR, J. et al. **A standardized exercise intervention differentially affects preand post-menopausal African American women.** Menopause, v. 21, n.6, p. 579–584, 2014 June.

KUNASEGARAN, T. et al. **Quercetin and pioglitazone synergistically reverse endothelial dysfunction in isolated aorta from fructose-streptozotocin (F-STZ)-induced diabetic rats.** Eur J Pharmacol., v. 799, p. 160-170, 2017 Mar .

KUPFER, R. et al. **Predictors of subclinical atherosclerosis evaluated by carotid intima-media thickness in asymptomatic young women with type 1 diabetes mellitus.** Arch Endocrinol Metab.2017.

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, p. 294-299, 2010.

- LAGRANHA, C. J. et al. **Bases moleculares da glomerulopatia diabética.** Arq Bras Endocrinol Metab, v. 51, n. 6, p. 901-912, 2007.
- LARON-KENET, T. et al. **Mortality of patients with childhood onset (0-17 years) Type I diabetes in Israel: a population-based study.** Diabetologia, 44 Suppl 3, p.B81-86, 2001.
- LEWERS, D. T. et al. **Long-term follow-up of renal function and histology after acute tubular necrosis.** Ann.Intern.Med., v. 73, p. 523 – 529, 1970.
- LI, W.; HUANG, E.; GAO, S. **Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review.** J Alzheimers Dis., 2017.
- LIANG, H. **Renal Protective Effects of a Diet and Exercise Intervention in Type 2 Diabetic Rats.** Biol Res Nurs., v. 18, n. 1, p. 76-81, 2016.
- LIN, C. T. et al. **Menstrual Disturbances in Premenopausal Women with End-Stage Renal Disease: A Cross-Sectional Study.** Med Princ Pract, v. 25, p. 260–265, 2016.
- LUZAK, A. et al. **Physical activity levels, duration pattern and adherence to WHO recommendations in German adults.** PLoS ONE, v. 12, n. 2, 2017.
- MACHADO, V. S. S. et al. **Morbidades e fatores associados em mulheres climatéricas: estudo de base populacional em mulheres com 11 anos ou mais de escolaridade.** Rev Bras Ginecol Obstet.. v. 34, n. 5, p. 215-220, 2012.
- MANKHEY, R. W.; BHATTI, F.; MARIC, C. **17β-Estradiol Replacement Improves Renal Function and Pathology Associated with Diabetic Nephropathy.** American Journal of Physiology-Renal Physiology, v. 288, n. 2, p. F399-F405, 2005.
- MARIC, C.; SULLIVAN, M. D. S. Estrogens and the Diabetic Kidney, **Gender Medicine**, v. 5, Suppl.A, p. 103 – 113, 2008.
- MARIC, C. **Sex, diabetes and the kidney.** Am J Physiol Renal Physiol, v. 296, p. 680-688, 2009.
- MATSHIPI, M.; MONYEKI, K. D.; KEMPER, H. **The relationship between physical activity and plasma glucose level amongst ellisras rural young adult males and females: ellisras longitudinal study.** Int J Environ Res Public Health, v. 14, n. 2, 2017.
- MENDE, R. S.; BREGMAN, R. **Avaliação e metas do tratamento da proteinúria.** Rev Bras Hipertens, v. 17, n. 3, p. 174-177, 2010.
- MENON, M. C.; CHUANG, P. Y.; HE, C. J. **The Glomerular Filtration Barrier: Components and Crosstalk.** International Journal of Nephrology, v. 2012, p. 1-9, 2012.
- MIYAGI, M. Y. S. et al. **Long-Term Aerobic Exercise Protects against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Modulating the Expression of IL-6 and HO-1.** PloS one, v. 9, n. 10, p. e108543, 2014.
- MIYATA, T. et al. **Renal Catabolism of Advanced Glycation End Products: the Fate of Pentosidine.** Kidney International, v. 53, n. 2, p. 416-422, 1998.

MOTAWI, T. M. K. ET AL. **Genetic polymorphism of estrogen receptor alpha gene in Egyptian women with type II diabetes mellitus.** *Meta Gene.*, v.6, p. 36–41, 2015.

MURUSSI, M. et al. **Detecção Precoce da Nefropatia Diabética.** *Arq Bras Endocrinol Metab.*,v. 53, n. 3, p. 442-451, 2008.

NEUGARTEN, J.; ACHARYA, A.; SILBIGER, S. R. **Effect of Gender on the Progression of Nondiabetic Renal Disease a Meta-Analysis.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 11, n. 2, p. 319-329, 2000.

NEUGARTEN, J.; GOLESTANEH, L. **Gender and the prevalence and progression of renal disease.** *Adv Chronic Kidney Dis.*, v. 20, n. 5, p. 390- 395, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem.* v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OHTA, T. et al. **Gender Differences in Metabolic Disorders and Related Diseases in Spontaneously Diabetic Torii-*Leprfa* Rats.** *Journal of Diabetes Research*, 2014.

OKUMURA, F.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica.** *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 832-836, 2004.

ORDÓÑEZ, P.; MORENO, M.; ALONSO, A.; LLANEZA, P.; DÍAZ, F.; GONZÁLEZ, C. **17β-Estradiol and/or progesterone protect from insulin resistance in STZ-induced diabetic rats.** *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v.111, p. 287-294, 2008.

ORTOLAN, M. D. D. V. et al. **Avaliação morfológica dos túbulos contorcidos proximais de ratos diabéticos tratados com neem (*Azadirachta indica* A. Juss) e estrepto-zootocina 6 ch.** *Revista da FZVA. Uruguaiana*, v.18, n. 2, p. 81-100. 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. **Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease.** *Physiol Rev.*, v.87, n.1, p. 315–424, 2007

PARK, C. W. **Diabetic Kidney Disease: From Epidemiology to Clinical Perspectives.** *Diabetes & metabolism journal*, v. 38, n. 4, p. 252-260, 2014.

PALM, F. et al **Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension.** *Diabetologia*, v. 46, n. 8, p. 1153-1160, 2003 Jul.

PEERI, M. et al. **Protective Effect of Aerobic Exercise Against L-NAME-Induced Kidney Damage in Rats.** *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju*, v. 64, n. 2, p. 229-235, 2013.

PEREIRA, E. R. S. ET AL. **Prevalência de doença renal crônica em adultos atendidos na Estratégia de Saúde da Família.** *Bras Nefrol.*, v. 38, n. 1, p. 22-30, 2016.

PÉREZ-TORRES, Israel et al. **Association of Renal Damage and Oxidative Stress in a Rat Model of Metabolic Syndrome. Influence of Gender.** *Free Radical Research*, v. 43, n. 8, p. 761-771, 2009.

POULOS, T. L.; LI, H. **Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design.** Nitric Oxide., v. 63, p. 68-77, 2017.

POURGHASEM, M.; SHAFI, H.; BABAZADEH, Z. **Histological changes of kidney in diabetic nephropathy.** Caspian J Intern Med., 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.

QUINTEIRO, H. et al. **Aerobic exercise training promotes additional cardiac benefits better than resistance exercise training in postmenopausal rats with diabetes.** Menopause., v. 22, n. 5, p. 534-41, 2015 May.

RIAZI, S.; MARIC, C.; ECELBARGER, C. A. **17- β Estradiol attenuates streptozotocin-induced diabetes and regulates the expression of renal sodium transporters.** Kidney International, v. 69, p. 471–480, 2006.

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.

RODRIGUEZ, M. P. et al. **Nitric Oxide Affects UbcH10 Levels Differently in Type 1 and Type 2 Diabetic Rats.** J Surg Res., v. 196, n. 1, p. 180–189, 2016 June.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B. et al. **Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all.** American Journal Physiology Renal Physiology, v. 286, n. 4, p. 606-616, 2004.

ROSSATO, M. et al. **Efeito de um treinamento combinado de força e endurance sobre componentes corporais de mulheres na fase de perimenopausa.** Rev Port Cien Desp., v. 7, n. 1, p. 92–99, 2007.

ROSSI, L. et al. **Urinary excretion of kidney aquaporins as possible diagnostic biomarker of diabetic nephropathy.** Journal of Diabetes Research, 2017.

RYBA-STANISBAWOWSKA, M. et al. **IVS1 –397T>C estrogen receptor α polymorphism is associated with low-grade systemic inflammatory response in type 1 diabetic girls.** Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation, v. 2014.

SABU, M. C.; KUTTAN, R. **Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property.** J Ethnopharmacol., v. 81, n. 2, p. 155-160, 2002.

SAITO, T. et al. **The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the coadministration of protamine.** Kidney International, v. 32, p. 691–699, 1987.

SALEH, M. A. et al. **Free radical scavenging decreases endothelin-1 excretion and glomerular albumin permeability during type 1 diabetes.** Physiol Rep, 4 (24), 2016.

SANCHES, I. C. et al. **Impact of combined exercise training on cardiovascular autonomic control and mortality in diabetic ovariectomized rats.** J Appl Physiol, v. 119, p. 656–662, 2015.

SARTORI-VALINOTTI, J. C. et al. **Sex Differences in the Pressor Response to**

Angiotensin II when the Endogenous Renin-Angiotensin System is Blocked. Hypertension, v. 51, n. 4, p. 1170-1176, 2008.

SCHMATZ, R. et al. **Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats.** Biochimie, v. 94, p. 374-383, 2012.

SCHULTZ, C. J. et al. **Microalbuminuria prevalence varies with age, sex, and puberty in children with type 1 diabetes followed from diagnosis in a longitudinal study. Oxford regional prospective study group.** Diabetes Care, v. 22, n. 3, p. 495-502, 1999 Mar.

SHARIFI, N.; JALILI, L.; KHAZAEIAN, S.; NAYEBI, A. S. **The Relationship between Physical Activity and General Health among Menopausal Women in Ahvaz, Iran.** Electronic Physician, v. 9, n. 2, p. 3639-3645, February 2017.

SHARMA, K.; MCGOWAN, T. A. **TGF- β in Diabetic Kidney Disease: Role of Novel Signaling Pathways.** Cytokine & Growth Factor Reviews, v. 11, n. 1, p. 115-123, 2000.

SHIH, W.; HINES, W. H.; NEILSON, E. G. **Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis.** Kidney International, v. 33, p. 1113-1118, 1988.

SHIRAISHI, F. G. et al. **Inflammation, Diabetes, and Chronic Kidney Disease: Role of Aerobic Capacity.** Experimental Diabetes Research, 2012.

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. e48826, 2012.

SLYVKA, Y. et al. **Antioxidant Diet and Sex interact to regulate NOS Isoform Expression and Glomerular Mesangium Proliferation in Zucker Diabetic Rat Kidney.** Acta Histochem., v. 118, n. 2, p. 183-193, 2016 March.

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.

SOUZA, M. A. et al. **Polimorfismo do gene do receptor estrogênico como fator de risco do câncer de mama.** Femina, v. 40, n. 4, 2012.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. **Animal models in type 2 diabetes research: An overview.** Indian J Med Res, V. 125, p. 451-472, 2007.

STEFANSKA, A.; BERGMANN, K.; SYPNIEWSKA, G. **Metabolic Syndrome and Menopause: Pathophysiology, Clinical and Diagnostic Significance.** Adv Clin Chem., v. 72, p.1-75. 2015.

STIEGER, N.; WORTHMANN, K.; SCHIFFER, M. **The Role of Metabolic and Haemodynamic Factors in Podocyte Injury in Diabetes.** Diabetes/Metabolism Research and Reviews, v. 27, n. 3, p. 207-215, 2011.

SUAREZ, M. L. G. et al. **Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy?** World J Diabetes, v. 4, n. 6, p. 245-255, 2013 Dec.

SZTEJNSZNAJD, C. et al. **Estrogen treatment improves arterial distensibility, fibrinolysis, and metabolic profile in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus.** *Metabolism.*, v. 55, n. 7, p. 953-959, 2006 Jul.

TAIROVA, O. S.; LORENZI, D. R. S. de **Influência do exercício físico na qualidade de vida de mulheres na pós-menopausa: um estudo caso-controle.** *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.*, v.14, n. 1, p. 135-145, 2011.

TANG, S. et al. **Maresin 1 Mitigates High Glucose-Induced Mouse Glomerular Mesangial Cell Injury by Inhibiting Inflammation and Fibrosis.** *Mediators of Inflammation*, 2017.

THROCKMORTON, D. C. et al. **PDGF and TGF-Bold Beta Mediate Collagen Production by Mesangial Cells Exposed to Advanced Glycosylation End Products.** *Kidney International*, v. 48, p. 111-117, 1995.

TIKKANEN-DOLENC, H.; WADÉN, J.; FORSBLOM, C.; HARJUTSALO, V.; THORN, L. M.; SARAHEIMO, M.; ELONEN, N.; ROSENGÅRD-BÄRLUND, M.; GORDIN, D.; TIKKANEN, H. O.; GROOP, P. H. **Frequent and intensive physical activity reduces risk of cardiovascular events in type 1 diabetes.** *Diabetologia*, v. 60, n. 3, p. 574–580, March 2017.

TREVISAN, R.; BARNES, D. J.; VIBERTI, G. **Pathogenesis of Diabetic Nephropathy.** In: John Pickup J, Williams J. *Text Book of Diabetes*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, p. 52.1-52.21, 1997.

TURKSOY, K. et al. **Classification of physical activity information to artificial pancreas control systems in real time.** *J. Diabetes Sci Technol.*, v. 0, n. 6, 1200-1207, 2015.

ULAS, M.; CAY, M **17β-Estradiol and vitamin E modulates oxidative stress induced kidney toxicity in diabetic ovariectomized rat.** *Biol Trace Elem Res.*, v. 144, n. 1-3, p. 821-831, 2011 Dec.

UYANIK, A. et al. **The effects of polymicrobial sepsis with diabetes mellitus on kidney tissues in ovariectomized rats.** *Renal Failure*, v. 32, n.5, p. 592-602, 2010.

VEELKEN, R. et al. **Nitric Oxide Synthase Isoforms and Glomerular Hyperfiltration in Early Diabetic Nephropathy.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 11, n. 1, p. 71-79, 2000.

VOLPINI, R. A. et al. **Effect of Enalapril and Losartan on the Events That Precede Diabetic Nephropathy in Rats.** *Diabetes/ Metabolism Research and Reviews*, v. 19, n. 1, p. 43-51, 2003.

WANG, J. et al. **Effects of iodinated contrast agents on renal oxygenation level determined by blood oxygenation level dependent magnetic resonance imaging in rabbit models of type 1 and type 2 diabetic nephropathy.** *BMC Nephrology*, v. 15, n. 140, 2014.

YUKITAKE, H.; TAKIZAWA, M.; KIMURA, H. **Macrophage Migration Inhibitory Factor as an Emerging Drug Target to Regulate Antioxidant Response Element System.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.

ZAMBON, L. et al. **Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos.** Revista de Nutrição, v. 22, n. 5, p. 707-715, 2009.

ZANESCO, A.; ZAROS, P. R. **Exercício físico e menopausa.** Rev Bras Ginecol Obstet., v. 31, n. 5, p. 254-261, 2009.

CAPÍTULO 1

Estudo das alterações renais e estresse oxidativo em ratas ovariectomizadas com diabetes *mellitus* tipo 1: Efeito do exercício físico moderado.

Mayane Oliveira R. da Silveira¹, Lilianny S. B. Amaral¹, Samira Itana de Souza¹, Halanna Rocha Ferraz¹, Jéssica A. Dias¹, Edilene C. Rocha¹, Amélia Cristina M. Magalhães¹, Telma J. Soares¹

¹Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, BA, Brasil.

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, Brazil. Tel: 55-77-3429-2710; Fax: 55-77-3429-2709; email: tesoares@ufba.br

Título curto: Ovariectomia e exercício no rim diabético

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos do exercício físico aeróbico de intensidade moderada e progressiva sobre a função, estrutura renal e estresse oxidativo em ratas ovariectomizadas com diabetes *mellitus* do tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ). Dezoito ratas *Wistar* foram divididas em 3 grupos: CSO – ratas controles sedentárias ovariectomizadas; DSO – ratas diabéticas sedentárias ovariectomizadas; e DTO – ratas diabéticas treinadas ovariectomizadas. Após a indução do diabetes, o grupo DTO realizou oito semanas de exercício. Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento foram coletadas amostras de urina. As amostras de sangue e os rins foram retirados, após a eutanásia, para análise de função renal, histologia, morfometria e estresse oxidativo. Nossos resultados demonstram redução do ganho de peso, aumento do peso do rim e da glicemia pós-prandial nas ratas diabéticas. Contudo, o exercício diminuiu a glicosúria e preveniu a proteinúria nas ratas do grupo DTO. A glomeruloesclerose segmentar focal (GESF), a área do tufo dos glomérulos justamedulares, as lesões túbulo-intersticiais (LTI), a perda de borda em escova e o debridamento das células tubulares foram reduzidos nas ratas DTO. O exercício físico diminuiu também as concentrações urinárias e plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os nossos resultados demonstram efeito benéfico do exercício físico sobre a proteinúria, glicosúria e a estrutura renal em ratas diabéticas ovariectomizadas, que pode estar sendo mediado, em parte, pela redução do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 1. Ovariectomia. Rim. Exercício físico.

Introdução

As complicações crônicas do diabetes *mellitus* (DM) atingem principalmente os sistemas cardiovascular e renal, sendo a nefropatia diabética a principal complicação e causa de morte entre os pacientes portadores do diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) (Maric e Sullivan, 2008).

Os estágios iniciais da nefropatia diabética são caracterizados por alterações na função e estrutura renal, incluindo hiperfiltração glomerular, expansão mesangial, hipertrofia renal adaptativa e microalbuminúria (Bangstad et al., 1993; Sharma e McGowan, 2000; Volpini et al., 2003). Com a progressão da doença, a perda da seletividade da barreira de filtração e redução da superfície filtrante resultam em densa proteinúria e progressiva queda da taxa de filtração glomerular (TFG) (Trevisan et al., 1997). Os processos fisiopatológicos renais ocorrem principalmente nos glomérulos, caracterizados por expansão da matriz mesangial, espessamento da membrana basal glomerular e lesão dos podócitos (Bangstad et al., 1993; Coimbra et al., 2000). Contudo, o estado hiperglicêmico crônico também provoca alterações morfológicas nos túbulos renais (Barutta et al., 2014).

O estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos envolvidos no surgimento e progressão dos distúrbios renais induzidos pelo diabetes (Palm et al., 2003). A hiperglicemia induz aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e alterações na estrutura renal, sugerindo que essa via pode estar associada ao desenvolvimento das lesões renais (Mansouri et al., 2011; Punaro et al., 2014; Fernandes et al., 2016). Saleh e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com o antioxidante induziu menor excreção urinária de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), menor produção de superóxido glomerular e excreção de endotelina 1 urinária em ratos com DM1 induzido por estreptozotocina (STZ).

Estudos demonstram uma importante influência dos hormônios sexuais sobre a incidência e progressão das doenças renais, apontando os estrógenos como um fator renoprotetor, tanto em

animais experimentais, quanto em mulheres em idade fértil (Neugarten et al., 2000; Keck et al., 2007; Pérez-Torres et al., 2009). A ovariectomia induz albuminúria, aumento do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), proteínas estruturais glomerulares, severa glomeruloesclerose e fibrose túbulo-intersticial (Mankhey et al., 2005). Contudo, os estudos são controversos quanto à modulação dos hormônios sexuais femininos sobre as alterações renais induzidas pelo diabetes principalmente no período da pós-menopausa.

O exercício aeróbico tem sido relacionado à prevenção de doenças crônicas (Pedersen, 2006; Coelho, Burine, 2009), incluindo o diabetes *mellitus* (Bortolon et al., 2012, Huebschmann et al., 2015). Os mecanismos desse efeito protetor sobre as doenças renais, sobretudo sobre a doença renal diabética, não estão totalmente esclarecidos (Gusmão et al., 2003; Najas et al., 2009). Contudo, evidências indicam que o exercício melhora o controle glicêmico (Silva et al., 2012), aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Rodrigues et al., 2011), reduz a inflamação (Agarwal et al., 2012), o estresse oxidativo (Peeri et al., 2013) e a apoptose celular (Miyagi *et al.* 2014), além de modular benéficamente o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) (Ciampone et al., 2011).

Nesse sentido, o nosso estudo avaliou os efeitos do exercício físico moderado e progressivo sobre as alterações oxidativas e de função e estrutura renal induzidas pelo diabetes *mellitus* na ausência dos hormônios sexuais femininos.

Materiais e Métodos

Animais

Dezoito ratas *Wistar* com 10 semanas de idade e peso corporal em torno de 180 a 200 gramas foram mantidas em ciclo de claro/escuro e temperatura $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, com livre acesso à água e ração. Os animais foram divididos em três grupos experimentais com seis animais em cada grupo: CSO – ratas controles sedentárias ovariectomizadas; DSO – ratas diabéticas

sedentárias ovariectomizadas; e DTO – ratas diabéticas treinadas ovariectomizadas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal Experimental do IMS/CAT/UFBA com protocolo de nº 008/2013. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as recomendações do guia nacional de criação para o controle da experimentação animal (CONCEA) no Brasil.

Procedimento Cirúrgico e Indução do Diabetes

As ratas foram anestesiadas com Xilazina (6mg/kg) e Ketamina (40mg/kg), via intraperitoneal, e submetidas a cirurgia de ovariectomia bilateral (Amaral et al., 2014). Após sete dias de recuperação cirúrgica, o diabetes foi induzido por uma única injeção intravenosa de STZ (40mg/kg), diluída em tampão citrato 0,1M. O grupo controle recebeu dose única intravenosa do veículo, tampão citrato 0,1M. Uma semana após a injeção de STZ ou veículo, a glicose sanguínea de jejum (GSJ) foi mensurada, e aqueles animais que receberam STZ cujo valor da glicemia de jejum estava acima de 250mg/dL foram considerados diabéticos. Todos os animais foram eutanasiados 10 semanas após a indução do diabetes (Amaral et al., 2016).

Teste de Corrida Máxima e Protocolo de Treinamento

Os testes de corrida máxima foram realizados no início, com 4 semanas e no final do experimento com o objetivo de avaliar a capacidade física dos animais e/ou ajustar a intensidade do exercício conforme método descrito por Amaral e colaboradores (2016). O treinamento para o grupo DTO consistiu de corrida em esteira com 0% de inclinação, 5 dias por semana, 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 do exercício também foi progressivamente aumentada de 55-70% da capacidade máxima atingida pelo animal no teste de corrida máxima, acrescentando mais

5% a cada semana (Souza et al., 2007; Rodrigues et al., 2011; Silva et al., 2012). Uma semana após a indução do diabetes, o grupo DTO foi submetido ao protocolo de treinamento durante um período de 8 semanas (Fig. 1).

Peso Corporal, Índice Uterino e Peso do Rim

O ganho de peso corporal dos animais foi determinado semanalmente e avaliado pelo delta peso (Zambom et al., 2009). Após a eutanásia, o útero das ratas foi removido e pesado para determinação do índice uterino e verificação da atrofia uterina. Os rins foram também removidos, pesados e fixados para estudos histológicos. O peso do rim foi avaliado pela média do peso do rim esquerdo e direito.

Pressão Arterial, Glicemia Pós-Prandial e Glicosúria

A pressão arterial foi mensurada no final de cada semana, antes das sessões de exercício, pelo método de pletismografia de cauda (LE 5001 Electro-Esfigmomanômetro - Panlab, Espanha). As mensurações foram realizadas com os animais conscientes e pré-aquecidos a 37°C durante 5 min, em ambiente tranquilo e livre de ruídos. Devido ao estado debilitado das ratas diabéticas, não foi possível realizar o teste de glicemia de jejum. Por isso, o perfil glicêmico das ratas foi avaliado pela glicemia pós-prandial com o sangue do tronco colhido imediatamente após a eutanásia. Tanto a glicemia pós-prandial como a glicosúria foram determinadas por método colorimétrico utilizando um analisador bioquímico automático (Abbott Diagnostics C.4100 - Saint-Laurent, Quebec, Canadá).

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 sódio e potássio. A análise de creatinina nas amostras de sangue e urina foi realizada pelo método de Jaffé (Haygen, 1953). A taxa de filtração glomerular (TFG) foi determinada pelo *Clearance* de creatinina. As dosagens de sódio e potássio foram realizadas por fotometria de chama (Mod. 910, *Analyser*, São Paulo, Brasil) e calculadas as frações de excreção desses íons. O fluxo urinário foi determinado pelo volume total de urina em 24 horas. A quantificação da proteína urinária foi realizada pelo método colorimétrico, utilizando o *kit* comercial *Sensiprot (Labtest®*, MG, Brasil).

Morfologia Renal

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 parafinado, cortado em fatias de 4 µm de espessura e corado com Ácido Periódico *Shift* (PAS) para avaliação do glomérulo e Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação do compartimento túbulo-intersticial.

Índice Glomeruloesclerótico (IGE)

A glomeruloesclerose segmentar focal foi determinada pelo IGE através da análise em microscópico óptico de 100 glomérulos do córtex renal dos animais através de escores que refletem as alterações caracterizadas por aumento da matriz mesangial, obliteração e dilatação dos vasos. Foi utilizado o método semi-quantitativo de Saito e colaboradores (1987) usando o escore 0, glomérulo normal; escore 1, área esclerótica até 25% (esclerose mínima); escore 2, área esclerótica de 25 a 50% (esclerose moderada); escore 3, área esclerótica de 50 a 75% (esclerose moderada a severa); escore 4, área esclerótica de 75% a 100% (esclerose severa). O IGE foi calculado segundo a fórmula: $IGE = (1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) + (4 \times n4) / nT$,

onde n1 representa o número de glomérulos com escore 1, n2 representa o número de glomérulos com escore 2, n3 representa o número de glomérulos com escore 3 e n4 representa o número de glomérulos com escore 4 e nT representa o número total de glomérulos avaliados.

Análise Morfométrica Glomerular

A análise morfométrica glomerular foi feita pela medida da área do tufo glomerular. A análise do espaço capsular foi feita pela medida do corpúsculo renal subtraída da área do tufo glomerular. Ambas as análises foram feitas em 30 glomérulos da região cortical e 20 da região justamedular de cada animal. As imagens foram obtidas pela microscopia de luz captadas por meio de vídeo-câmera conectada a um analisador de imagens (*Olympus BX51 - Japan*) utilizando a objetiva de 40X. A área foi delimitada manualmente e determinada por morfometria computadorizada através de um *software (Image J)*.

Lesões Túbulo-intersticiais

A avaliação das lesões túbulo-intersticiais (LTI) foi realizada em 30 campos corticais/animal caracterizadas por dilatação, achatamento, perda de borda em escova, debridamento e presença de degeneração hidrópica. Essas alterações foram quantificadas por escore semiquantitativo, utilizando escore 0: nenhuma lesão; escore 0,5: pequenas áreas de lesões discretas e focais; escore 1: lesão atingindo uma área < 10% do córtex; escore 2: lesão atingindo uma área de 10-25%; escore 3: lesão atingindo uma área de 25-75% e escore 4: lesão extensa e difusa atingindo uma área > que 75% (Shih et al., 1988). A outra análise foi quantitativa da porcentagem de cada tipo de lesão por animal.

Estresse Oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo, foram determinadas as concentrações plasmáticas e urinárias de TBARS. O TBARS urinário foi corrigido pelo volume urinário de 24h. Para isso foi utilizando o ensaio do ácido tiobarbitúrico (Ohkawa et al., 1979). A solução foi lida em um comprimento de onda de 534nm por espectrofotometria.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPadPrism 5*. Foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para avaliar a normalidade de distribuição dos dados e o teste de *Bartlett* para analisar a homogeneidade das variâncias. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* com comparações múltiplas pelo teste de *Dunn*, e expressos como mediana e percentil 25 e 75, ou à análise de variância ANOVA *One-way*, seguida pelo teste de comparações múltiplas *Newman-Keuls*, e expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). Foram utilizados os testes de *Pearson* ou *Spearman* para análise das correlações. A significância estatística foi definida por $p < 0,05$.

Resultados

Peso Corporal, Índice Uterino e Peso do Rim

As ratas diabéticas demonstraram diminuição significativa do ganho de peso corporal comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 1). Todas as ratas apresentaram redução do peso uterino, avaliado pelo índice uterino, indicando atrofia do útero devido à redução nos níveis circulantes de hormônios ovarianos (Tabela 1). Quanto ao peso do rim, houve aumento significativo nos grupos diabéticos quando comparado ao controle ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Pressão Arterial, Glicemia Pós-Prandial e Glicosúria

Os nossos resultados não demonstraram alterações significativas na pressão arterial sistólica,

diastólica e média, bem como na frequência cardíaca. A glicemia pós-prandial foi elevada nos grupos DSO ($p<0,05$) e DTO ($p<0,01$) quando comparados ao controle. As ratas dos grupos DSO ($p<0,001$) e DTO ($p<0,01$) apresentaram aumento significativo da glicosúria. Contudo, o exercício físico diminuiu a glicosúria nas ratas do grupo DTO ($p<0,05$) (Tabela 1).

Função Renal

Todas as ratas diabéticas ovariectomizadas, sedentárias ou treinadas, demonstraram aumentos significativos do fluxo urinário ($p<0,01$) e das frações de excreção de sódio e potássio, ($p<0,05$), quando comparados às ratas controle (Tabela 2). A proteinúria estava elevada somente no grupo DSO em relação ao controle ($p<0,001$). Portanto, o exercício físico reverteu a proteinúria nas ratas do grupo DTO comparada ao grupo DSO ($p<0,05$) (Tabela 2). Não foram observadas alterações significativas na concentração de creatinina plasmática e da TFG entre os grupos experimentais.

Histologia e Morfometria Renal

As ratas diabéticas dos grupos DSO e DTO apresentaram aumentos significativos da GESF determinada pelo índice glomerulosclerótico (IGE), em relação ao grupo controle ($p<0,001$). O exercício físico reduziu o IGE nas ratas do grupo DTO comparado ao grupo DSO ($p<0,05$) (Tabela 3). A GESF foi caracterizada por dilatação e obliteração dos capilares glomerulares, e aumento da matriz mesangial, como demonstrado nos cortes histológicos (Fig. 2A, 2B, 2C). A análise da correlação demonstrou que a proteinúria ($r=0,7112$, $p<0,01$) foi positivamente correlacionada ao índice glomerulosclerótico (Fig. 3C). A análise morfométrica do tufo glomerular de glomérulos corticais mostrou aumento significativo da área do tufo glomerular nos grupos diabéticos quando comparados ao grupo controle ($p<0,01$). A área do tufo glomerular da região justamedular foi elevada somente nas ratas do grupo DSO ($p<0,001$).

Portanto, o exercício físico reverteu esse aumento da área do tufo glomerular da região justamedular nas ratas do grupo DTO comparada ao grupo DSO ($p < 0,01$) (Tabela 3). Foi observado aumento da área do espaço da cápsula de *Bowman*, tanto de glomérulos corticais como justamedulares somente nas ratas do grupo diabético sedentário quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 3).

As lesões túbulo-intersticiais estavam mais intensas no córtex renal das ratas DSO ($p < 0,01$) e DTO ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle. No grupo DTO, as lesões foram atenuadas pelo exercício quando comparado ao grupo DSO ($p < 0,05$) (Tabela 3; Fig. 2D, 2E, 2F). A análise estratificada dessas lesões revelou aumento significativo da degeneração hidrópica/ vacuolização, da perda de borda em escova, dilatação e achatamento das células tubulares, debridamento e necrose, nas ratas DSO em relação ao controle. No grupo DTO, a dilatação/ achatamento e necrose das células tubulares estavam elevadas quando comparadas ao controle. O exercício físico reduziu a perda de borda em escova e o debridamento nas ratas do grupo DTO em relação ao DSO ($p < 0,05$) (Tabela 3, Fig. 2F).

Dosagens de TBARS Plasmático e Urinário

O exercício reduziu a concentração de TBARS plasmático no grupo DTO quando comparado ao grupo DSO ($p < 0,05$) (Figura 3A). Os níveis de TBARS urinário estavam elevados somente nas ratas DSO ($p < 0,05$). O exercício físico reverteu os níveis de TBARS urinário nas ratas DTO em relação ao grupo DSO ($p < 0,05$) (Figura 3B). Foi observada também correlação positiva ($r = 0,6408$ e $p < 0,05$) entre a proteinúria e os níveis de TBARS urinário, desse modo, quanto maior o TBARS urinário, maior o nível de proteinúria (Figura 3D).

Discussão

Neste estudo, analisamos o efeito do exercício físico de intensidade moderada e progressiva sobre as alterações de função e estrutura renal e do estresse oxidativo em ratas ovariectomizadas com DM1 induzido por STZ. Nossos dados demonstram que o exercício aeróbico moderado reduziu a glicosúria, proteinúria, glomeruloesclerose segmental focal, área do tufo dos glomérulos justamedulares, as lesões túbulo-intersticiais, com melhora significativa da perda de borda em escova e debridamento das células tubulares. Além disso, o exercício reduziu o estresse oxidativo avaliado pelo TBARS plasmático e urinário. Esses benefícios foram observados sem nenhum tratamento farmacológico, o que comprova a efetividade do exercício como medida terapêutica.

A eficácia da ovariectomia foi comprovada pela redução do volume e peso do útero em todas as ratas ovariectomizadas demonstrando que a deficiência do estrógeno promove gradativa involução do endométrio (Camargo et al., 2011). A ovariectomia pode também induzir aumento do peso em ratas não diabéticas quando comparado a ratas intactas (Mankhey et al., 2005). No entanto, Riazi e colaboradores (2006) demonstraram que a associação da ovariectomia e do diabetes provocou maior perda de peso nesses animais. Os nossos dados demonstram também redução do ganho de peso nas ratas diabéticas ovariectomizadas, sem influência significativa do exercício físico. Contudo, outros estudos evidenciaram que o exercício melhorou a capacidade metabólica em ratas com diabetes induzido pela STZ (Amaral et al., 2016), e em ratos obesos e diabéticos treinados (Ito et al., 2015). Em nosso estudo foi observado também aumento do peso do rim nas ratas diabéticas ovariectomizadas, que pode ser explicado pela hipertrofia renal característica da nefropatia diabética inicial (Suarez et al., 2013). Amaral e colaboradores (2016) também observaram aumento do peso do rim em ratas diabéticas intactas, porém, esse aumento foi atenuado pelo exercício.

Neste estudo, todas as ratas diabéticas apresentaram aumento da glicemia pós-prandial. No entanto, este aumento não foi associado à dieta, uma vez que não houve diferença no

consumo de ração entre os grupos experimentais. Já foi demonstrado que a atividade física reduz os níveis de glicose e insulina em jejum, melhora a tolerância à glicose e estimula a captação de glicose no músculo de ratas *Zucker* diabéticas obesas ovariectomizadas (Bergeran et al., 2014). Por outro lado, Furukawa e colaboradores (2013) mostraram que o exercício melhorou o peso corporal, a pressão arterial, a função e a morfologia renal sem, no entanto, alterar a glicemia no DM tipo 2. Apesar do exercício não estar sempre associado ao controle glicêmico, localmente, foi demonstrado que o exercício moderado induz o aumento da massa das células beta-pancreáticas e reduz a apoptose (Choi et al., 2005). O exercício reduziu a glicosúria nas ratas do grupo DTO. A concentração do transportador GLUT1 é reduzida em ratos com diabetes induzida por STZ (Machado, 1998). O exercício aumenta o fluxo sanguíneo muscular, a captação de glicose e a ligação da insulina ao seu receptor (Pauli et al., 2009). Além disso, o exercício físico moderado induz o aumento do número de transportadores de glicose GLUT 4 no músculo (Ebersbach-Silva et al., 2013) promovendo indiretamente a diminuição da glicosúria.

A proteinúria está diretamente relacionada à progressão da lesão renal, sendo, portanto, um importante marcador da função renal (Guimarães et al., 2007; Murussi et al., 2008). Nossos resultados evidenciaram proteinúria elevada nas ratas DSO. Contudo, o exercício físico reverteu a excreção urinária de proteínas nas ratas do grupo DTO. O aumento da proteinúria em animais diabéticos pode estar associado ao comprometimento das proteínas estruturais e da permeabilidade glomerular desencadeado pela hiperglicemia (Ito et al., 2015; Wang et al., 2015; Saleh et al., 2016). Os efeitos benéficos do exercício tenham sido atribuídos à redução da hiperglicemia, proteinúria e albuminúria, melhor biodisponibilidade do óxido nítrico e redução do estresse oxidativo (Albright et al., 1995; Silva et al; 2012). O exercício não atenuou aumentos no fluxo urinário e a fração de excreção de sódio potássio induzida por diabetes no grupo DTO.

Apesar da deficiência de estrógeno 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 nefropatia diabética também são determinantes para o desenvolvimento de lesões glomerulares (Lagranha, 2007; Al-Trad et al., 2015). Os nossos resultados evidenciam aumento da glomeruloesclerose segmentar focal nas ratas DSO e redução das alterações glomerulares no grupo DTO. Rodrigues e colaboradores (2011) demonstraram diminuição da constrição dos capilares glomerulares, expansão mesangial, proteinúria, estresse oxidativo e melhor biodisponibilidade de NO em ratos com DM1 exercitados. Amaral e colaboradores (2016) demonstraram também que o exercício físico moderado reduziu o índice glomeruloesclerótico, as expressões de proteínas da matrix extracelular e de TGF- β em ratas intactas com diabetes induzido por STZ. Em nosso estudo foi verificado também correlação positiva entre a proteinúria e o IGE. Essas alterações glomerulares são responsáveis pelo aumento do tufo glomerular observado em ratos diabéticos (Bangstad et al., 1993; Sharma e McGowan 2000; Volpini et al., 2003). Elliot e colaboradores (2003) evidenciou que o aumento do tufo glomerular e diminuição do espaço vascular foram associados à ovariectomia. Em nosso estudo, esse aumento foi maior nos glomérulos justamedulares quando comparado aos glomérulos corticais. Essas alterações justamedulares podem estar associadas às lesões podocitárias e ao envelhecimento pela maior intensidade da marcação de desmina em ratos com DM2 (Sofue et al., 2012). O exercício físico reduziu a área do tufo de glomérulos justamedulares nas ratas do grupo DTO.

As lesões túbulo-intersticiais foram mais pronunciadas no córtex renal das ratas DSO, e esse aumento atenuado pelo exercício nas ratas DTO. Com a análise estratificada dessas lesões foi possível observar maior degeneração hidrópica/vacuolização, perda de borda em escova, dilatação/achatamento, debridamento e necrose das células tubulares em decorrência do

diabetes. A degeneração vacuolar também foi demonstrada em ratos diabéticos sedentários (Rodrigues et al., 2011). Fernandes e colaboradores (2016) observaram dilatação tubular e amostraram que as alterações na histologia renal foram induzidas pela hiperglicemia devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio. Neste estudo, o exercício reduziu a perda de borda em escova e o debridamento das células tubulares. Como as lesões são mais predominantes em glomérulos, poucos estudos avaliam as alterações tubulares correlacionando-as ao exercício físico e ao diabetes, principalmente na ausência dos hormônios sexuais femininos.

Nossos resultados demonstram concentrações plasmáticas e urinárias reduzidas de TBARS em ratos diabéticos treinados ovariectomizados. Conforme demonstrado em nosso estudo, o exercício reduziu os níveis de estresse oxidativo em ratos diabéticos e/ou uninefrectomizados (Fernandes et al., 2016). Rodrigues e colaboradores (2011) evidenciaram diminuição das concentrações plasmáticas e urinárias de TBARS em ratos com diabetes mellitus tipo 1 submetidos ao exercício. O treinamento físico atenuou os níveis de TBARS e aumentou a atividade de superóxido dismutase renal e nitrito/ nitrato sérico, além de proteger contra danos renais devido à deficiência de óxido nítrico (Peeri et al., 2013). Nossos dados também demonstram uma correlação positiva entre proteinúria e TBARS urinário. Isto é consistente com a evidência de que o exercício aeróbio regular, de intensidade moderada, exerce efeitos protetores sobre o rim diabético, prevenindo a proteinúria e o estresse oxidativo local em animais (Albright et al., 1995; Agarwal et al., 2012) e em humanos (Silva et al., 2012; Peeri et al., 2013).

Em conclusão, o efeito benéfico do exercício físico sobre essas alterações de função e estrutura renal pode estar associado, pelo menos em parte, a redução do estresse oxidativo em ratas ovariectomizadas com diabetes *mellitus* tipo 1

Agradecimentos

Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB, Brasil). Nós agradecemos a Cláudia Souza, Gabriela Pires, Israel Silveira e Monaliza Hipólito, estudantes do nosso laboratório, que participaram em muitos aspectos desse estudo.

Referências

Agarwal D., Elks C.M., Reed S.D., Mariappan N., Majid D.S.A. and Francis J. (2012). Chronic Exercise Preserves Renal Structure and Hemodynamics in Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxidants & Redox Signaling* 16, 139-152.

Albright A.L., Mahan J.D., Ward K.M., Sherman W.M. and Roehrig K.L. (1995). Diabetic nephropathy in an aerobically trained rat model of diabetes. *Med Sci Sports Exerc.* 27, 1270-1277.

Al-Trad B., Ashankyty I.M. and Alaraj M. (2015). Progesterone ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic Rats. *Diabetol Metab Syndr* , 7, 1-13.

Amaral L.S.B., Silva J.A., Trindade T.M., Ribas W.B.D., Macedo C.L., Coimbra T.M., Belo N.O., Magalhães A.C.M., Soares T.J. (2014). Renal changes in the early stages of diet-induced obesity in ovariectomized rats physiological. *Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 63, 723-732.

Amaral L.S.B. , Silva F.A., Correia V.B., Andrade C.E., Dutra B.A., Oliveira M.V., Magalhães, A.C.D., Volpini R.A., Seguro A.C., Coimbra T.M. and Soares T.D.J. (2016). Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. *Experimental Biology and Medicine* 241, 437-445.

Antus B., Hamar P., Kokeny G., Szollosi Z., Mucsi I., Nemes Z. and Rosivall L. (2003). Estradiol is nephroprotective in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 18, 54–61.

Bangstad H. J., Osterby R., Dahl-Jorgensen K., Berg K.J., Hartmann A., Nyberg G., Bjorn S.F. and Hanssen K.E. (1993). Early glomerulopathy is present in young, type 1 (Insulin-Dependent) diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetologia* 36, 523-529.

Barutta F., Bruno G., Grimaldi S. and Gruden G. (2014). Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment. *Endocrine Review*.

Bergeron R., Mentor J.S., Côté I., Ngo Sock E.T., Rabasa-Lhoret R. and Lavoie J.M. (2014). Loss of ovarian estrogens causes only mild deterioration of glucose homeostasis in female ZDF rats preventable by voluntary running exercise. *Horm Metab Res.* 46, 774-781.

Bortolon J.R., Junior A.J.A.S., Murata G.M., Newsholme P., Curi R., Pithon-Curi T.C. and Hatanaka E. (2012). Persistence of inflammatory response to intense exercise in diabetic rats. *Exp Diabetes Res.*, 1-8.

Camargo I.C.C., Gênova T.C., Machado M.C.P., Frei F. and Mesquita S.F.P. (2011). Administração experimental de esteróide anabólico androgênico e álcool causa alterações histológicas e morfométricas nos ovários e útero de ratas adultas *Biosci. J.*, Uberlândia, 27, 656-665.

Chin M., Isono M., Isshiki K., Araki A., Sugimoto T., Guo B., Sato H., Haneda M., Kashiwagi A. and Koya D. (2005). Estrogen and raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, ameliorate renal damage in db/db mice. *American Journal of Pathology* 166, 1629- 1636.

Choi S.B., Jang J.S. and Park S. (2005). Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology*.146, 4786-4794.

Ciampone S., Borges R., Lima I.P.D., Mesquita F.F., Cambiucci E.C. and Gontijo J.A.R. (2011). Long-term exercise attenuates blood pressure responsiveness and modulates kidney angiotensin II signalling and urinary sodium excretion in SHR. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 12, 394-403.

Coelho C.F. and Burine R.C. (2009). Atividade física para prevenção e tratamento das doenças crônicas não transmissíveis e da incapacidade funcional. *Rev. Nutr.*, Campinas, 22, 937-946.

Coimbra T.M., Janssen U., Grone H.J., Ostendorf T., Kunter U., Schmidt H., Brabant G. and Floege J. (2000). Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney International* 57, 167-182.

Ebersbach-Silva P., Alves T., Fonseca A.T., Oliveira M.A., Machado U.F. and Seraphim P.M. (2013). Cigarette smoke exposure severely reduces peripheral insulin sensitivity without changing GLUT4 expression in oxidative muscle of Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 57, 19-26.

Elliot S.J., Karl M., Berho M., Potier M., Zheng F., Leclercq B., Striker G.E. and Strieker L.J. Estrogen deficiency accelerates progression of glomerulosclerosis in susceptible mice. *American Journal of Pathology* 162, 1441-1448.

Fernandes S.M., Cordeiro P.M., Watanabe M., Fonseca C.D. and Vattimo M.F.F. (2016). The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Archives of Endocrinology and Metabolism* 60, 443-449.

Furukawa M., Gohda T., Tanimoto M. and Tomino Y. (2013). Pathogenesis and novel treatment from the mouse model of type 2 diabetic nephropathy. *The Scientific World Journal*, 1-8.

Guimarães J., Bastos M., Melo M. and Carneiro M. (2007). Nefropatia diabética: Taxa de Filtração Glomerular Calculada e Estimada. *Acta Med Port.* 20, 145-150.

Gusmão L., Galvão J. and Possante M. (2003). A resposta do rim ao esforço físico *Rev Port Nefro Hipert* 17, 73-80.

Haygen H.N. (1953). The determination of "endogenous creatinine" in plasma and urine. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 5, 48-57.

Huebschmann A.G., Kohrt W.M., Herlache L., Wolfe P., Daugherty S., Reusch J.E.B., Bauer T.A. and Regensteiner J.G. (2015). Type 2 diabetes exaggerates exercise effort and impairs exercise performance in older women. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 3, 1-9.

Ito D., Cao P., Kakihana T., Sato E., Suda C., Muroya Y., Ogawa Y., Hu G., Ishii T., Ito O., Kohzuki M. and Kiyomoto H. (2015). Chronic running exercise alleviates early progression of nephropathy with upregulation of nitric oxide synthases and suppression of glycation in Zucker diabetic rats. *Plos One* 10, 1-21.

Keck M., Romero-Aleshire M.J., Cai Q., Hoyer P.B. and Brooks H.L. (2007). Hormonal status affects the progression of STZ-induced diabetes and diabetic renal damage in the VCD mouse model of menopause. *American Journal of Physiology – Renal Physiology* 293, 193-199.

Lagranha C.J., Fiorino P., Casarini D.E., Schaan B.D. and Irigoyen M.C. (2007). Bases moleculares da glomerulopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 51, 901-912.

Machado U.F. (1998). Transportadores de glicose. *Arq Bras Endocrinol Metab* 42, 413-421.

Mankhey R.W., Bhatti F. and Maric C. (2005). 17 β -Estradiol Replacement Improves Renal Function and Pathology Associated with Diabetic Nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 288, F399-F405.

Mansouri E., Panahi M., Ghaffari M.A. and Ghorbani A. (2011). Effects of grape seed proanthocyanidin extract on oxidative stress induced by diabetes in rat kidney. *Iranian Biomedical Journal.* 15, 100-106.

Maric C. and Sullivan M.D.S. (2008). Estrogens and the Diabetic Kidney, *Gender Medicine* 5, Suppl.A, 103 – 113.

Miyagi M.Y.S., Seelaender M., Castoldi A., Almeida D.C., Bacurau A.V.N., Andrade-Oliveira V., Enju L.M., Pisciotano M., Hayashida C.Y., Hiyane M.I., Brum P.C., Camara N.O.S. and Amano M.T. (2014). Long-term aerobic exercise protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating the expression of IL-6 and HO-1. *Plos One* 9, 1-8.

Murussi M., Murussi N., Campagnolo N. and Silveiro S.P. (2008). Detecção precoce da nefropatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52 (3), 442-451.

Najas C.S., Pissulin F.D.M., Pacagnelli, F.L., Betônico, G. N., Almeida I.C. and Neder, J.A. (2009). Segurança e Eficácia do Treinamento Físico na Insuficiência Renal Crônica. *Rev Bras Med Esporte* 15, 384-388.

Neugarten J., Acharya A. and Silbiger S.R. (2000). Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease a meta-analysis. *Journal of the American Society of Nephrology* 11, 319-329.

Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351-358.

Palm F., Cederberg J., Hansell P., Liss P. and Carlsson P. O. (2003). Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. *Diabetologia* 46, 1153-1160.

Pauli J.R., Cintra D.E., Souza C.T. and Ropelle E.R. (2009). Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 53, 399-408.

Pedersen B.K. (2006). The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays in Biochemistry*, 42, 105-117.

Peeri M., Habibian M., Azarbayjani M.A. and Hedayati M. (2013). Protective effect of aerobic exercise against L-NAME induced kidney damage in rats. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 64, 229-235.

Pérez-Torres I., Roque P., Hafidi M.E., Diaz E. and Baños G. (2009). Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radical Research* 43, 761-771.

Punaro G.R., Maciel F.R., Rodrigues A.M., Rogero M.M., Bogsan C.S.B., Oliveira M.N., Ihara S.S.M., Araujo S.R.R., Sanches T.R.C., Andrade L.C. and Higa E.M.S. (2014). Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. *Nitric Oxide* 37, 53–60.

Riazi S., Maric C. and Ecelbarger C.A. (2006). 17- β Estradiol attenuates streptozotocin-induced diabetes and regulates the expression of renal sodium transporters. *Kidney International* 69, 471–480.

Rodrigues A.M., Bergamaschi C.T., Araújo R.C. and Mouro M.G. (2011). Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type I diabetic rats. *Experimental Biology and Medicine* 236, 1180-1187.

Saito T., Sumithran E., Glasgow E.F. and Atkins R. C. (1987). The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the coadministration of protamine. *Kidney International* 32, 691–699.

Saleh M.A., Miguel C.D., Stevens D.I., Carmines P.K., Pollock D.M. and Pollock J.S. (2016). Free radical scavenging decreases endothelin-1 excretion and glomerular albumin permeability during type 1 diabetes. *Physiol Rep* 4, 1-9.

Sharma K. and McGowan T.A. (2000). TGF- β in Diabetic Kidney Disease: Role of Novel Signaling Pathways. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11, 115-123.

Shih W., Hines W.H. and Neilson E.G. (1988). Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. *Kidney International* 33, 1113-1118.

Silva K.A.S., Luiz R.S., Rampaso R.R., Abreu N.P., Moreira E.D., Mostarda C.T., Angelis K.D., Teixeira V.P.C., Irigoyen M.C. and Schor N. (2012). Previous exercise training has a beneficial effect on renal and cardiovascular function in a model of diabetes. *PloS one* 7, 1-10.

Sofue T., Kiyomoto H., Kobori H., Urushihara M., Nishijima Y., Kaifu K., Hara T., Matsumoto S., Ichimura A., Ohsaki H., Hitomi H., Kawachi H., Hayden M.R., Whaley-Connell A., Sowers J.R., Ito S., Kohno M. and Nishiyama A. (2012). Early treatment with Olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *American Journal of Hypertension* 25, 604-611.

Souza S.B.C., Flues K., Paulini J., Mostarda C., Rodrigues B., Souza L.E., Irigoyen M.C. and Angelis K.D. (2007). Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 50, 786-791.

Suarez M.L.G., Thomas D.B. Barisoni L. and Fornoni A. (2013). Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy? *World J Diabetes* 4, 245-255.

Trevisan R., Barnes D.J. and Viberti G. (1997). Pathogenesis of Diabetic Nephropathy.

Text Book of Diabetes. 2nd ed. Pickup J.C. and Williams J. Oxford: Blackwell Science Ltd, pp 52.1-52.21, 1997.

Volpini R.A., Silva C.G.A., Costa R.S. and Coimbra T.M. (2003). Effect of enalapril and losartan on the events that precede diabetic nephropathy in rats. *Diabetes/ Metabolism Research and Reviews* 19, 43-51.

Wang J.H., Ren K., Sun W.G., Zhao L., Zhong H.S. and Xu K. (2014). Effects of iodinated contrast agents on renal oxygenation level determined by blood oxygenation level dependent magnetic resonance imaging in rabbit models of type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *BMC Nephrology* 15, 1-9.

Zambon L., Duarte F.O., Freitas L.F., Scarmagnani F.R.R., Dâmaso A., Duarte A.C.G.O. and Sene-Fiorese M. (2009). Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Revista de Nutrição* 22, 707-715.

Tabelas

Tabela 1- Dados de Delta Peso, Índice Uterino, Peso do Rim, Glicemia, Glicosúria, Frequência Cardíaca, Pressão Arterial Sistólica, Pressão Arterial Diastólica e Pressão Arterial Média de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO), diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO).

PARÂMETROS AVALIADOS	CSO	DSO	DTO
Delta Peso	72,1 (47,1; 78,8)	7,9 (-7,6; 30,9)*	1,2 (-4,6; 8,4)*
Índice Uterino	47,31 (34,72; 138,1)	57,01 (47,26;72,41)	54,70 (48,47; 197,2)
Peso do Rim	0,34±0,01	0,66±0,05***	0,56±0,2***
GPP	110,4 (106,3; 119,4)	674,6 (578,6; 824)*	785(629,7;985,6)**
Glicosúria	1,52±0,30	2019±237,2***	1288±329,6** [#]
FC	367,8±7,8	353,9±28,8	348,5±26,1
PAS	126,2±2,6	123,9±1,6	131,3±5,9
PAD	73,17±3,0	70,47±1,3	78,80±3,6
PAM	90,56±2,6	87,94±1,2	95,40±4,1

Delta peso (g); Índice uterino (mg/100g/pc); Peso do rim (g/100g/pc); GPP, glicemia pós-prandial (mg/dl); Glicosúria (mg/24h); FC, frequência cardíaca (bpm); PAS, pressão arterial sistólica (mmHg); PAD, pressão arterial diastólica (mmHg); PAM, pressão arterial média (mmHg). Dados são expressos como média±EPM, com exceção dos dados de delta peso, índice uterino e glicemia que são expressos como mediana e percentil 25 e 75. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* CSO; [#]p<0,05 *versus* DSO.

Tabela 2 – Parâmetros de função renal de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO), diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO).

PARÂMETROS AVALIADOS	CSO	DSO	DTO
Creatinina Plasmática	0,3 (0,3; 0,3)	0,3 (0,3; 0,4)	0,4 (0,2; 0,5)
TFG	0,8±0,1	0,6±0,1	0,9±0,2
Fluxo urinário	4,33±0,92	54,2±13,14**	45,2±10,87**
FENa+	0,38±0,03	0,95±0,16*	1,15±0,25*
FEK+	9,1 (6,8; 9,3)	31,0 (26,7; 56,7)*	40,3 (19,1; 45,8)*
Proteinúria	2,49±0,8	29,35±6,15***	12,5±2,7 [#]

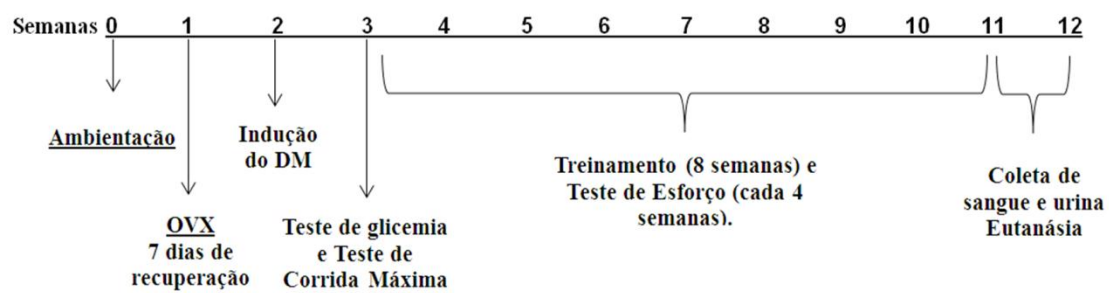
Creatinina plasmática (mg/dl); TFG, taxa de filtração glomerular (ml/min/100g); Fluxo urinário (µl/min); FENa⁺, fração da excreção de sódio (%); FEK⁺, fração da excreção de potássio (%); Proteinúria (mg/24h). Dados são expressos como média±EPM, com exceção dos dados de creatinina plasmática e FEK⁺ que são expressos como mediana e percentil 25 e 75. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 *versus* CSO; [#]p<0,05 *versus* DSO.

Tabela 3 – Parâmetros de histologia e morfometria renal de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO), diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO).

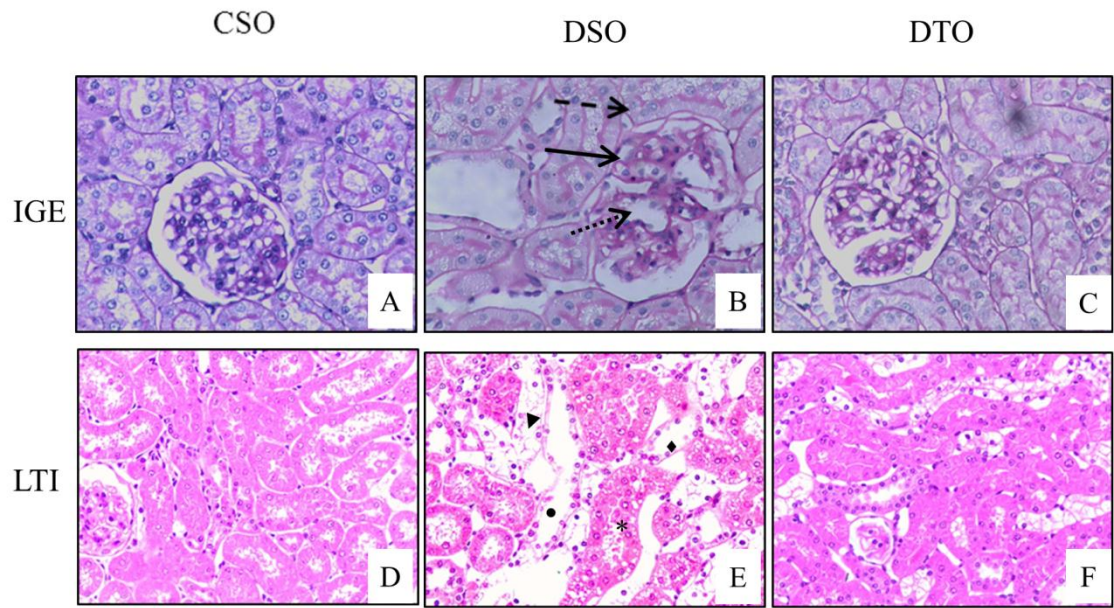
PARÂMETROS AVALIADOS	CSO	DSO	DTO
IGE	0,21 (0,19; 0,25)	0,96 (0,86; 1,09) ^{***}	0,75 (0,73;0,97) ^{***#}
ATG c	3569±68,67	4576±205,30 ^{**}	4440±173,0 ^{**}
ATG jm	3655±110,90	5238±229,70 ^{***}	4238±217,6 ^{##}
AEC c	1209±90,39	2304±463,6 [*]	1430±205,6
AEC jm	959,5 (936,5; 1237)	1880 (1332; 2440) [*]	1183 (892,8; 1686)
LTI	0,75±0,11	1,98±0,27 ^{**}	1,35±1,34 [#]
Deg Hid/ Vac	14,4±2,8	39,3±7,0 [*]	28,3±6,1
Perda de Borda	3,9±0,7	11,1±2,4 [*]	4,3±1,5 [#]
Dilat / Achat	0,3±0,05	4,5±1,0 ^{**}	3,3±0,8 [*]
Debridamento	2,4±0,6	5,3±0,8 [*]	2,5±0,8 [#]
Necrose	0,2±0,1	0,8±0,2 ^{**}	0,6±0,1 [*]

IGE, índice glomeruloesclerótico (escore); ATGc, área do tufo glomerular cortical (μm^2); ATGjm, área do tufo glomerular justamedular (μm^2); AECc, área do espaço capsular dos glomérulos corticais (μm^2), AECjm, área do espaço capsular dos glomérulos justamedulares (μm^2); LTI, lesões túbulo-intersticiais (escore); Deg Hid/ Vac, degeneração hidrópica e vacuolização (%); Perda de borda em escova (%); Dil/ Achat, dilatação e achatamento (%); Debridamento (%); Necrose (%). Dados são expressos como média±EPM, com exceção dos dados de IGE e AECjm que são expressos como mediana e percentil 25 e 75. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 versus CSO; # p<0,05 e ## p<0,01 versus DSO.

Figuras



1



2

Legendas das figuras

Figura 1- Desenho do protocolo experimental.

Figura 2- Fotomicrografias representativas das alterações histológicas glomerulares em tecido corado com PAS (A, B, C) e lesões túbulo-intersticiais em tecido corado com HE (D, E, F); de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (A, D), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (B, E) e diabéticas treinadas ovariectomizadas (C, F). Notar em B dilatação (seta), obliteração dos capilares glomerulares (seta pontilhada), aumento da matriz mesangial (seta tracejada) e comprometimento da arquitetura glomerular. Notar em C que essas alterações foram reduzidas. Notar em E degeneração hidrópica (ponta de seta), vacuolização (asterisco), perda de borda em escova (losango) e debridamento (círculo). Notar em F que essas alterações foram atenuadas. Aumento 400X (A, B, C) e aumento de 200X (D, E, F).

Figura 3- Concentração de TBARS plasmático (A) e urinário (B) de ratas controles sedentárias ovariectomizadas (CSO), diabéticas sedentárias ovariectomizadas (DSO) e diabéticas treinadas ovariectomizadas (DTO). * $p < 0,05$ versus CSO; # $p < 0,05$ versus DSO. Correlação de Pearson: Proteinúria versus IGE, $r = 0,7112$ e $p < 0,01$ (C) e Proteinúria versus TBARS urinário, $r = 0,6408$ e $p < 0,05$ (D).

CAPÍTULO 2

RESULTADOS ADICIONAIS

Expressão Renal de Macrófagos, Vimentina, Alfa-actina e Fibronectina

A análise de imunorreações não mostrou diferença significativa para nenhum dos parâmetros (Tabela 4). No entanto, foi possível observar um aumento no grupo DSO comparado ao grupo controle para as marcações de ED1 glomerular, ED1 intersticial, Vimentina, Alfa-actina, e Fibronectina. Do mesmo modo, não houve diferença significativa quando comparado o grupo DTO ao DSO. Possivelmente, os dados não foram significativos por se tratar de um modelo de lesão inicial que está associado também ao tempo do diabetes, dose de estreptozotocina, modelo animal, modalidade e intensidade do exercício físico, bem como a associação ou não de terapias farmacológicas.

Tabela 4- Estudos imuno-histoquímicos em região cortical de ratas experimentais CSO, DSO e DTO.

PARÂMETROS ANALISADOS	CSO	DSO	DTO
ED1g	0,66 (0,58; 1,62)	1,97 (1,5; 2,84)	2,37 (0,62; 6,36)
ED1i	2,96±0,42	6,08±2,25	5,22±1,97
Vimentina	0,13 (0,80; 0,77)	0,39 (0,25; 0,80)	0,58 (0,5; 3,39)
Alfa - actina	1,03±0,16	0,90±0,12	0,99±0,03
Fibronectina	10,93±3,84	21,06±4,65	17,90±3,92

Dados são expressos como média±EPM, ou em mediana de percentil 25 e 75. ED1g, glomérulo (macrófagos/campo); ED1i, interstício (macrófagos/campo); Vimentina (escore); Alfa-actina (%); Fibronectina (%).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, analisamos o efeito do exercício físico moderado e progressivo sobre as alterações de função e estrutura renal e do estresse oxidativo em ratas ovariectomizadas com diabetes *melittus* induzida por STZ. Os nossos dados demonstram que o exercício aeróbico moderado, sem associação com nenhuma outra terapia, induziu melhoras sobre parâmetros funcionais, histológicos e do estresse oxidativo.