

JULIANA LOPRETE CURY

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO E RESISTIDO NAS
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICAS DO
TECIDO ÓSSEO EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA BRANCO**

Campo Grande
2014

JULIANA LOPRETE CURY

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO E RESISTIDO NAS
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICAS DO
TECIDO ÓSSEO EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA BRANCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza

Campo Grande
2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA LOPRETE CURY

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO E RESISTIDO NAS CARACTERÍSTICAS
BIOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICAS DO TECIDO ÓSSEO EM MODELO ANIMAL
DE DOENÇA RENAL CRÔNICA EM COELHOS NOVA ZELÂNDIA BRANCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado_____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza
Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso Do Sul - UFMS

Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva
Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof^a. Dra. Maria Lúcia Ivo
Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof^a Dra. Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo
Instituição: Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN

Prof^a Dra. Iandara Schettert Silva
Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso Do Sul – UFMS

Prof. Dr. Gustavo Christofolletti
Instituição: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, esposo, filhos, meus pais, por caminharem comigo em todos os momentos, acreditarem e incentivarem a busca pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

...primeiramente a Deus pelo dom da vida, por preparar o caminho e por todas as bênçãos que derramou sobre mim...

...ao meu esposo, Fábio, que sempre esteve ao meu lado, apoiando e sonhando junto comigo e que ajudou em todos os momentos da realização deste...

...à minha pequena e querida filha Marina, que veio como um presente durante este processo e que me acompanhou em muitas etapas...e ao pequeno Arthur que está a caminho...

...aos meus pais Sidney e Maria, por sempre acreditarem em mim e em meus sonhos... e em especial à minha mãe por se dispor integralmente para me acompanhar em momentos de coletas de dados juntamente com minha filha...

...aos meus sogros Antonio e Lourdes que sempre estiveram a disposição e nos apoiaram em muitas etapas deste processo...

...ao meu orientador Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza pela coragem em assumir esta orientação, pelo incentivo, apoio e disponibilidade dispensados...

...ao Professor Dr. Antonio Fernando Brunetto (*in memmorian*) por participar de minha formação profissional desde o início, por me ensinar os primeiros passos do caminho da ciência e por sempre acreditar que podemos vencer barreiras e desafios...

...à Prof^a. Dra. Iandara Schetter Silva pela colaboração técnica e científica no desenvolvimento desta pesquisa...

...à Profa^a Dra. Flávia Alessandra Guarnier, por aceitar o imenso trabalho de preparação das lâminas e coleta de dados juntamente com sua equipe de trabalho...

...ao Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva por me receber tão gentilmente, me ensinar com paciência e disponibilizar o seu laboratório para as análises dos radiogramas...

...à querida amiga Prof^a. Ms. Eliane Barbosa Togue por enfrentar todas as etapas deste projeto junto comigo e sempre estar presente...

...à querida amiga Prof^a. Ms. Ângela Cristina de Lima pelo ânimo e incentivo em todos os momentos...

...à acadêmica do curso de Fisioterapia da UNIGRAN Naiéze Venâncio por

sua dedicação e auxílio na coleta de dados...

...a todos os professores e acadêmicos do curso de veterinária do Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho...

...aos coordenadores do Hospital Veterinário da UNIGRAN e do curso de Veterinária da UNIGRAN que cederem tão gentilmente o espaço para que a presente pesquisa pudesse ser realizada...

...às coordenadoras do Laboratório de Análises Clínicas da UNIGRAN, por auxiliarem na coleta de amostras, na preparação do material e análise de parâmetros bioquímicos utilizados nesta pesquisa...

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

“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”

João Guimarães Rosa

RESUMO

CURY JL. Efeitos do exercício aeróbio e resistido nas características bioquímicas e morfométricas do tecido ósseo em modelo animal de doença renal crônica em coelhos nova zelândia branco. Campo Grande; 2014. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A Doença Renal Crônica afeta a função de diversos órgãos e sistemas como metabólico, muscular, cardiovascular e ósseo. As alterações relacionadas com o metabolismo do cálcio e tecido ósseo são denominadas de distúrbio mineral e ósseo. O objetivo desta pesquisa foi analisar os efeitos da aplicação de exercício físico aeróbio e resistido nas características bioquímicas e morfométricas do tecido ósseo em modelo animal de doença renal crônica. Utilizou-se 30 coelhos machos, variedade nova zelândia branco, pesando entre 2,5 a 3 Kg. Os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos: coletas de sangue (variáveis de uréia, creatinina, paratormônio e calcitriol) em 3 momentos (pré-cirurgia, pré-exercício – 6 semanas de pós-operatório e pós-exercício); cirurgia para acesso ao rim esquerdo submetido à isquemia (20 minutos) e reperfusão para indução de doença renal crônica; 6 semanas após cirurgia os animais foram distribuídos em 3 grupos experimentais GC, GA e GR (GC - grupo controle sedentário, GA - grupo exercício aeróbio e GR - grupo exercício resistido); radiograma dos membros posteriores (densidade óssea – variáveis máxima, mínima e média densidade na área avaliada) nos momentos pré-exercício e pós-exercício; protocolo de exercícios aeróbios e resistidos (4 semanas de treinamento); eutanásia e coleta de material para histopatologia (rim esquerdo e rim direito) e histomorfometria (tíbia direita – variável número de espaços intertrabeculares). Variáveis quantitativas expressas em média e desvio padrão. Para comparação das variáveis no decorrer do tempo e entre os grupos utilizou-se ANOVA de duas vias (2 ou 3 momentos de coleta e 3 grupos) ou de uma via (1 momento de coleta e 3 grupos) ambas com pós-teste de Tukey. Correlação entre variáveis utilizou-se teste de Correlação linear de Pearson. Significância estatística $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$). As variáveis creatinina, paratormônio e calcitriol apresentaram aumento significativo na 3ª coleta (pós-exercício $p < 0,05$). A uréia apresentou valores elevados apenas na 2ª coleta (pré-exercício $p < 0,05$). A variável de densidade máxima apresentou menores valores ($p < 0,05$) no momento pós-exercício. Todos os resultados se referem ao efeito do tempo, sem diferença entre os grupos GC, GA e GR e sem interação entre momento e grupos. Correlação negativa e significativa entre paratormônio e densidade máxima ($p < 0,05$, $r = -0,55$). A histomorfometria óssea não apresentou diferença entre os grupos. A histopatologia dos rins direito e esquerdo mostraram lesões compatíveis com a doença renal crônica. O modelo animal de doença renal crônica induzida por isquemia e reperfusão renal unilateral produziu lesões características da evolução desta doença, O exercício físico aeróbio e resistido não produziu modificações deletérias na função renal e nas variáveis bioquímicas e morfométricas do tecido ósseo no decorrer do curso da doença renal crônica.

Palavras Chaves: Doença Renal Crônica, Exercício Físico, Tecido Ósseo

ABSTRACT

CURY JL. Effects of aerobic and resistance exercise on bone tissues biochemical and morphometric characteristics in an animal model of chronic kidney disease in white new zealand rabbits. Campo Grande; 2014. [Thesis – Federal University of Mato Grosso do Sul].

The Chronic Kidney Disease affects several organs and systems functions like metabolic, muscular, cardiovascular and bony. The conditions related to calcium metabolism and bone tissue were nominated mineral and bone disorders. The aim of this study was to analyze the effects of aerobic and resistance exercise on bone tissues biochemical and morphometric characteristics in an animal model of chronic kidney disease. Thirty (30) male white new zealand rabbits, weighing 2.5 to 3 kg were used. The animals were subjected to the following procedures: blood sample collection (urea, creatinine, parathormone and calcitriol) in 3 moments (pre-surgery, pre-exercise – 6 weeks after surgery, post exercise – 4 weeks after protocol); surgery to access the left kidney and ischemia (20 minutes) and reperfusion process to induce chronic kidney disease; 6 weeks after surgery the animals were distributed into 3 experimental groups (CG - sedentary control group; AG - aerobic exercise group and RG - resistance exercise group); x-ray of hindlimbs (bone density – minimum, maximum and mean density in the evaluated area) in pre-exercise and post exercise moments; aerobic and resistance exercise protocol (4 weeks training); euthanasia followed the withdrawal of the right and left kidneys (histopathology) and the right tibia (histomorphometry – number of intertrabecular spaces variable). Quantitative variables expressed in mean and standard deviation. For statistical comparison were used the Two-way ANOVA for repeated measure (2 or 3 moment-collection variables in the 3 groups) or One-way ANOVA for repeated measure (1 moment-collection variables in the 3 groups), both with post hoc Tukey test. To correlate variables were used the Linear (Pearson) correlation. Statistical significance set $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$). Creatinine, parathormone and calcitriol variables presented statistical increase in the 3rd collection (post exercise moment $p < 0.05$). Urea presented an increase in the 2nd collection (pre-exercise moment $p < 0.05$). Maximum density in the evaluated area presented a decrease ($p < 0.05$) in the post exercise moment. All results refer to the time effects analysis without effects for group analysis (CG, AG and RG) and without relationship between groups and moment analysis. Negative correlation between parathormone and maximum density in the evaluated area ($p < 0.05$, $r = -0.55$). The histomorphometric analysis did not presented differences between groups. The histopathological analysis of the left and right kidneys showed compatible lesions with the chronic kidney disease. The animal model of chronic kidney disease using, a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion, produced property lesions that characterize the evolution of this disease. The exercise protocol did not produced deleterious changes in renal function and in biochemical and morphometrics variables of the bone tissue in the course of Chronic Kidney Disease.

Key words: Chronic Kidney Disease, Physical Exercise, Bone Tissue.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão para os níveis séricos de uréia nos grupos GC, GA e GR.....	50
Tabela 02 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão para os níveis séricos de creatinina nos grupos GC, GA e GR.....	51
Tabela 03 - Tabela mostrando a distribuição percentual das alterações histopatológicas renais encontradas nos animais por grupo de intervenção.....	52
Tabela 04 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão para os valores séricos de calcitriol e Pth nos diferentes grupos.....	54
Tabela 05 - Tabela mostrando o valor p na comparação dos níveis de Pth e calcitriol de cada grupo nos momentos pré e pós-exercício com o valor de referência para a normalidade.....	55
Tabela 06 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão dos valores de densidade óssea nos diferentes grupos.....	56
Tabela 07 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão do número de espaços intertrabeculares em corte transversal nas regiões proximal e medial da tíbia direita.....	57
Tabela 08 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão do número de espaços intertrabeculares em corte longitudinal nas regiões proximal e medial da tíbia direita.....	58
Tabela 09 - Tabela mostrando valores de r e p para a correlação entre as variáveis do Pth e calcitriol com a variável creatinina e as variáveis de densidade óssea.....	58

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 01- Procedimentos para confecção das lâminas de tecido ósseo.....	45
Figura 01 - Série temporal dos procedimentos e variáveis coletadas no delineamento experimental.....	38
Figura 02 - Coloração do rim esquerdo após 20 minutos de isquemia com clampeamento do pedículo renal.....	40
Figura 03 - Imagem mostrando radiografia de membros posteriores dos coelhos (momento pré-exercício).....	41
Figura 04 - Em A: animais dentro da caixa de contenção colocada sobre a lona da esteira elétrica durante a prática de exercício aeróbio. Em B: rampa de madeira utilizada para a prática de exercício resistido com os animais.....	43
Figura 05 - Imagem capturada do software durante a digitalização da radiografia de membros posteriores.....	47
Figura 06 - Imagem capturada do software de análise de dados de densidade óssea.....	48
Figura 07 - Fotografia de lâmina histopatológica do rim esquerdo (A) e rim direito (B) mostrando congestão medular e cortical (aumento 10x HE).....	53
Figura 08 - Fotografia de lâmina histológica do rim esquerdo mostrando atrofia glomerular (C) e degeneração hidrópica (D) de células tubulares (aumento 10x em C e 40x em D/HE).....	53
Figura 09- Fotografia de lâmina histológica do rim direito mostrando Glomerulonefrite (aumento 10x HE).....	53
Figura 10 - Gráfico mostrando a correlação entre Paratormônio (Pth) e densidade óssea máxima.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
DMO-DRC	Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica
DRC	Doença Renal Crônica
DXA	<i>Dual Energy X-Ray Absorptiometry</i>
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF23	Fator de Crescimento de Fibroblasto 23
GA	Grupo Aeróbio
GC	Grupo Controle
GR	Grupo Resistido
HPTS	Hiperparatireoidismo Secundário
HR-pQCT	<i>High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography</i>
KDIGO	<i>The Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
OR	Osteodistrofia Renal
pH	Potencial Hidrogeniônico
Pth	Paratormônio
TFG	Taxa De Filtração Glomerular
TMV	Sistema TMV (Turnover, Mineralização E Volume Ósseo)
VO2	Volume De Oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Doença Renal Crônica	17
2.2 Distúrbio Mineral e Ósseo na DRC	21
2.2.1 Inter-relação entre regulação hormonal e modificações ósseas no DMO-DRC	25
2.3 Isquemia e Reperfusão Renal	27
2.4 Avaliação da Função e Lesão Renal	30
2.5 Exercício físico na DRC	31
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Tipo de Estudo	37
4.2 Amostra	37
4.2 Delineamento experimental	37
4.3.1 Distribuição dos Grupos	39
4.4 Procedimentos da pesquisa	39
4.4.1 Primeira coleta de sangue	39
4.4.2 Cirurgia: Isquemia e Reperfusão Renal Unilateral	40
4.4.3 Segunda coleta de sangue: momento pré-exercício	41
4.4.4 Primeira radiografia de membros posteriores: momento pré-exercício	41
4.4.5 Protocolo de exercício físico	42
4.4.6 Segunda radiografia de membros posteriores: momento pós-exercício	43
4.4.7 Terceira coleta de sangue: momento pós-exercício	43
4.4.8 Eutanásia	44
4.5 Coleta das amostras	44
4.6 Processamento do material histopatológico	44
4.7 Análises histológicas	46
4.8 Análise da radiografia de membros posteriores	47
4.10 Análise Estatística	48

5 RESULTADOS.....	50
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS.....	86
ANEXO A – Aprovação CEUA / UFMS.....	87

1 INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos importantes dentro do corpo humano, pois regulam funções vitais como eliminação de catabólitos, equilíbrio hídrico, ácido-básico e eletrolítico do organismo. Além da manutenção do equilíbrio do meio interno os rins participam de funções hormonais como a ativação da vitamina D para a absorção de cálcio intestinal, produção de eritropoetina para formação de hemoglobina e controle da pressão arterial via alça da renina-angiotensina-aldosterona (SUTTON, 2009). A manutenção dessas funções é vital para a homeostase do meio interno e para que o indivíduo possa exercer suas atividades de vida diária, funcionais e profissionais.

Diante dessas funções essenciais para o equilíbrio vital do organismo, o paciente que tem algum déficit irreversível da função renal, desenvolve uma condição patológica denominada Doença Renal Crônica (DRC). Esta doença acomete a função dos rins levando o paciente a necessitar de terapia dialítica, como hemodiálise e diálise peritoneal para sobrevivência. A substituição parcial da função dos rins comprometidos pelas terapias dialíticas é capaz de manter o controle homeostático dos líquidos e eletrólitos no organismo, eliminar catabólitos, balancear o pH enquanto o paciente aguarda uma solução definitiva mediante transplante renal (LEVEY; CORESH, 2012).

A DRC é atualmente reconhecida como um problema de saúde pública mundial e no Brasil. Sua incidência e prevalência vêm aumentando significativamente por conta dos fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença. Dentre os principais fatores causais podemos citar a Hipertensão arterial, o Diabetes *mellitus* e a história familiar da doença. Outro aspecto a ser destacado é o envelhecimento da população mundial pelo aumento da expectativa de vida. Este fator caracteriza um maior número de pessoas susceptíveis ao desenvolvimento da DRC com o avançar da idade, além de estarem mais expostos aos outros fatores causais da doença (HALLAN et al, 2012).

O comprometimento de todas as funções dos rins, em variados níveis de gravidade ocorre em pacientes com DRC. Este paciente apresenta elevado risco de desenvolvimento de disfunções em diversos sistemas do organismo como muscular, ósseo, cardiovascular, metabólico, e respiratório. Dentro desses sistemas, as alterações relacionadas com o metabolismo do cálcio, ora denominada osteodistrofia renal, dentre outras complicações, estão envolvidas na diminuição da atividade

funcional e de vida diária do indivíduo com DRC (VIOLAN et al, 2002; SAKKAS et al, 2003; McINTYRE et al, 2006; SMART et al, 2013).

A osteodistrofia renal é denominada atualmente de Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica (DMO-DRC). Este compromete o equilíbrio do metabolismo do cálcio, sendo conseqüência do desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário em pacientes com DRC. Este distúrbio é multifatorial, porém o fator mais bem descrito está relacionado com a deficiência da vitamina D no paciente com DRC que resulta em hipocalcemia por diminuição da reabsorção de cálcio intestinal. A hipocalcemia e a diminuição do estímulo da vitamina D sobre a paratireóide resultam no aumento da produção de paratormônio (Pth). Este hormônio está envolvido no controle da remodelação óssea, pois promove a reabsorção do tecido ósseo para tentar controlar a hipocalcemia, levando o paciente a desenvolver o distúrbio ósseo e mineral relacionado à DRC (FUKAGAWA et al, 2002; BARDIN, 2003; TANAKA et al, 2012).

O DMO-DRC apresenta lesões patológicas no tecido ósseo em conseqüência de alterações na remodelação óssea normal devido a problemas no controle hormonal do cálcio. O DMO-DRC pode ser dividido em doença de baixo *turnover* e alto *turnover* ósseo, sendo três as formas de apresentação mais comumente encontradas: osteíte fibrosa, osteomalácia e doença adinâmica. Todas estas formas patológicas apresentam descalcificação óssea e diminuição da matriz óssea. Também podem aparecer lesões mistas e calcificações metastáticas em diversas partes do corpo, como tendões e vasos sanguíneos ou ainda deformidades ósseas (CHANG et al, 2007; MACWAY et al, 2012).

Em pacientes com DRC a triagem e o manejo do DMO-DRC são feitas por meio de acompanhamento dos níveis séricos de Pth, cálcio, calcitriol, e sintomas de dores à movimentação. Porém todos são inespecíficos para diferenciar os tipos de lesão e a gravidade do acometimento. Os exames de imagem são realizados apenas naqueles pacientes cujas queixas são mais freqüentes e que apresentem anormalidades nos demais exames. Mesmo assim é difícil compreender o início da doença ou mesmo acompanhar sua evolução ao longo das medidas terapêuticas implementadas (FERREIRA et al, 2008).

As alterações do tecido ósseo aparecem com a instalação da DRC e não é fácil organizar uma amostra homogênea e também realizar exames de biópsia óssea em pacientes com DRC, que apresentem DMO-DRC, pois os exames não são feitos

de rotina e dificilmente são padronizados em centros de atendimentos a estes pacientes. Desta forma é mais fácil a utilização de um modelo animal de doença para a coleta efetiva e padronizada de dados que possam oferecer subsídios para o entendimento dos efeitos dos exercícios resistidos e aeróbio sobre o tecido ósseo.

Para isso foi desenvolvido o modelo animal de DRC em coelho nova zelândia branco, pois este oferece melhor perspectiva na elaboração do modelo experimental de DRC, em face de seu tamanho, volemia e aspectos morfofuncionais, que se assemelham ao *anima nobile* (COSTA et al, 2009).

Diante do exposto o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do exercício aeróbio e resistido sobre a função renal e características bioquímicas e morfométricas do tecido ósseo na DRC. Este tipo de estudo é de fundamental importância, pois permite compreender a evolução da DRC em condições causais similares ao que ocorre no ser humano, estudando diretamente a influência da atividade física na função renal e nas características morfométricas e bioquímicas do tecido ósseo relativas ao DMO-DRC que não é citado nas revisões de literatura sobre a aplicabilidade da prática de exercícios em pacientes com DRC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença Renal Crônica

Doença Renal Crônica é um termo abrangente que designa uma série de distúrbios heterogêneos que podem afetar a função e a estrutura dos rins. Segundo *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (K/DOQI) o termo DRC inclui fatores que possam causar dano progressivo a função renal ou complicações resultantes do dano à função renal, sendo desta forma definida como o dano ao rim ou decréscimo da função renal por três meses ou mais, sem considerar o diagnóstico, com ou sem decréscimo da filtração glomerular, manifestado por meio de anormalidades patológicas do rim ou marcadores de dano renal como alterações na composição do sangue, urina ou anormalidades em exames de imagem. O sinal clínico mais claro de lesão renal é a presença de albuminúria e o sinal clínico para a perda da função renal é uma taxa de filtração glomerular (TFG) abaixo de 60 mL/min (K/DOQI, 2002; LEVEY, et al 2011).

A classificação da DRC é feita com base na queda da taxa de filtração glomerular e dividida em cinco níveis, sendo TFG maior que 90 mL/min classificada como estágio 1, no qual existam fatores de risco para DRC porém sem modificações na função renal (isto é, a TFG ainda permanece em níveis considerados normais para a população em geral), TFG entre 60 e 89 mL/min classificada como estágio 2, TFG 30 e 59 mL/min classificada como estágio 3, TFG entre 15 e 29 mL/min classificada como estágio 4 e TFG inferior a 15mL/min classificada como estágio 5 ou doença renal terminal. Este último estágio caracteriza a falência renal e o paciente necessita de terapia dialítica (K/DOQI, 2002; ROMÃO JUNIOR, 2004. LEVEY et al, 2011)

Estes estágios são determinados pela taxa de filtração glomerular e a presença de dano renal com ou sem a presença de proteína na urina. A taxa de filtração glomerular é estimada na prática clínica por equações que a derivam dos valores séricos de creatinina, sendo a equação de CKD-EPI (LEVEY et al, 2009) a mais recente a ser descrita na literatura. Magacho *et al.* (2012) publicaram um nomograma, para utilização no Brasil, da estimativa da TFG baseada nos valores de

creatinina séricos tendo como referência a equação CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*).

A presença de albuminúria é um fator importante na classificação, pois esta pode estar alterada negativamente mesmo em TFG consideradas normais ou com pouca alteração. A combinação da avaliação da TFG e da albuminúria são os achados clínicos laboratoriais que orientam a classificação dos estágios e da identificação de maiores fatores de risco para doença cardiovascular associada à DRC. Em 2009 o estágio 3 foi subdividido em 3a e 3b pela presença ou ausência de albuminúria e esta subdivisão permanece nas classificações atuais (HALLAN et al, 2009; HALLAN et al, 2012).

Desde 2002, após a publicação do guia K/DOQI, muitos esforços têm sido feitos em busca de evidências científicas para a classificação da DRC que possam facilitar a rotina da prática clínica. Hallan e Ott (2010) discutem que a maior parte dos esforços terapêuticos eram voltados para os pacientes em estágio terminal, na busca de melhorias nas terapias dialíticas e na capacitação para o transplante renal. Estes esforços vêm se voltando atualmente para o diagnóstico precoce da DRC e para uma abordagem preventiva de sua evolução ou comorbidades, pois a prevalência de DRC aumentou significativamente ao longo dos anos em todo o mundo, sendo esta um fator de risco independente para mortalidade em geral da população e para a mortalidade relacionada a doenças cardiovasculares (LEVEY; CORESH, 2012).

Esta mudança vem ocorrendo pelo reconhecimento de que a DRC deixou de ser uma doença única e exclusiva do rim, tratado por uma especialidade médica, para ser entendida como um problema de saúde pública em prevalência crescente, que precisa ser diagnosticado precocemente, tratado para corrigir morbidades e diminuir a necessidade de terapia renal substitutiva (dialítica), transplantes e que têm impactado com gastos elevados o orçamento público ou privado da saúde em todo o mundo. (HALLAN; OTT, 2010; LEVEY; CORESH, 2012)

O número de pacientes portadores de DRC vem crescendo nas últimas duas décadas. Em 1994 o Brasil tinha 24.000 pacientes mantidos em programa dialítico e em 2004 o número ultrapassou 58.000 (ROMÃO JUNIOR, 2004), fechando o ano de 2004 com 68.000 pacientes em diálise (GRASSMANN et al, 2005). O Censo Brasileiro de Diálise, publicado em 2012 pela Sociedade Brasileira

de Nefrologia, mostrou que no ano de 2011 existiam aproximadamente 92.000 pacientes em terapia dialítica no Brasil (SESSO et al, 2012).

Outros dados do Censo revelam que a taxa geral de prevalência de pacientes em tratamento dialítico, no Brasil, em 2011, foi de 475 pacientes por milhão de população (pmp) e que a região Centro-oeste ocupou neste censo 2º lugar no país com taxa de prevalência de 530 pmp.

Dados mundiais descritos por Grassmann *et al.* (2005) evidenciam este aumento na prevalência de DRC no mundo. O autor destaca que se espera um salto no número de pacientes em terapia dialítica de 1.371.000 em 2004, para mais de 2.000.000 em 2010, sendo Estados Unidos, Japão e Brasil os três primeiros em número de pacientes em diálise.

Hallan *et al.* (2012) destacam que a DRC afeta de 10 a 15% dos adultos nos Estados Unidos, Europa e Ásia, sendo a prevalência cada vez maior com o avançar da idade: 4% na faixa etária de 20 a 39 anos e 47% para indivíduos com idade superior a 70 anos de idade nos Estados Unidos. A prevalência de DRC é estimada em 400 pmp por ano nos Estados Unidos, Ásia e México, para os estágios 3 a 5 de DRC.

Estudos mostrando a estimativa de DRC em estágios iniciais (1 e 2) são mais difíceis de se encontrar na literatura, pois há divergências quanto à forma de obtenção da TFG e da classificação do dano renal. Um estudo publicado nos Estados Unidos, mostrou que, de 1999 a 2006 a taxa de prevalência de DRC foi de 11,5% para a população em geral, sendo 4,8% para os estágios 1 e 2 e 6,7% para os estágios 3 a 5, usando como base a classificação pela TFG e presença de albuminúria (LEVEY et al, 2009).

No Brasil não existem estudos que pesquisaram a prevalência de DRC nos estágios iniciais. Passos *et al.* (2003) publicaram um estudo mostrando a prevalência de disfunção renal com base nos níveis séricos de creatinina em uma cidade do interior do estado de Minas Gerais. Ele encontrou uma taxa de 0,5% em adultos de 18 a 59 anos e de 5,1% em idosos acima de 60 anos. Estes valores estão abaixo das estimativas em outros locais. Entretanto podemos destacar que o estudo não levou em consideração o padrão de análise da TFG e nem a presença de albuminúria. Outro aspecto a ser considerado é que pacientes mais graves poderiam ter se deslocado para uma cidade de maior porte, reduzindo a estimativa encontrada pelo pesquisador.

A DRC é um problema de saúde pública que tem como fatores de risco e progressão da doença alguns determinantes de saúde de grande impacto na sociedade mundial, sendo citado o envelhecimento, a hipertensão arterial, o diabetes *mellitus*. Outros fatores como a história familiar de DRC, a presença de doenças sistêmicas, auto-ímmunes, litíase renal e infecções urinárias de repetição também devem ser pesquisados na história do pacientes que apresenta DRC (WINEARLS; GLASSOK, 2011; SESSO et al, 2012; LEVEY; CORESH, 2012).

Nos Estados Unidos aproximadamente 40% dos casos novos de DRC estão relacionados com a presença de diabetes *mellitus* (LEVEY; CORESH, 2012). Coresh *et al.* (2007) concluíram que a prevalência da DRC aumentou significativamente nos Estados Unidos, comparando o período de 1994 a 2004 com o período de 1988 a 1994, principalmente pela presença de diabetes *mellitus* e hipertensão arterial na população. No Brasil, o último Censo Brasileiro de Diálise (SESSO et al, 2012), mostrou que o diagnóstico de base para DRC mais comumente encontrado nos pacientes em diálise foi Hipertensão arterial (35,1% das causas) e Diabetes *nellitus* (28,4% das causas), que somados, ultrapassaram 50% dos fatores causais de DRC nesta população.

O tratamento da DRC é diferente em seus vários estágios. Este inclui abordagens para controle dos fatores causais e de progressão da doença, prevenção, controle e/ou tratamento das comorbidades e complicações, diminuição do risco cardiovascular associado à doença renal. Dados do Censo Brasileiro de Diálise (SESSO et al, 2012) revelam que 39,3% paciente apresentavam anemia ($Hb < 11$) e 30,6% elevação da taxa do Pth (> 300), indicando DMO-DRC.

A terapia dialítica é indicada nos estágios mais avançados da doença (estágio 5) com TFG inferior a 15 mL/min. Apesar dessas intervenções, o paciente ainda apresenta uma significativa diminuição de sua capacidade física e problemas psicossociais que levam a alteração na qualidade de vida, pois o tratamento não consegue substituir totalmente as funções dos rins (KONSTANTINIDOU et al, 2002; HALLAN et al, 2012; LEVEY; CORESH, 2012).

Por não substituir totalmente a função natural dos rins o paciente com DRC em diálise desenvolve disfunções em diversos sistemas do organismo como muscular, ósseo, cardiovascular, metabólico e respiratório. Dentro desses sistemas, as alterações mais comuns são miopatia urêmica, anemia, neuropatia periférica, alterações metabólicas, osteodistrofia renal, infecções e doença cardiovascular.

Estas alterações estão envolvidas na diminuição da atividade funcional e de vida diária do indivíduo e na mortalidade de pacientes com DRC (VIOLAN et al, 2002; SAKKAS et al, 2003; McINTYRE et al, 2006; HALLAN et al, 2009; LEVEY; CORESH, 2012; SMART et al, 2013).

Dados do último Censo Brasileiro de Diálise (SESSO et al, 2012) mostram uma taxa de mortalidade bruta de 19,9% no ano de 2011, sendo o número estimado de óbitos de 18.187 indivíduos na população que estava em diálise neste ano.

Estes dados não representam totalmente a realidade, pois, segundo Luciano *et al.* (2012) não existem dados suficientes que possam ilustrar a magnitude da incidência e prevalência de DRC no Brasil, bem como não há dados expressivos referentes à morbidade, hospitalizações e mortalidade. Se extrapolarmos pelos dados da realidade americana, em que aproximadamente 13% da população apresenta diagnóstico de DRC, estima-se que possa haver cerca de 16 milhões de brasileiros acometidos e muitos deles sem diagnóstico e acompanhamento em estágios iniciais da DRC.

A DRC é comum, grave, tratável e deve ser prevenida. Nos estágios iniciais, pode ser detectada por exames laboratoriais simples, de baixíssimo custo e o tratamento das doenças de base pode impedir ou retardar a evolução para estágios mais avançados da DRC ou para doença cardiovascular ou morte.

2.2 Distúrbio Mineral e Ósseo na DRC

A Osteodistrofia Renal (OR) é uma doença que acomete o paciente com DRC por este apresentar distúrbios relacionados com o balanço entre fosfato, cálcio e sua regulação hormonal. É um dos principais distúrbios que causam morbidade e diminuição da qualidade de vida de pacientes com DRC, incluindo aumento do risco de complicações cardiovasculares e de óbito por cardiopatia (MOE et al, 2006).

A partir de 2005, o documento apresentado pela *The Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) conclui que o termo OR deve ser empregado apenas para definir aspectos patológicos relativos ao tecido ósseo presentes em pacientes com DRC. O conceito atual denominado de Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica (DMO-DRC) é mais amplo que da OR, pois é considerado um distúrbio sistêmico que incorpora as alterações do tecido ósseo encontradas na OR,

aos demais aspectos clínicos como dor óssea e fratura sem causa definida, aspectos bioquímicos e aspectos relacionados ao estudo de imagens (MOE et al, 2006).

Para considerar o diagnóstico de DMO-DRC o paciente com DRC pode apresentar um ou mais das seguintes anormalidades: alterações no metabolismo do cálcio, fosfato, Pth e vitamina D (calcitriol); anormalidades ósseas de *turnover*, mineralização, volume ósseo, crescimento linear (em especial para crianças com DRC) e força (resistência do tecido ósseo); calcificações vasculares ou de outros tecidos moles. Não existe uma classificação específica e definida na literatura para a gravidade do DMO-DRC, mas existe um sistema descritivo que divide os pacientes em grupos pela presença ou ausência de cada um dos três aspectos avaliados. Desta forma o comprometimento de outros órgãos e funções afetados pelo DMO-DRC é relevante no contexto da investigação, acompanhamento e tratamento nos diversos estágios da DRC, tentando minimizar a evolução ou aparecimento de complicações que piorem o estado funcional e a qualidade de vida destes pacientes (MOE, et al 2006; MOORE et al, 2009; MACWAY et al, 2012; TANAKA et al, 2012).

A toxicidade urêmica e o estresse oxidativo são os principais fatores que afetam o metabolismo ósseo de pacientes com DRC, contribuindo para a complexa fisiopatologia do DMO-DRC. Em geral, a queda da função renal prejudica o metabolismo do cálcio e fosfato com conseqüente hiperparatireoidismo. Mesmo com taxas anormalmente elevadas de Pth na corrente sanguínea o paciente pode desenvolver uma resistência do tecido ósseo à ação deste hormônio, na uremia secundária à DRC, este evento possui mecanismos complexos, alguns ligados a toxinas carregadas por albuminas (não dialisáveis) e ao elevado estresse oxidativo do tecido ósseo e de todo o organismo do paciente com DRC (TANAKA et al, 2012).

Outras funções como o balanço ácido-básico (pH) e o estado nutricional do organismo são afetados na DRC. Estes dois fatores combinados com os aspectos da uremia e estresse oxidativo contribuem na indução de uma variedade de tipos diferentes de lesões no tecido ósseo (K/DOQI, 2002; MACWAY et al, 2012).

As avaliações clínicas de exames de imagem vêm crescendo atualmente para diagnóstico e acompanhamento do DMO-DRC. Os exames de *Dual energy X-ray absorptiometry* (DXA) e *High resolution peripheral quantitative computed tomography* (HR-pQCT) são os mais utilizados para a mensuração da densidade mineral óssea em todos os estágios da DRC (MOE et al, 2006; JAMAL et al, 2012).

Jamal *et al.* (2012) destacam a importância das avaliações da densidade mineral óssea na detecção de fatores de risco para fraturas e o acompanhamento da evolução da perda de densidade mineral óssea no DMO-DRC em estágio 3 a 5.

O uso de radiografias simples atualmente é restrito para a detecção de anormalidades estruturais do esqueleto na rotina clínica do paciente adultos com DRC. Em pacientes pediátricos seu uso é útil e de baixo custo para o acompanhamento do crescimento ósseo. Para o diagnóstico de calcificações vasculares, principalmente na região de aorta abdominal, é um parâmetro de importância clínica pelo rápido diagnóstico e baixo custo operacional (MOE et al, 2006).

Para os achados histopatológicos do tecido ósseo existe uma classificação em que inclui a avaliação do *turnover* ósseo, da mineralização e do volume ósseo (sistema TMV). A avaliação do *turnover* ósseo (T) considera a razão entre a formação do tecido ósseo em relação a sua absorção. As alterações ósseas são classificadas como sendo de baixo ou alto *turnover* ósseo. Os distúrbios de alto *turnover* ósseo se referem à maior taxa de reabsorção óssea em relação à formação e a de baixo *turnover* ósseo se caracterizam pela diminuição da formação de matriz colágena para calcificação (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; MOORE et al, 2009; MACWAY et al, 2012).

A avaliação da mineralização (M) considera a razão entre tecido osteóide (matriz colágena) com e sem mineralização e sua relação com o tempo para mineralização. Esta pode estar normal ou diminuída. O volume ósseo (V) é avaliado pela razão entre volume ósseo e volume do tecido em áreas de osso trabecular. Este pode estar normal, aumentado ou diminuído. Este componente também inclui avaliação da espessura e porosidade da área cortical do osso em estudo (MOE et al, 2006; MACWAY et al, 2012).

A combinação dos resultados de todas as avaliações do sistema TMV compõe a caracterização da OR e do tipo de manifestação histopatológica que o tecido ósseo do paciente apresenta. Estas combinações produzem quatro padrões de doença óssea: osteíte fibrosa, osteomalácia, doença adinâmica e doença óssea mista (MACWAY et al, 2012).

Para a caracterização do DMC-DRC utiliza-se em complemento à análise histopatológica do tecido ósseo (sistema TMV), o estudo das anormalidades do

metabolismo ósseo e mineral. Estas são caracterizadas por complexas alterações no sistema fisiológico hormonal que controla a homeostase de cálcio e fosfato.

São três os hormônios chave para entender os aspectos fisiopatológicos do DMO-DRC, Pth, Calcitriol e Fator de crescimento de fibroblasto 23 (FGF23). A ordem de aparecimento dos fatores que induzem ou exacerbam o DMO-DRC, sua hierarquia e inter-relações ainda não está bem esclarecida (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; MACWAY et al, 2012).

MacWay *et al.* (2012) publicaram revisão dos principais hormônios e apresentações fisiopatológicas relacionadas ao DMO-DRC. Estes autores descrevem que na DRC o acúmulo de fosfato piora progressivamente com a perda da capacidade dos néfrons em excretar este metabólito. Como consequência é observada a elevação dos níveis de fosfato sérico mesmo na presença de maiores concentrações de FGF23.

O FGF23 é um hormônio produzido pelos osteócitos, e osteoblastos em menor escala. Sua produção é estimulada pela hiperfosfatemia e calcitriol. À medida que a TFG diminui em consequência da DRC, ocorre aumento dos níveis séricos do FGF23 causado pelo aumento da secreção e redução da excreção renal deste hormônio. A concentração de FGF23 em pacientes com DRC em estágio inicial é cerca de 10 vezes maior que a normal e em pacientes em estágios mais avançados (que realizam hemodiálise) este valor pode alcançar 200 vezes o valor normal esperado para a população em geral. A hipótese mais aceita para este fato é que a elevação do FGF23 na DRC em estágio inicial aumenta a excreção de fosfato nos néfrons funcionantes, mantendo a normalidade dos níveis séricos de fosfato nesta fase. Este hormônio ainda pode inibir a produção de Pth pela glândula paratireóide (mantendo a concentração do Pth normal ou próximo ao normal nos estágios iniciais de DRC), diminuir a concentração de calcitriol por inibir e inativar a 1-alfa hidroxilase, enzima responsável pela síntese do calcitriol nos rins (KANSAL; FRIED, 2010; MACWAY et al, 2012).

MacWay *et al.* (2012) ainda descrevem que, com o avançar da DRC e a perda progressiva de néfrons, ocorre alterações negativas dos mecanismos regulatórios do cálcio, incluindo elevação do Pth na maior parte dos casos, menor síntese de calcitriol renal, aumento do fosfato intracelular renal, que reduz a eficácia da 1-alfa hidroxilase, piorando ainda mais a deficiência de calcitriol no organismo. A deficiência do calcitriol diminui a absorção intestinal de fosfato (fator benéfico por

reduzir a hiperfosfatemia da DRC) e do cálcio (efeito deletério na DRC por piorar a hipocalcemia) da dieta. A hipocalcemia ocorre desta forma, pela diminuição da reabsorção de cálcio pelos túbulos renais e da absorção de cálcio intestinal. Esta condição aumenta a secreção de Pth por estímulo a receptores sensíveis ao cálcio nas células da paratireóide, assim como à redução da expressão de receptores de calcitriol e FGF23, resultando inicialmente em aumento da síntese e secreção de Pth e na sequência desenvolvendo hiperplasia glandular. No início do processo estas mudanças são sensíveis à terapêutica com reposição de cálcio e calcitriol, mas a alteração nos receptores celulares da glândula paratireóide e outros fatores tornam as células da paratireóide insensíveis ao cálcio e calcitriol, resultando em um funcionamento autônomo da glândula que eleva em muito a concentração de Pth sérico, que induz a reabsorção óssea corrigindo a hipocalcemia e gerando hipercalcemia. Esta condição é denominada hiperparatireoidismo secundário (HPTS).

O aumento sérico do Pth circulante é o sinal clínico mais contundente da condição do HPTS, mostrando um aumento da atividade glandular da paratireóide que tenta compensar a baixa absorção de cálcio e tubular renal com conseqüente hipocalcemia, elevando a reabsorção óssea deste mineral (HRUSKA; TEITELBAUM, 1995; K/DOQI, 2002; FUKAGAWA et al, 2002; BARDIN, 2003).

2.2.1 Inter-relação entre regulação hormonal e modificações ósseas no DMO-DRC

As alterações no *turnover* ósseo produzidos no DMO-DRC estão associadas à regulação hormonal. O HPTS provoca ativação de osteoblastos e osteoclastos para formação e reabsorção óssea respectivamente, levando ao aumento do *turnover* ósseo. Este aumento de *turnover* é caracterizado por níveis séricos de Pth elevados que provocam maior reabsorção da matriz mineral do tecido ósseo com conseqüente aumento dos níveis séricos de cálcio e fosfato. A concentração sérica destes minerais pode ficar acima do normal e promover precipitação de cálcio e fosfato em tecidos e partes moles, como observado nas calcificações vasculares e suas conseqüências patológicas para o paciente com DMO-DRC. Com o avançar do DMO-DRC há fibrose medular e o aparecimento da lesão óssea de alto *turnover* denominada Osteíte fibrosa (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; OTT, 2008; MOORE et al, 2009; MACWAY et al, 2012).

As lesões do tecido ósseo podem levar à diminuição da expressão do receptor par o hormônio Pth nas células osteoblásticas e osteoclásticas, gerando resistência destas células à ação hormonal com o avançar das lesões. Este fato resulta em retorno do *turnover* ósseo a valores normais ou até mesmo abaixo do normal, mesmo em altos níveis séricos de Pth em alguns pacientes (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; OTT, 2008; MOORE et al, 2009; MACWAY et al, 2012).

Quando não há ocorrência de HPTS os níveis de Pth encontram-se normais ou reduzidos, o *turnover* ósseo tende a ser baixo ou muito baixo. O baixo *turnover* ósseo está relacionado a vários fatores humorais secretados pelos rins e também pela resistência óssea à ação do Pth. Esta condição caracteriza a lesão óssea encontrada na Doença Adinâmica. Além da forma intrínseca de desenvolvimento de baixo *turnover* ósseo na DRC, existem fatores de risco comuns para a doença adinâmica, que são idade, presença de diabetes *mellitus*, pacientes que realizam diálise, excessiva supressão do Pth por meio de terapêutica de reposição de cálcio e calcitriol. Quando o *turnover* ósseo é baixo e ocorre balanço positivo de cálcio (hipercalcemia por suplementação, por exemplo), o osso não consegue tamponar este excesso de cálcio que pode precipitar e gerar calcificações de tecidos moles, assim como nas condições de alto *turnover* (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; OTT, 2008; MOORE et al, 2009; KANSAL; FRIED, 2010; MACWAY et al, 2012).

Pode-se concluir que tanto as alterações de alto *turnover* e de baixo *turnover* ósseo são fatores primordiais no desenvolvimento de calcificações de partes moles extraesqueléticas no DMO-DRC, pois ocorrem em pacientes com anormalidades nos níveis de cálcio e mesmo naqueles que porventura recebem reposição do mesmo, sendo, desta forma, um importante alvo diagnóstico e acompanhamento clínico em pacientes com DRC (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; OTT, 2008; MOORE et al, 2009; MACWAY et al, 2012).

A Osteomalácia é uma forma de lesão óssea que aparece na OR, sendo classificada como uma doença de baixo *turnover* ósseo. Está relacionada com distúrbio de mineralização da matriz óssea colágena. A mineralização óssea primária ocorre pela deposição de hidroxapatita na matriz colágena, que é dependente da atividade osteoblástica, do balanço de cálcio e fosfato e da ação de uma diversidade de fatores intrínsecos e extrínsecos ao tecido ósseo. A deficiência de calcitriol, de cálcio da dieta e de exposição à luz solar são fatores que podem influenciar

negativamente a mineralização, mas podem ser facilmente corrigidos. A acidose metabólica é o principal fator descrito na literatura que influencia negativamente a mineralização óssea no paciente com DRC (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; OTT, 2008; MOORE et al, 2009; MACWAY et al, 2012).

A perda de massa óssea é outro fator de interrelação entre regulação hormonal e lesões do tecido ósseo. Esta é relativa à maior absorção e menor formação de tecido ósseo e aparece em pacientes com altos níveis séricos de Pth (HPTS; alto *turnover* ósseo). A massa óssea da região trabecular pode estar anormalmente aumentada ou diminuída e a região de osso cortical mais frágil, pelo aumento da porosidade e diminuição da espessura desta região (KANSAL; FRIED, 2010; MACWAY et al, 2012).

O hipogonadismo é um fator que aparece em homens e mulheres com DRC e influencia a diminuição da formação óssea. O estado de inflamação crônica associada à deficiência nutricional também contribuem para perpetuar a perda de massa óssea na DRC (MOE et al, 2006; MACWAY et al, 2012).

Desta forma, é recomendado que o DMO-DRC deva ser investigado e tratado em pacientes adultos que apresentem TFG abaixo de 60 mL/min e pediátricos com TFG inferior a 89 ml/min. Na rotina da prática clínica devem-se investigar os níveis séricos de Pth, calcitriol, fosfato e cálcio para diagnóstico e acompanhamento da evolução da doença de alto e de baixo *turnover*. As alterações patológicas do tecido ósseo devem ser investigadas por meio de biópsia óssea principalmente naqueles pacientes que apresentarem dor óssea ou fratura sem causa definida. A recomendação de se investigar o DMO-DRC nos estágios iniciais favorece o tratamento e a prevenção de complicações associadas a este distúrbio (K/DOQI, 2002; MOE et al, 2006; OTT, 2008; MOORE et al, 2009; MACWAY et al, 2012; TANAKA et al, 2012).

2.3 Isquemia e Reperfusão Renal

A lesão por isquemia e reperfusão pode ser definida como toda alteração devida à privação e re-estabelecimento do suprimento de oxigênio aos tecidos e órgãos. Trata-se de um fenômeno complexo que envolve não apenas os efeitos intracelulares, mas também uma lesão inflamatória. Pesquisas em modelos animais

demonstraram que as consequências da isquemia/reperfusão dependem da duração, resultando em alterações bioquímicas e necrose celular. Os rins mantêm a auto regulação da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) independente das mudanças da pressão arteriolar, enquanto a pressão arterial sistêmica flutua entre 80 e 180 mmHg, a TFG permanece constante. Em condições fisiológicas o córtex renal, onde se encontra a maioria dos glomérulos (unidades de filtração), recebe a maior parte do fluxo renal, e a região medular recebe em torno de 10% (THOMPSON et al, 2007).

Durante a isquemia renal a diminuição do fluxo sanguíneo não é uniforme, sendo mais proeminente na região medular que no córtex renal. Quando o suprimento de sangue torna-se interrompido transitoriamente, os níveis de oxigênio são mantidos através da redução da TFG e transportes de solutos nos túbulos renais. Esse mecanismo protetor é prejudicado pela produção das espécies reativas de oxigênio (EROS), que causa uma diminuição ainda maior do fluxo sanguíneo medular. O aumento na produção de EROS leva a uma lesão endotelial durante a reperfusão, responsável por uma cascata de eventos lesivos ao tecido renal. Além disso, a consequente resposta inflamatória também leva à congestão vascular que se propaga no ambiente hipóxico e reduz a capacidade de limpeza dos radicais tóxicos. Assim a região corticomedular é a região renal mais vulnerável a lesão com a contínua hipoperfusão (SUTTON, 2009).

Dessa forma, a hipoperfusão contínua leva a alterações vasculares que incluem desprendimento celular da monocamada endotelial, resultando em aumento da permeabilidade da barreira endotelial vascular e reatividade. A resposta inflamatória gera um aumento de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1, P-e e E-selectina), que estão relacionadas ao aumento da injúria renal durante a isquemia (LEGRAND et al, 2008).

Esses fatores em conjunto criam um ambiente que levam a uma maior lesão tubular renal, diminuição TFG e função renal, levando conseqüentemente a DRC (MUNSHI et al, 2011).

A hipótese de hipóxia crônica foi formulada por Fine *et al.* (1998) *apud* Munshi *et al.* (2011) há mais de uma década atrás, com base em achados de biopsia renal em pacientes com DRC, e demonstraram rarefação acentuada dos capilares peritubulares. Sua hipótese propôs que a lesão glomerular primária leva a um fluxo reduzido, o que culmina em perda capilar peritubular. Esse fato cria um

ambiente hipóxico que produz uma resposta fibrótica, comprometendo ainda mais os capilares adjacentes. Outra perspectiva é que a lesão renal desencadeia uma resposta inflamatória que recruta citocinas, como fator transformador de crescimento e induz a transformação das células epiteliais e endoteliais renais para miofibroblastos, um processo chamado de transição epitelial mesenquimial, que leva a produção de fibroblastos e miofibroblastos, com lesão intersticial subsequente e atrofia (YOUHUA, 2010).

A principal característica histopatológica da doença renal crônica é a fibrose túbulo-intersticial, sendo que o grau de fibrose é o melhor preditor da progressão para a fase final da doença renal (SINHA et al, 2009). A perda da microvasculatura renal cria um ambiente hipóxico e produz a progressão da fibrose, rarefação dos capilares peritubulares, que pode ser observado em biopsia de modelos animais (KANG et al, 2002). Em um estudo com modelos animais observou-se uma relação direta entre rarefação capilar peritubular e o desenvolvimento de cicatrizes glomerular e túbulo intersticial, associado a uma redução permanente da densidade capilar peritubular após reversão da isquemia, sugerindo que a agressão isquêmica leva a um estado hipóxico crônico (BASILE et al, 2001).

As mitocôndrias são importantes alvos do processo isquemia/reperfusão. Dentro da mitocôndria ocorre uma diminuição do transportador NADH e da enzima ADP/ATP sintetase, aumento da enzima fosfolipase, acúmulo de cálcio e radicais livres produzidos pelas mitocôndrias. A associação dessas alterações pode ser responsável pela morte celular devido principalmente à reperfusão. Estudos recentes sobre a patogênese da isquemia renal fazem uma relação temporal entre os estágios clínicos e as alterações celulares. No rim exposto à isquemia, a depleção intracelular é intensa, ocorre produção de espécies reativas de oxigênio, lesão endotelial e ativação de mecanismos inflamatórios. Em seguida os mecanismos de proteção intrarrenal são solicitados e se a isquemia for interrompida pode ocorrer uma completa recuperação. Caso isso não ocorra, a cronicidade da hipóxia leva a DRC (DEVARAJAN, 2006; MEYER et al, 2011).

Como consequência a todas essas alterações no ambiente celular renal e cronicidade da isquemia/reperfusão, ocorre os sinais e sintomas característicos da DRC, conhecidos também como síndrome urêmica. Perdas de função renal de até 50% não se manifestam clinicamente, porém reduções maiores causam a Síndrome

Urêmica, caracterizada por um conjunto de sinais, sintomas e complicações que atingem praticamente todos os órgãos e sistemas do organismo (PALM et al, 2010).

2.4 Avaliação da Função e Lesão Renal

A avaliação da progressão da DRC é baseada em sinais, sintomas e história clínica do paciente. Em geral, os exames laboratoriais que avaliam a função renal tentam estimar a TFG, definida como o volume plasmático de uma substância que pode ser completamente filtrada pelos rins em uma determinada unidade de tempo. A TFG é uma das mais importantes ferramentas na análise da função renal, sendo também um indicador do número de néfrons funcionais. Como medida fisiológica, ela já provou ser o mais sensível e específico marcador de mudanças na função renal (SODRÉ et al, 2007).

Quando a TFG permanece abaixo de 75 ml/min e creatinina sérica 1,5 mg/dL em mulheres e 2,0mg/dL em homens geralmente é indicativo de DRC. A diálise é iniciada quando a TFG cai para 10 e 15ml/min e a creatinina sérica atinge 8 mg/dL (CHIKOTAS et al, 2006).

As manifestações clínicas da DRC são incipientes, silenciosas e se confundem com sinais clínicos de diversas outras morbidades, sendo frequentemente percebidas quando constatadas alterações em exames laboratoriais de rotina, como a uréia e, principalmente, a creatinina (MAGRO; VATTIMO, 2007).

A uréia é um metabólico nitrogenado, derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo 90% excretados pelos rins e o restante eliminado pelo trato gastrintestinal e pela pele. A principal utilidade clínica da uréia é a determinação em conjunto com a creatinina. A razão uréia/creatinina sérica pode indicar estados patológicos diferentes. Em valor abaixo do esperado ela pode ser encontrada em patologias como a necrose tubular aguda, baixa ingestão de proteínas, condições de privação alimentar ou redução da síntese de uréia por insuficiência hepática. A análise dessa razão elevada, com a creatinina dentro do valor de referência, indica processos que levam a diminuição do fluxo sanguíneo renal, aumento na ingestão proteica ou sangramento gastrintestinal; e com a creatinina acima do valor normal, denota processos obstrutivos pós-renais, como tumores ou estenose de vias urinárias (SODRÉ et al, 2007).

A creatinina é um produto residual da creatina e sua transformação acontece no tecido muscular, no qual 1% a 2% da creatina livre se converte espontânea e irreversivelmente em creatinina todos os dias. Assim, a quantidade de creatinina produzida é dependente da massa muscular e não apresenta grandes variações diárias, sendo filtrada livremente no glomérulo. Em termos gerais, 7%-10% da creatinina presente na urina é secretada. Apesar de algumas limitações do seu uso, a creatinina tornou-se um biomarcador quase universal para a avaliação da FG, sendo possível não só o diagnóstico de doença renal, como o monitoramento preciso da progressão da doença (KIRSZTAJN et al, 2011).

2.5 Exercício físico na DRC

A importância da atividade física para a manutenção da saúde é cada vez mais evidente. Em muitas partes do mundo, as atividades ocupacionais de grande parte da população são cada vez mais sedentárias. Nesses ambientes, a substituição de algum nível de lazer ou exercício programado pode conferir benefício para a manutenção da saúde (HENRIQUE et al, 2009).

No que diz respeito à DRC, não é claro em que medida o declínio da função muscular é um resultado direto das alterações relacionadas com a doença na fisiologia do músculo esquelético, em oposição à redução da atividade física e má nutrição. No entanto, um crescente consenso emergiu que a função muscular diminui decorrente de distúrbios que podem ser melhorados de forma independente das estratégias que abordem a doença primária subjacente (ADAMS; VAZIRI, 2006). Há um crescente corpo de evidências que o exercício físico programado pode trazer benefícios significativos.

Smart *et al.* (2013) destacam que a inatividade física é um fator de risco na DRC e um preditor de mortalidade cardiovascular. Pacientes em estágio terminal de DRC com pico de VO₂ inferior a 15,7 mg/Kg/min possuem alto risco de mortalidade, porém não há uma descrição precisa desta associação nos demais estágios da DRC. Entretanto, os resultados positivos de melhora de VO₂ nos pacientes com DRC em programas de atividade física, os ganhos de funcionalidade e capacidade física, a melhora do apetite e da qualidade de vida são as justificativas de maior relevância para a prescrição de modalidades de exercícios na DRC.

O exercício resistido é uma forma de treinamento de força contra uma resistência, usado para desenvolver a força e o tamanho dos músculos esqueléticos. Corretamente realizado, pode proporcionar significativos benefícios funcionais e de melhoria na saúde e bem-estar. O treinamento de resistência não deve ser confundido com musculação, levantamento de peso, que envolvem diferentes tipos de treinamento de força. Uma gama completa de movimento é importante no treinamento de resistência, porque a sobrecarga muscular ocorre apenas nos ângulos específicos comuns onde o músculo é trabalhado. O treinamento aeróbico (por exemplo, esteira ergométrica) é um exercício que melhora o consumo de oxigênio no metabolismo do corpo ou processos de geração de energia. Além disso, diminui a resistência à insulina, aumentam força e resistência muscular, melhora a flexibilidade, altera a composição corporal (particularmente aumenta a perda de gordura), e também diminui os fatores de risco para doença cardiovascular (AFSHAR et al, 2010).

Há muito interesse nos efeitos do exercício aeróbico e de resistência (força) na DRC. Estas medidas podem diminuir a morbidade e a mortalidade, reduzindo a inflamação, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial. Em algumas doenças crônicas a prática regular de exercício aeróbico e de resistência tem sido relatada como influência benéfica sobre citocinas inflamatórias, resistência à insulina, obesidade, doenças cardiovasculares, porém ainda não é claro se esses benefícios do exercício físico podem favorecer os pacientes com DRC. Em virtude disso é possível que a reabilitação renal ainda não seja usada de forma regular na prática clínica (MOINUDDIN; LEEHEY, 2008).

A DRC está associada com níveis circulantes aumentados de citocinas pró-inflamatórias e outros marcadores de inflamação. Neste sentido Castaneda *et al.* (2004), realizaram um estudo randomizado de 12 semanas de treinamento com exercício de resistência, 3 vezes por semana em 26 pacientes com DRC, analisando variáveis relacionadas ao tamanho e força muscular, concentrações séricas de proteína C-reativa e interleucina-6 antes e após a intervenção com exercícios e observaram uma diminuição destes fatores séricos além da hipertrofia muscular e aumento da força.

Em uma revisão realizada por Johansen e Painter (2012) constatou-se que o exercício físico aeróbico pode levar a uma diminuição da pressão sanguínea, níveis de colesterol e do estresse oxidativo indicado por diminuição nos produtos de

peroxidação lipídica. O exercício físico conduz também a uma menor proteínúria e um menor índice de esclerose glomerular em ratos após nefrectomia. Além disso, observou-se que nenhum estudo examinou o efeito do treinamento físico sobre as alterações da função renal com rigor suficiente para ser conclusivo, porém ressalta que nenhum estudo até hoje demonstrou um efeito negativo do exercício na progressão da DRC.

Segundo Adams e Vaziri (2006), o exercício físico pode causar alterações agudas na hemodiálise renal, o que pode resultar em uma queda transitória na taxa de filtração glomerular e retenção de fluidos em pacientes com DRC. No entanto essas alterações não parecem exacerbar uma disfunção renal preexistente. Por outro lado o exercício regular pode atenuar a degradação da proteína muscular e levar a uma melhor absorção dos aminoácidos essenciais e produção de proteína muscular, reduzindo a atrofia muscular e a perda deste componente pelos rins deficientes (IKIZLER, 2004).

Em um estudo realizado por Headley *et al.* (2002) durante 12 semanas, constatou-se que o treinamento físico levou a um aumento significativo na força de músculos dos membros inferiores em pacientes que realizavam hemodiálise. Além disso, histologicamente o treinamento de resistência levou a hipertrofia do músculo esquelético demonstrada por redução do número de fibras atroficas e aumento significativo nos tipos de fibras I e II (KOUID et all, 1998)

Em uma revisão de literatura realizada por Kosmadakis *et al.* (2010), sobre o efeito do exercício físico na DRC severa, constatou que o exercício aeróbico levou a uma melhora da função cardíaca (fração de ejeção, volume sistólico e débito cardíaco), redução da pressão arterial diastólica e sistólica, diminuição dos níveis de colesterol e triglicerídeos com incremento da lipoproteína de alta densidade (HDL) associado à diminuição da rigidez arterial, melhora dos sintomas de depressão e qualidade de vida. Em conformidade com esses achados clínicos na publicação para identificação precoce e tratamento da DRC do *Royal College of Physicians* (2008), encontra-se a recomendação para incentivar as pessoas com DRC a praticarem exercícios regularmente.

Um estudo demonstrou aumento significativo na eficiência da hemodiálise com o exercício aeróbico. Após uma sessão HD, uréia, creatinina, potássio e toxinas urêmicas são lentamente transferidas dos tecidos mal perfundidos (especialmente músculos inativos) para a circulação. Uma única sessão de exercício aeróbico reduz

o rebote da uréia, creatinina e potássio, possivelmente devido há perfusão aumentada do músculo esquelético (PARSONS et al, 2006).

Apesar da crescente evidência dos efeitos benéficos do exercício na DRC, não há protocolos específicos para a prática do exercício físico nesta população. Geralmente as pessoas com DRC devem ser instruídas a iniciar uma rotina de atividade física segundo o nível de aptidão física e condição clínica. Para pacientes que não possuam contra-indicação para a prática de exercício, o treinamento aeróbico deve ser praticado por 30 minutos com intensidade moderada durante 5 dias por semana. Pacientes com DRC mais severa devem iniciar o exercício com uma intensidade mais baixa e acumular múltiplas sessões de exercício durante o dia (10 minutos). O treinamento resistido deve ser gradual e ser praticado pelo menos 2 vezes por semana associado ao exercício de flexibilidade diariamente (JOHANSEN, 2008).

Os efeitos dos exercícios na DRC ainda não são conclusivos e há controvérsia na literatura. Uma recente revisão da base de dados da Cochrane publicada por Heiwe e Jacobson (2011) investigou os efeitos clínicos e funcionais do exercício físico na DRC. Dentre suas principais conclusões estão que: modalidade de exercício aeróbio de baixa ou alta intensidade provocam melhoras na capacidade de exercícios; exercícios resistidos prescritos isoladamente não melhoram a capacidade aeróbia de exercício; exercícios supervisionados promovem melhores benefícios que sem supervisão direta; a força muscular melhora com a prescrição de exercícios aeróbios e resistidos, porém os exercícios resistidos provocam maiores efeitos; melhora do equilíbrio hemodinâmico (diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso) com o treinamento com exercício aeróbios. Porém alguns efeitos são incertos e não totalmente esclarecidos como: efeitos sobre a albumina sérica é incerto; efeitos sobre a gordura corporal não é significativo; efeito sobre lipoproteínas é incerto; não foi encontrado efeito positivo ou negativo sobre a função do ventrículo esquerdo.

Porém a dose ótima de exercício, a individualização da prescrição nos diferentes estágios da DRC, os tipos de exercícios a serem prescritos não estão claramente descritos na literatura de forma a direcionar a prescrição de exercícios para esta população (SMART et al, 2013).

O efeito de exercício físico no DMO-DRC não é citado em nenhuma das revisões que tratam dos efeitos dos exercícios na DRC. Existem relatos na literatura

mostrando a eficácia do exercício físico aeróbio na melhora da densidade mineral óssea, na melhora de parâmetros morfométricos de taxa de mineralização óssea em um modelo animal de Osteoporose após 16 semanas de exercício em esteira rolante (CHEN et al, 1994).

Kelley *et al.* (2000) publicaram uma meta-análise sobre o efeito do exercício físico na densidade mineral óssea. Os autores destacam que há falta de ensaios clínicos randomizados e que os resultados muitas vezes não são estatisticamente significativos. Encontrou que para o efeito geral do exercício na densidade mineral óssea considerando todas as regiões avaliadas houve aumento de 2% nos grupos tratados comparados com controles. Analisando pela idade foi encontrado aumento significativo de 6,7% na densidade em homens acima de 31 anos, sem efeito para população abaixo de 30 anos. Analisando pelo local estudado foi encontrado melhora significativa de 10% na densidade para a área da região lombar e 5,5% para a região femoral.

Outra meta-análise publicada por Kelley *et al.* (2013) mostrou efeito positivo na melhora da densidade mineral óssea do colo do fêmur de homens. As modalidades referidas na meta-análise incluíam combinação de exercícios aeróbios e resistidos em sessões de 3 a 5 vezes por semana com duração mínima de 8 meses. Porém não foram encontrados estudos que referiam o efeito do exercício no DMO-DRC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Geral

Analisar os efeitos da aplicação de exercício físico aeróbio e resistido nas características bioquímicas e morfométricas do tecido ósseo em modelo animal de doença renal crônica em coelhos Nova Zelândia branco.

3.2 Objetivos Específicos

Desenvolver um modelo animal de DRC em coelhos Nova Zelândia branco.

Descrever o efeito da aplicação de um protocolo de exercício físico aeróbio e resistido, neste modelo, analisando:

- características morfométricas do tecido ósseo trabecular;
- densidade óssea;
- parâmetros bioquímicos relativos ao metabolismo ósseo;
- a comparação dos efeitos do exercício resistido com os efeitos do exercício aeróbio no modelo estudado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Este estudo foi do tipo experimental com o uso de modelo animal de doença. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS, sob parecer nº 280 (ANEXO A).

4.2 Amostra

Foram adquiridos 30 coelhos machos, da variedade Nova Zelândia Branco, do criadouro da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Dois coelhos foram a óbito na primeira semana de adaptação ao novo ambiente. Para a pesquisa foram utilizados 28 coelhos, com peso entre 2,5 e 3 kg, que ficaram acomodados em gaiolas individuais, ambiente coberto com exaustão e ventilação natural, expostos ao ciclo de luz natural e com livre acesso à água e ração comercial.

Foram submetidos à cirurgia de isquemia e reperfusão renal unilateral um total de 28 coelhos. Nenhum foi a óbito antes da 6ª semana de pós-operatório.

Um (01) coelho foi excluído da pesquisa logo após a cirurgia por não apresentar o rim esquerdo, apenas o rim direito, o que inviabilizou a inclusão deste animal no protocolo de pesquisa. Desta forma para o seguimento da pesquisa e a divisão dos grupos experimentais (descritos a seguir) havia 27 animais ao total.

Ao todo, 11 animais foram a óbito no seguimento da pesquisa, 10 animais que compuseram os grupos experimentais, mais 01 animal que já havia sido excluído. Todos os animais que foram a óbito foram excluídos das análises finais por inviabilidade de coleta de amostras para análise.

4.3 Delineamento Experimental

Os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos durante o seguimento da pesquisa:

- Primeira coleta de sangue pré-operatória à cirurgia de isquemia e reperfusão renal para indução de DRC;
- Cirurgia para acesso ao rim esquerdo submetido à isquemia e reperfusão para indução de DRC;
- Segunda coleta de sangue após 6 semanas de pós-operatório, nas quais os coelhos permaneceram sob observação e cuidados diários;
- Primeira radiografia dos membros posteriores no dia seguinte à segunda coleta de sangue;
- Distribuição dos animais em 3 grupos experimentais para o protocolo de exercícios aeróbio e resistido: grupo controle sedentário (GC), grupo exercício aeróbio (GA) e grupo exercício resistido (GR);
- Segunda radiografia de membros posteriores após 4 semanas de intervenção com o protocolo de exercícios.
- Terceira coleta de sangue após 5 semanas de intervenção com o protocolo de exercício aeróbio e resistido (pré-eutanásia).
- Eutanásia e coleta de material para histopatologia.

A figura 01, abaixo, apresenta as fases do delineamento experimental, relacionando os procedimentos às variáveis coletadas em cada etapa.

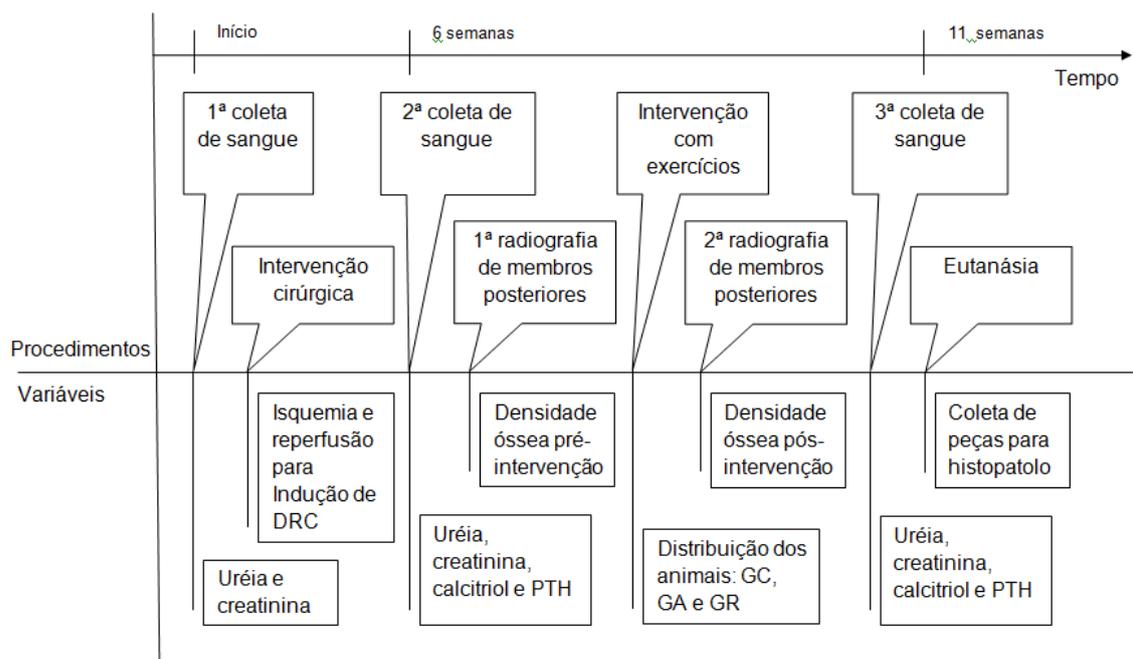


Figura 01: Série temporal dos procedimentos e variáveis coletadas no delineamento experimental. GC = grupo controle sedentário; GA = grupo exercício aeróbio; GR = grupo exercício resistido.

4.3.1 Distribuição dos Grupos

Após 6 semanas de observação pós-operatória (Figura 01), havia 27 animais que foram distribuídos de maneira randômica em 3 grupos como descrito a seguir:

- Grupo Controle (GC): formado por 9 animais que receberam cuidados diários de higiene, alimentação e água. Este grupo permaneceu sedentário, sem praticar nenhuma atividade física.
- Grupo Exercício Aeróbico (GA): formado por 9 coelhos que receberam cuidados diários de higiene, alimentação e água. Este grupo realizou exercício aeróbico em esteira elétrica.
- Grupo Exercício Resistido (GR): formado por grupo de 9 coelhos que receberam cuidados diários de higiene, alimentação e água. Este grupo realizou treinamento em rampa de madeira.

Ao final da intervenção com exercícios havia 17 animais que compuseram as análises finais, sendo 6 para o grupo controle, 5 para o grupo aeróbio e 6 para o grupo resistido.

4.4 Procedimentos da Pesquisa

4.4.1 Primeira coleta de sangue: momento pré-cirurgia

A primeira coleta de sangue (Figura 01) foi realizada pela manhã, no mesmo dia e imediatamente antes do procedimento cirúrgico (momento pré-operatório), após a utilização da seguinte medicação pré-anestésica: acepromazina (0,05g/Kg) associado a butorfanol (1mg/Kg) por via intramuscular 15 minutos antes da anestesia. Foram analisados os parâmetros iniciais de uréia e creatinina dos coelhos antes da indução da DRC para usar como valor de referência. Na literatura é encontrado valor de $36,4 \pm 10,6$ mg/dL para a uréia e de 0,5 a 1,5 mg/dL para a creatinina (EMANUELLI et al, 2008).

A coleta de sangue foi obtida por punção cardíaca, realizada pelo veterinário responsável técnico da pesquisa. Para coleta utilizou-se os seguintes materiais: seringa descartável, agulha 25/7 (descartada em local apropriado), tubo para coleta

de sangue com anticoagulante (heparina), algodão e álcool 70%, luvas de procedimento.

4.4.2 Cirurgia: Isquemia e Reperusão Renal Unilateral

A indução da lesão renal foi realizada utilizando a técnica de isquemia e reperusão renal unilateral do rim esquerdo (Figura 01). O procedimento foi realizado no mesmo dia da primeira coleta de sangue.

A medicação utilizada para a anestesia foi: anestésico dissociativo (Cloridrato de tiletamina e Cloridrato de Zolazepam) na dose de 5mg/Kg por via intramuscular.

Para acesso ao rim esquerdo foi realizada laparotomia no flanco esquerdo realizada por incisão longitudinal de 5 cm. Após localização do hilo renal realizou-se clameamento do pedículo vascular do rim esquerdo. Este permaneceu em isquemia por vinte minutos cronometrados. A figura 02, abaixo, mostra a alteração de coloração do rim esquerdo após 20 minutos de isquemia.



Figura 02: Coloração do rim esquerdo após 20 minutos de isquemia com clameamento do pedículo renal.

Após esse período procedeu-se a remoção dos clampes e a reperusão do rim, com posterior síntese por planos (fio de mononylon 4-0).

A cirurgia para induzir o modelo animal de doença renal foi realizada no centro cirúrgico de pequenos animais do Hospital Veterinário do Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN. O procedimento foi realizado pelo veterinário responsável técnico da presente pesquisa e a equipe de veterinários do local da pesquisa.

Ao término da cirurgia os coelhos foram acomodados em suas respectivas gaiolas e receberam administração de analgésico butorfanol (1mg/Kg) durante 3 dias e cuidados com a ferida cirúrgica. Após o procedimento cirúrgico os animais permaneceram em observação por 6 semanas, recebendo cuidados diários de higiene e livre acesso à ração comercial e água.

4.4.3 Segunda Coleta de Sangue: momento pré-exercício

Após 6 semanas de observação, os coelhos foram submetidos à nova coleta de sangue (Figura 01), realizada no período da manhã, nos moldes da primeira coleta. Foram analisados dados de uréia, creatinina, paratormônio e calcitriol após a indução da DRC.

As variáveis de paratormônio e calcitriol foram comparadas com valor de referência na literatura. Para a comparação foi usada a média do intervalo de normalidade referenciado pela literatura, sendo para o paratormônio 52,0 pg/ml e para o calcitriol de 48,0 pg/ml (WARREN et al, 1989).

4.4.4 Primeira radiografia de membros posteriores: momento pré-exercício

No dia seguinte ao procedimento da segunda coleta de sangue, foi realizada a radiografia de membros posteriores dos coelhos (Figura 01). Os animais foram posicionados na mesa de exames em posição ventral para pelve e membros, a 1 metro de distância da fonte de radiação (Figura 03).



Figura 03: Imagem mostrando radiografia de membros posteriores dos coelhos (momento pré-intervenção)

A técnica utilizada para todos os animais foi 65 Kv com 0,05 segundos de exposição. Os filmes foram revelados em reveladora automatizada. O aparelho utilizado é da marca MEDITRONIX BR-100 e a reveladora automática da marca MACROTEC MX – 2. Todos os exames foram realizados pelo técnico responsável pelo Laboratório de Radiologia do Hospital Veterinário do Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN.

4.4.5 Protocolo de exercício físico

Os grupos GA e GR foram submetidos a 4 semanas de treinamento com exercícios físicos aeróbio e resistido, respectivamente. Os exercícios foram realizados todos os dias, no período da tarde, após as 16 horas. Os coelhos foram previamente adaptados (uma semana de adaptação antes do início do protocolo) aos exercícios e equipamentos antes do início do treinamento.

O treinamento com exercício aeróbio dos animais foi realizado utilizando esteira elétrica, marca *Movement Technology*, sem inclinação, com velocidade de 1 km/h, baseada no experimento de Mueller *et al.* (1998) que consideram esta velocidade como compatível com intensidade moderada de atividade aeróbia.

Para direcionar os animais durante o exercício foi confeccionado uma caixa de madeira com quatro repartições. Esta foi fixada em cima da lona da esteira e cada coelho ocupava uma repartição. Desta forma os coelhos foram direcionados a seguir uma única direção durante o exercício (Figura 04A).

Os coelhos realizaram o treinamento por 15 minutos, com frequência de 5 vezes por semana durante 4 semanas. O exercício era interrompido quando os animais completavam o tempo proposto ou apresentavam sinais de exaustão (dificuldades para manter o ritmo da passa e incapacidade de controlar as patas traseiras).

Para a realização do treinamento resistido, foi utilizada uma rampa confeccionada em madeira medindo 2,20 x 1,10 metros e inclinação de 45° (Figura 04B). Para que os animais realizassem a subida da rampa utilizou-se o estímulo tátil na região glútea. O modelo da rampa foi baseado no estudo de Hornberger e Farrar (2004) que descreveram protocolo de subida de escada para ratos como modelo de exercício resistido. Foram realizadas 15 repetições, com intervalo de 1 minuto entre as repetições, com frequência de 5 vezes por semana, durante 4 semanas.

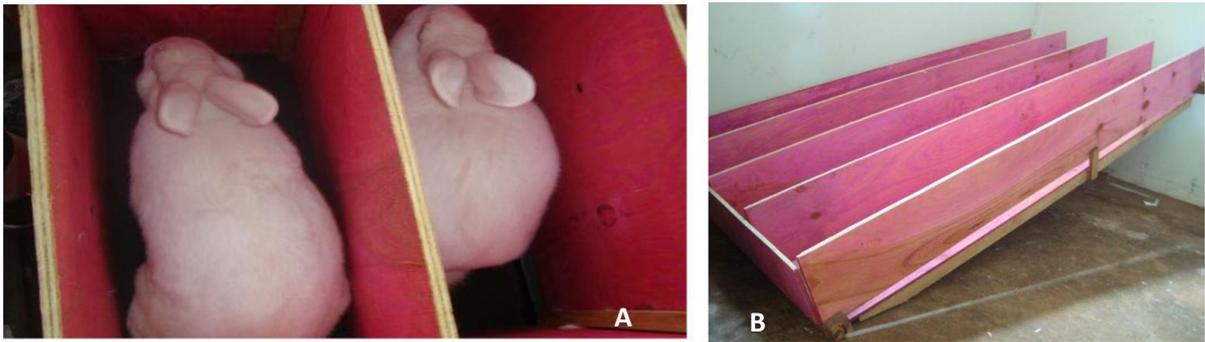


Figura 04: Em A - animais dentro da caixa de contenção colocada sobre a lona da esteira elétrica durante a prática de exercício aeróbio. Em B - rampa de madeira utilizada para a prática de exercício resistido com os animais.

Para a adaptação ao treinamento aeróbio os animais foram colocados na esteira rolante e a velocidade foi gradualmente aumentada para adaptação da marcha sem interrupção do ritmo. A adaptação era interrompida antes dos animais completarem 3 minutos. O tempo foi aumentado gradualmente durante a semana de adaptação até que os animais completassem o tempo de 3 minutos sem interromper o ritmo da passada.

Para adaptação do treinamento resistido os coelhos foram colocados na rampa e estimulados a subir. Durante a semana, o treinamento para a subida da rampa iniciou de forma incompleta (os animais não completavam a distância total ou retornavam em sentido contrário) e continuou diariamente até que os animais conseguissem subir todo o comprimento da rampa sem retornar em sentido oposto.

4.4.6 Segunda radiografia de membros posteriores: momento pós-exercício

A segunda radiografia de membros posteriores foi feita nos moldes da primeira, como descrito anteriormente. Esta foi realizada no dia anterior (Figura 01) à eutanásia dos animais, após o final do período de aplicação do protocolo de exercício.

4.4.7 Terceira coleta de sangue: momento pós-exercício

A terceira coleta de sangue (Figura 01) foi realizada no dia da eutanásia (descrito no item 4.4.8 a seguir), após o final do período de aplicação do protocolo de exercício aeróbio e resistido. Os procedimentos e instrumentos de coleta seguiram

os moldes das coletas anteriores. Foram analisados dados de uréia, creatinina, paratormônio e calcitriol.

4.4.8 Eutanásia

A eutanásia dos animais (Figura 01) foi realizada mediante dose letal de barbitúrico intravenoso (100mg/kg). Após a retirada das peças anatômicas para estudo, as demais estruturas foram descartadas em lixo biológico específico.

4.5 Coletas de Amostras

Após eutanásia dos animais, foram retiradas amostras de peças anatômicas para histopatologia. Neste estudo foram analisadas as peças do rim direito, rim esquerdo e tibia direita.

4.6 Processamento do material histopatológico

As peças dos rins foram mergulhadas em formol a 10% e então processadas para blocagem em parafina. Em seguida as peças foram cortadas em micrótomo na espessura de 5 µm e coradas com Hematoxilina e Eosina (similar ao Quadro 01, passo 2 a seguir).

As peças de tecido ósseo foram armazenadas em formol a 10% por 3 meses e depois enviadas ao Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina.

Para preparação das lâminas de tecido ósseo para análise de morfometria óssea, o tecido da tibia direita foi submetido à descalcificação em solução de ácido nítrico 5% por 30 dias e depois processadas para blocagem em parafina. Os detalhes do processamento estão descritos no Quadro 01, abaixo. A seguir foram realizados cortes semiseriados das regiões proximal e medial do osso, cortadas em micrótomo na espessura de 6 micrômetro e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

Quadro 01: Procedimentos para confecção das lâminas de tecido ósseo

Passos do processamento das peças ósseas:

1. Descalcificação:

- a. Limpeza dos ossos em água corrente com a ajuda de uma pinça, para que se retire todo e qualquer resto de tecido muscular e tendíneo.
- b. Corte da peça em tamanhos menores e colocação em solução de Ácido Nítrico a 5% cobrindo-as por completo. Troca da solução a cada 2 dias. Manter em solução por no mínimo 30 dias.
- c. Testar a maleabilidade com agulha de insulina (0,45x13 – hipodérmica) penetrando nos ossos, os mesmos devem estar moles, assim a agulha deve entrar de forma que não apresente nenhuma dificuldade, não forçar contra a peça para não causar distorção ou mesmo lesão ou rachadura no osso.

2. Preparo das lâminas para HE:

- a. Desidratação: 1 banho em álcool 70%, 3 banhos em álcool 95%, 4 banhos de álcool 100% por 30 minutos cada.
- b. Diafanização: Xilol em 4 banhos de 30 minutos cada, sendo os 3 primeiros banhos em temperatura ambiente e o último em estufa a 60°C.
- c. Inclusão em parafina com 4 banhos de 30 minutos cada, sendo que o último banho deve ser em parafina limpa e nova.
- d. Taquiamento e corte em micrótomo com espessura de 6 µm em sistema semiseriado por seis lâminas contendo 5 cortes em cada lâmina.
- e. Secagem em estufa por 24 horas.
- f. Reidratação do tecido para coloração com 2 banhos de Xilol de 10 minutos cada, 1 banho de álcool 100%, 1 banho de álcool 95% e 1 banho de álcool 70% por 5 minutos cada.
- g. Colocar as lâminas em Hematoxilina por 30 segundos. Colocar as lâminas em água corrente por 5 minutos. Lavar em água destilada (lavar e limpar a lâmina) por 5 minutos.
- h. Colocar as lâminas em Eosina por 40 segundos. Passar em água destilada rapidamente. Passar em álcool 70% rapidamente.
- i. Colocar as lâminas em álcool 95% por 5 minutos, após em álcool 100% por 10 minutos.
- j. Colocar as lâminas em Xilol + Álcool (na proporção de 1 para 1) por 5

minutos

- k. Colocar as lâminas para diafanização em xilol puro por 10 minutos.
- l. Colocar as lâminas em xilol puro por 10 minutos e proceder à colagem de lamínula com Bálsamo do Canadá.
- m. Aguardar 24 horas para secagem.

4.7 Análises histológicas

As lâminas histológicas do tecido renal foram avaliadas por patologista através de microscópio eletrônico *Nikon Eclipse E 200*. As análises das lâminas foram utilizadas para constatar a presença ou ausência de lesões renais características da DRC.

A análise das lâminas ósseas foi realizada por morfometria do tecido ósseo da região trabecular mediante contagem dos espaços intertrabeculares por área de $0,25 \text{ mm}^2$ nas imagens de fotomicroscopia, utilizando software *Image J 1.46r*, *Waune Rasband, National Institutes of Health, USA*.

Para a análise da morfometria foi realizada a captura de 30 imagens de fotomicroscopia para a região proximal do osso e 30 imagens para a região medial do osso de cada peça. Os espaços intertrabeculares de cada imagem foram contados e computados em planilha Excel. Para aceitar os dados para análise estatística foi calculado o coeficiente de variação do número de espaços intertrabeculares em cada conjunto de imagens de cada peça para a região medial e para a região proximal separadamente. Foi aceito o conjunto que obtivesse coeficiente de variação inferior a 30%. Após este procedimento foi calculado a média dos espaços intertrabeculares em cada região e para cada peça. Este dado foi usado para comparação estatística entre os grupos.

O procedimento de coleta de dados do número de espaços intertrabeculares foi realizado em lâminas cortadas para análise da morfometria da área trabecular em vista no plano transversal e em vista no plano longitudinal da cada peça óssea.

Para a captura das imagens foi utilizado microscópio Olympus BX43 System Microscope, acoplado à câmera digital. O software utilizado para captura das imagens foi *Cam Driver 2.0.13.1*; *QCapture Suite 2.9.13*. Todas as imagens da área trabecular foram capturadas com aumento de 200x.

4.8 Análise da radiografia de membros posteriores

As radiografias dos membros posteriores foram digitalizadas no escâner SCANION A3 e acoplado ao software SCANExpress USB A3, com kit transparência de 2 luzes e resolução de 100 dpi (Figura 05).

A densidade mineral óssea foi analisada por meio de escala de tons de cinza por ponto pixel, utilizando software Digora para Windows, versão 2.5. Este software possui uma ferramenta de “análise de densidade” por meio de escala de tons de cinza expressas em pixel, nas imagens digitalizadas, nas quais o preto é pontuado em 0 (zero) e o é branco pontuado em 255.

As imagens digitalizadas não sofreram nenhum tipo de alteração ou “tratamento digital” para alterar sua qualidade.

Para a análise da densidade, foi delimitada uma área na região proximal da tíbia direita de aproximadamente $1,4 \text{ mm}^2$, marcada na imagem digitalizada utilizando os campos de demarcação de área do próprio software (Figura 06), com metodologia similar ao descrito por Souza *et al.* (2004).

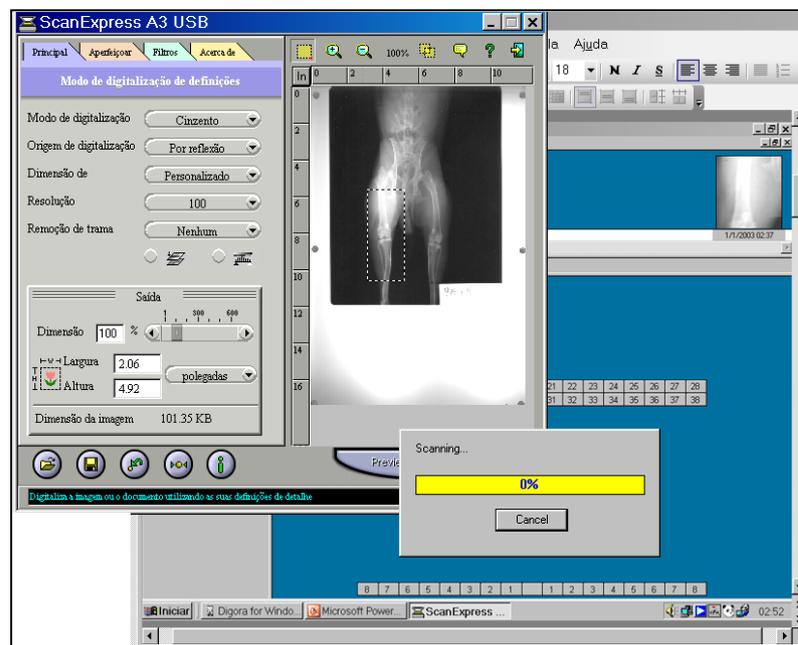


Figura 05: Imagem capturada do software durante a digitalização da radiografia de membros posteriores

A área demarcada foi anotada conforme as coordenadas da tabela de dados do software e repetida três vezes para cada imagem. A cada demarcação da área em uma mesma imagem, as variáveis de média de densidade, valor máximo de

densidade e valor mínimo de densidade para cada área foi anotado para estudo (dados da área demarcada em vermelho na imagem).

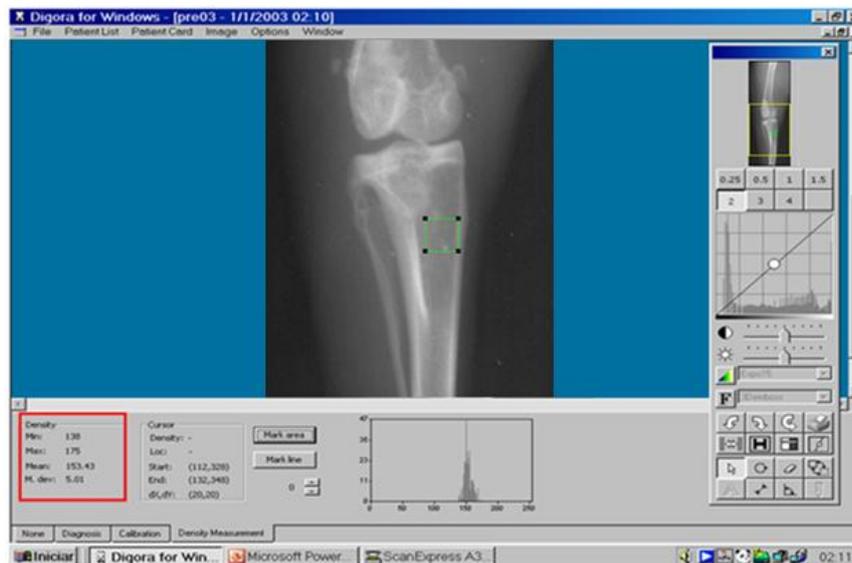


Figura 06: Imagem capturada do software de análise de dados de densidade óssea.

Após estes procedimentos, foi feita a média das 3 observações para cada variável coletados por imagem e este dado foi utilizado para análise estatística.

4.9 Análise Estatística

Os resultados das variáveis qualitativas de descrição de achados histopatológicos foram expressos em porcentagem. Para resumo das variáveis quantitativas, os resultados foram expressos em médias e desvios-padrão.

A avaliação do efeito do tempo (pré e pós-intervenção cirúrgica e intervenção com exercícios), do efeito da intervenção com exercícios (grupos controle, exercício aeróbio e exercício resistido) e da interação entre estes fatores, em relação às variáveis bioquímicas da uréia, creatinina, calcitriol e Pth, bem como as variáveis de densidade óssea, foi realizada por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de *Tukey*.

A comparação entre os grupos experimentais, em relação às variáveis quantitativas que possuíam apenas um momento de coleta (morfometria do osso trabecular), foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste

de *Tukey*. A comparação entre os locais de mensuração da morfometria óssea (medial e proximal da tíbia) foram realizadas pelo Teste t pareado.

Para comparação das variáveis bioquímicas do Pth e calcitriol com o valor de referência na literatura, foi utilizado o teste t de *Student* para uma amostra.

Foi realizada correlação entre as variáveis bioquímicas do calcitriol e Pth com a variável bioquímica da creatinina e com as variáveis de densidade óssea por meio do teste de correlação linear de *Pearson*.

Os resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva sob a forma de tabelas. A nomenclatura, utilizada para nominar o momento de coleta de dados nas tabelas, está anotada como: 1ª coleta, que representa o momento anterior à cirurgia de isquemia e reperfusão renal; 2ª coleta, que representa o momento após 6 semanas de cirurgia imediatamente antes do início da intervenção com o protocolo de exercício; 3ª coleta, que representa o momento após a aplicação do protocolo de exercício, imediatamente anterior à eutanásia.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico *SigmaStat*, versão 3.5, considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Neste estudo foi desenvolvido modelo animal de DRC em coelhos nova zelândia branco e foram analisadas as variáveis bioquímicas (uréia, creatinina, paratormônio e calcitriol), de densidade óssea (valor mínimo, máximo e média de densidade óssea) e de morfometria óssea (número de espaços intertrabeculares) neste modelo submetido a protocolo de exercício físico (aeróbio ou resistido).

O modelo animal de DRC em coelhos nova zelândia branco apresentou boa sobrevida e possibilitou coletas de sangue consecutivas sem comprometer a volemia do animal.

A técnica de acesso à loja renal pelo flanco esquerdo por via retroperitoneal foi efetiva. Nenhum animal foi a óbito no pós-operatório imediato e nem mesmo apresentou qualquer complicação pós-cirúrgica. Todos os animais se recuperaram bem após o procedimento, apresentando mobilidade, ingestão de água e ração dentro da normalidade após a recuperação anestésica.

As análises bioquímicas de uréia e creatinina foram coletadas no momento anterior à cirurgia (1ª coleta no momento pré-operatório), 6 semanas após a isquemia renal (2ª coleta no momento pré-intervenção com exercícios) e ao final do protocolo de 5 semanas de exercícios (3ª coleta no momento pós-intervenção).

Os valores referentes aos níveis de uréia e creatinina estão apresentados nas tabelas 01 e 02.

Tabela 01 – Tabela mostrando a média e o desvio padrão para os níveis séricos de uréia nos grupos GC, GA e GR

	1ª coleta (pré-cirurgia)	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)
GC	29,00±6,78	40,40±3,54	35,17±6,08
GA	32,22±4,35	38,14±3,64	30,78±6,34
GR	30,44±3,13	40,25±3,95	31,62±5,05

GC = grupo controle; GA = grupo exercício aeróbio; GR = grupo exercício resistido.

Uréia (valores em mg/dL): 36,4±10,6mg/dL na literatura

ANOVA de duas vias: p<0,001 para o efeito do momento; p=0,795 para o efeito do grupo; p=0,349 para interação entre grupo e momento. Pós teste de Tukey para o efeito do momento: comparação entre momentos 1ª X 2ª; p<0,001; momento 2ª X 3ª p<0,001; momento 1ª X 3ª p=0,426.

Na comparação da variável uréia, houve diferença estatisticamente significativa para o efeito do momento de coleta da uréia, sem efeito para a análise entre os grupos. Não houve interação entre grupos e momento de coleta. Os níveis de uréia no momento pré-cirurgia são valores para animais saudáveis e representam valores de normalidade para a amostra em todos os grupos. No momento pré-exercício, houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis de uréia em relação ao momento pré-cirurgia, demonstrando uma alteração na filtração renal desse metabólico após o procedimento de indução de DRC.

No momento pós-exercício, os valores de uréia apresentaram um declínio estatisticamente significativo para valores dentro da normalidade, como no momento pré-cirurgia. Não houve diferença estatística para os níveis de uréia entre os grupos GC, GA e GR em nenhum momento de coleta. O valor da uréia no GC apresentou tendência de permanecer mais elevado que nos demais grupos

Na comparação da variável creatinina, houve diferença estatisticamente significativa para o efeito do momento de coleta da creatinina, sem efeito para a análise entre os grupos. Não houve interação entre grupos e momento de coleta. Os níveis de creatinina no momento pré-cirurgia representam valores dentro dos parâmetros de normalidade para todos os animais.

Tabela 02 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão para os níveis séricos de creatinina nos grupos GC, GA e GR

	1ª coleta (pré-cirurgia)	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)
GC	0,97 ± 0,12	1,23 ± 0,26	1,97 ± 1,06
GA	1,02 ± 0,20	1,14 ± 0,09	1,32 ± 0,13
GR	1,03 ± 0,16	1,08 ± 0,05	1,85 ± 1,23

GC = grupo controle; GA = grupo exercício aeróbio; GR = grupo exercício resistido.

Creatinina (valores em mg/dL): 0,5 a 1,5 mg/dL na literatura

ANOVA de duas vias: $p < 0,001$ para o efeito do momento; $p = 0,487$ para o efeito do grupo; $p = 0,570$ para interação entre grupo e momento. Pós teste de Tukey para o efeito do momento: comparação entre momentos 1ª X 2ª; $p = 0,746$; momento 2ª X 3ª $p = 0,025$; momento 1ª X 3ª $p < 0,001$.

No momento pré-exercício, os níveis de creatinina apresentaram ligeiro aumento, porém este não foi estatisticamente significativo. No momento pós-exercício, os níveis de creatinina estavam mais elevados, sendo estatisticamente

significativo em relação ao momento pré-cirurgia e pré-exercício. Esse resultado reflete o declínio da filtração glomerular com o passar do tempo, sendo referente ao comprometimento da função renal induzido pela isquemia.

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de creatinina entre os grupos, porém o GC e GR apresentaram média dos níveis de creatinina (e 50% dos animais destes grupos) acima do esperado para a normalidade enquanto que o GA apresentou média dos níveis de creatinina (e 100% dos animais deste grupo) dentro do esperado para a normalidade.

As análises histopatológicas demonstraram lesões no tecido renal em ambos os rins. As alterações estão relacionadas na tabela 03. Os resultados estão apresentados em porcentagem de ocorrência nos animais, considerando a divisão dos grupos de intervenção.

Tabela 03 – Tabela mostrando a distribuição percentual das alterações histopatológicas renais encontradas nos animais por grupo de intervenção

Alterações Histopatológicas	Rim Direito			Rim Esquerdo		
	GC	GA	GR	GC	GA	GR
	%(n)	%(n)	%(n)	%(n)	%(n)	%(n)
Congestão Medular e Cortical	83,4 (5)	60,0 (3)	66,7 (4)	33,4(2)	40,0(2)	33,4(2)
Infiltrado Linfoplasmocitário	16,7 (1)	20,0 (1)	16,7 (1)	0	20,0(1)	16,7(1)
Degeneração Hidrópica cel. Tubular.	0	0	16,7 (1)	33,3(2)	20,0(1)	50,0(3)
Aumento do Espaço de Bowmann	0	0	0	16,7(1)	20,0(1)	0
Retração Glomerular	0	0	0	33,4(2)	0	0
Repleção dos Capilares Glomerular.	0	20,0(1)	0	0	0	0
Glomerulonefrite	0	40,0 (2)	0	0	20,0(1)	16,7(1)
Atrofia Glomerular	0	0	0	0	40,0(2)	66,7(4)
Fibrose	0	0	0	0	20,0(1)	16,7(1)

Grupo Controle (GC) n total=6, Grupo aeróbico (GA) n total=5, Grupo resistido (GR) n total=6.

n – Número de animais

As alterações histopatológicas encontradas no rim esquerdo são compatíveis com modificações decorrentes de processo de isquemia e reperfusão renal. As lesões encontradas no rim direito são compatíveis com as modificações decorrentes do processo de reperfusão renal, no qual os metabólitos produzidos pelo rim

isquêmico são distribuídos pela circulação sistêmica no momento da reperfusão, levando a lesões no rim direito que não sofreu nenhuma intervenção durante a cirurgia. De acordo com as análises das lâminas histopatológicas foi possível observar congestão medular e cortical em rim esquerdo e direito (Figura 07), atrofia glomerular e degeneração hidrópica no rim esquerdo (Figura 08) e glomerulonefrite no rim direito (Figura 09).

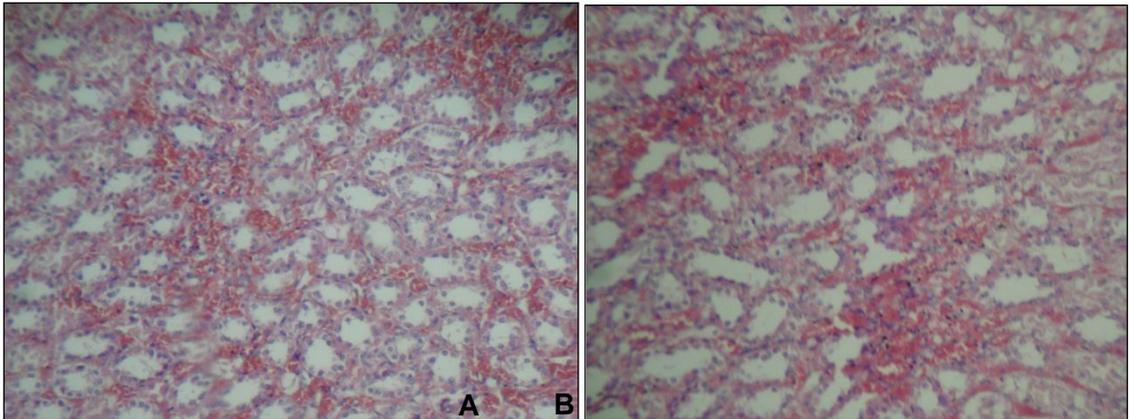


Figura 07: Fotografia de lâmina histopatológica do rim esquerdo (A) e rim direito (B) mostrando congestão medular e cortical (aumento 10x HE).

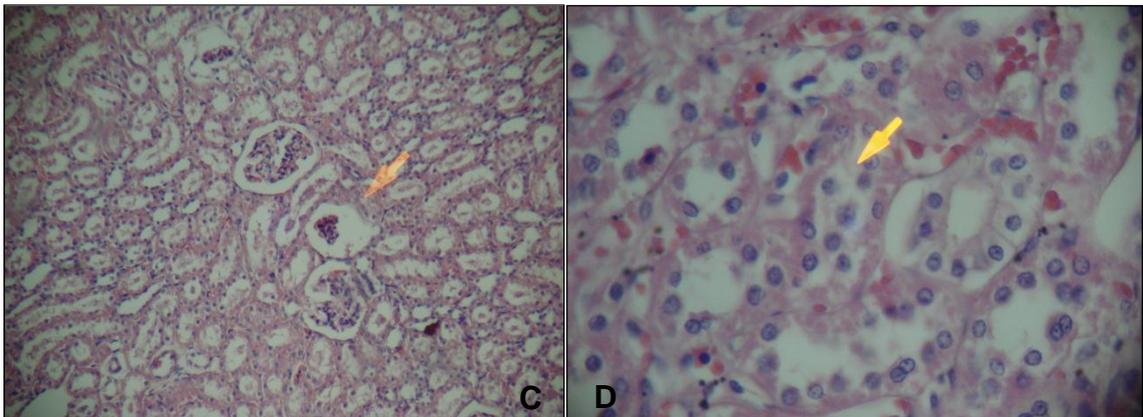


Figura 08: Fotografia de lâmina histológica do rim esquerdo mostrando atrofia glomerular (C) e degeneração hidrópica (D) de células tubulares (aumento 10x em C e 40x em D/HE).

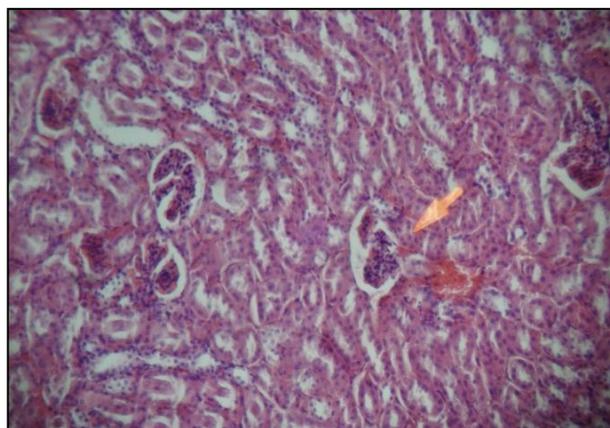


Figura 09: Fotografia de lâmina histológica do rim direito mostrando Glomerulonefrite (aumento 10x HE).

Foram coletados amostras de sangue para análise de Pth e calcitriol, radiografias de membros inferiores e peça óssea da tíbia direita. As amostras iniciais de sangue e radiografias foram coletadas 6 semanas após a indução de DRC por cirurgia de isquemia e reperfusão renal (pré-exercício). As amostras finais de sangue, radiografias e a peça de tíbia direita foram coletada depois de 4 semanas de intervenção (pós-exercício).

As variáveis de Pth e calcitriol séricos estão descritas na tabela 04. Na análise das variáveis Pth e calcitriol houve diferença estatisticamente significativa para o efeito do momento de coleta das variáveis, sem efeito para a análise entre os grupos. Não houve interação entre grupos e momento de coleta.

Tabela 04 - Tabela mostrando a média e o desvio padrão para os valores séricos de Calcitriol e Pth nos diferentes grupos

	Pth		Calcitriol	
	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)
GC	19,25±12,34	80,33±29,34	11,33±5,03	27,86±8,99
GA	12,50±13,44	60,67±8,62	9,00±2,00	40,25±13,00
GR	16,20±12,77	75,40±19,21	7,50±2,12	36,20±8,93

GC = grupo controle; GA = grupo exercício aeróbico; GR = grupo exercício resistido.

Pth – paratormônio intacto (valores em pg/mL); Calcitriol – vitamina D3 (valores em pg/mL).

Pth: ANOVA de duas vias $p < 0,001$ para o efeito do momento; $p = 0,569$ e para o efeito do grupo; $p = 0,864$ para interação entre grupo e momento. Pós teste de *Tukey* $p < 0,001$ entre momento pré e pós. Calcitriol: ANOVA de duas vias $p < 0,001$ para o efeito do momento; $p = 0,546$ para o efeito do grupo; $p = 0,239$ para interação entre grupo e momento. Pós teste de *Tukey* $p < 0,001$ entre momento pré e pós.

Para os valores de calcitriol houve aumento significativo nos níveis séricos na comparação entre os momentos pré e pós-exercício. Porém não houve diferença significativa quando se compara entre os grupos GC, GA e GR. Na análise dos valores de Pth podemos observar o mesmo comportamento, ou seja, aumento significativo na comparação dos momentos pré e pós-exercício, sem diferença na comparação entre os grupos GC, GA e GR.

As mudanças nos valores séricos dos hormônios calcitriol e Pth são compatíveis com as modificações induzidas pela adaptação dos animais após a

indução de DRC, não sendo modificadas pela intervenção efetuada nos grupos GA e GR.

Foi realizada a comparação estatística dos valores de calcitriol e Pth nos momentos pré e pós-exercício de cada grupo, com a média do intervalo de normalidade para estes hormônios descritos na literatura. Estes resultados estão mostrados na tabela 05.

O intervalo de normalidade para o calcitriol em coelhos é de 18 a 78 pg/mL, sendo utilizada a média deste intervalo (48 pg/mL) para comparação estatística. Desta forma, no momento pré-exercício os animais apresentavam valores significativamente inferiores ao esperado para a normalidade, característico do efeito deletério da indução da DRC nos animais. No momento pós-exercício os valores apresentavam-se dentro do intervalo esperado para a normalidade. Porém a análise estatística deste resultado mostra que este comportamento foi diferente em cada grupo. Para os grupos GC e GR a média dos valores de Calcitriol permaneceu diferente da normalidade ($p < 0,05$). Para o grupo GA a média não diferiu estatisticamente do valor normal.

Tabela 05 – Tabela mostrando o valor de p na comparação dos níveis de Pth e calcitriol de cada grupo nos momentos pré e pós-exercício com o valor de referência para a normalidade

	Pth		Calcitriol	
	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)
GC	0,013	0,064	0,0062	0,001
GA	0,150	0,224	0,009	0,319
GR	0,003	0,148	0,024	0,042

GC = grupo controle; GA = grupo exercício aeróbio; GR = grupo exercício resistido.

Pth – paratormônio intacto; valor de referência = 52 pg/mL.

Calcitriol – vitamina D3; valor de referência 48 pg/mL.

Teste t de Student para uma amostra.

O valor de normalidade para o Pth em coelhos é de 52 pg/mL. No momento pré-exercício os valores estão estatisticamente menores que a referência da literatura para os grupos GC e GR. Para o GA o valor é inferior à normalidade,

porém não significativo. No momento pós-exercício os valores de Pth séricos estavam elevados, acima da normalidade em todos os grupos, porém este resultado não foi estatisticamente significativo.

Os parâmetros de densidade óssea avaliados na radiografia de membros inferiores estão descritos na tabela 06. Esta contém as médias do valor mínimo de densidade, do valor máximo de densidade e da média de densidade na área avaliada.

O resultado para o valor de densidade mínima e média de densidade não diferem estatisticamente entre os grupos e não diferem estatisticamente entre os momentos pré e pós-exercício. A análise do valor de densidade máxima mostrou-se significativamente inferior no período pós-exercício, independentemente do grupo avaliado.

Tabela 06 – Tabela mostrando a média e o desvio padrão dos valores de densidade óssea nos diferentes grupos

	MIN		MAX		MED	
	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)	2ª coleta (pré-exercício)	3ª coleta (pós-exercício)
GC	111,42±30,97	113,83±34,22	191,08±43,32	163,33±41,19	141,85±34,81	132,17±32,62
GA	101,58±32,38	106,13±10,10	190,54±38,41	162,47±8,05	130,13±35,11	125,56±8,80
GR	106,28±29,97	117,13±18,08	186,11±22,16	162,00±23,83	130,67±29,11	132,67±22,40

GC = grupo controle; GA = grupo exercício aeróbico; GR = grupo exercício resistido.

MIN - valor mínimo da densidade na área avaliada; MAX – valor máximo da densidade na área avaliada; MED – valor da média da densidade na área avaliada.

MIN: ANOVA *de duas vias* p= 0,534 para o efeito do momento; p= 0,704 para o efeito do grupo; p=0,933 para interação entre grupo e momento. MAX: ANOVA *de duas vias* p=0,024 para o efeito do momento; p= 0,973 para o efeito do grupo; p=0,988 para interação entre grupo e momento. Pós teste de *Tukey* p=0,024 na comparação entre momento pré e pós. MEDIA: ANOVA *de duas vias* p=0,684 para o efeito do momento; p= 0,739 para o efeito do grupo; p=0,892 para interação entre grupo e momento.

Mesmo não sendo significativo, o resultado da média de densidade encontrada no momento pós-exercício foi menor para GA e GC e maior para GR. Estes resultados mostram que a densidade mínima não modificou, mas a máxima foi menor, contribuindo desta forma para a menor média de densidade ao final do

experimento. Podemos destacar que estes resultados são compatíveis com a evolução do processo de DRC induzido pela cirurgia, sem efeito do exercício.

A morfometria óssea analisou o número de espaços intertrabeculares encontrados em osso trabecular de tíbia direita nas regiões proximal e medial da peça óssea, em corte transversal e longitudinal. Os resultados da média e desvio padrão destas variáveis estão descritos nas tabelas 07 (corte transversal) e 08 (corte longitudinal).

Tabela 07 – Tabela mostrando a média e o desvio padrão do número de espaços intertrabeculares em corte transversal nas regiões proximal e medial da tíbia direita

	Região proximal	Região medial
GC	82,32±10,68	85,33±6,89
GA	74,34±12,67	78,03±4,25
GR	75,41±6,60	76,06±9,97

GC = grupo controle; GA = grupo exercício aeróbio; GR = grupo exercício resistido.

ANOVA de *uma via* com *pós teste de Tukey*: comparação entre os grupos GC, GA e GR para a região proximal $p = 0,415$ e medial $p=0,176$. Teste t pareado $p= 0,3800$ comparando região medial e proximal.

A tabela 07 apresenta os resultados para o corte transversal da peça de tíbia direita nas regiões proximal e medial. Não houve diferença estatística para análise deste parâmetro entre os grupos GC, GA e GR (efeito da intervenção com exercícios). Porém os grupos de intervenção GA e GR apresentaram tendência para um menor número de espaços intertrabeculares para região proximal e medial que o grupo controle para o corte transversal.

Foi realizada comparação entre as regiões medial e proximal em ambos os cortes (transversal e longitudinal). Não houve diferença estatística quando se comparou as regiões medial e proximal em corte transversal.

A tabela 08 mostra os resultados para o corte longitudinal da peça de tíbia direita para as mesmas regiões. Assim como para o corte transversal, não houve diferença estatística entre os grupos GC, GA e GR (efeito da intervenção com exercícios). Porém os grupos de intervenção GA e GR apresentaram tendência para um menor número de espaços intertrabeculares para região medial que GC. Para a região proximal o GR apresentou tendência de menor valor que os demais grupos.

Tabela 08 – Tabela mostrando a média e o desvio padrão do número de espaços intertrabeculares em corte longitudinal nas regiões proximal e medial da tíbia direita

	Região proximal	Região medial
GC	185,22±72,43	200,04±40,15
GA	185,97±21,89	174,47±26,35
GR	136,75±50,16	175,10±22,74

GC = grupo controle; GA = grupo exercício aeróbico; GR = grupo exercício resistido.

ANOVA de *uma via* com *pós teste de Tukey*: comparação entre os grupos GC, GA e GR para a região proximal $p = 0,3541$ e medial $p=0,3118$. Teste t pareado $p= 0,4340$ comparando região medial e proximal.

Não houve diferença estatística quando se comparou as regiões medial e proximal em corte longitudinal (teste t pareado).

Foi verificada a correlação entre as variáveis hormonais de Pth e calcitriol com a variável sérica da creatinina e as variáveis de densidade óssea. Os resultados dos valores de r e p desta análise estão apresentados na tabela 09.

Não foram encontradas correlações significativas entre as variáveis hormonais do Pth e do calcitriol e a variável sérica da creatinina, mostrando que não houve relação direta entre o grau de deficiência da filtração glomerular e a resposta hormonal da regulação do metabolismo do tecido ósseo.

Tabela 09 – Tabela mostrando valores de r e p para a correlação* entre as variáveis do Pth e Calcitriol com a variável creatinina e as variáveis de densidade óssea

	Pth		Calcitriol	
	r	p	r	p
Creatinina	0,353	0,151	0,060	0,819
MIN	- 0,048	0,824	0,017	0,944
MAX	- 0,555	0,005	- 0,333	0,163
MED	- 0,199	0,350	- 0,077	0,753

MIN = valor mínimo da densidade na área avaliada; MAX – valor máximo da densidade na área avaliada; MED – valor da média da densidade na área avaliada.

* Correlação linear de Pearson.

Em relação à correlação das variáveis hormonais do Pth e do calcitriol com as variáveis de densidade óssea foi encontrada correlação negativa entre o hormônio Pth e a variável da densidade máxima mensurada na área de análise (MAX). Esta

correlação mostra que maiores valores de Pth séricos possuem relação com uma menor densidade máxima na área analisada (Figura 10).

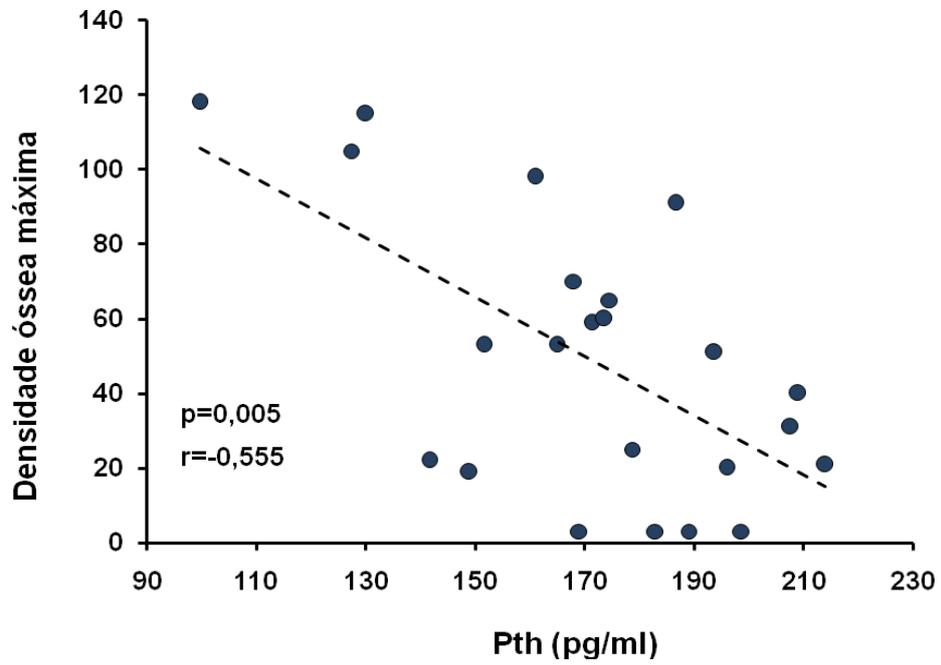


Figura 10: Gráfico mostrando a correlação entre Paratormônio (Pth) e densidade óssea máxima.

6 DISCUSSÃO

A escolha dos coelhos para a realização deste experimento se deve a melhor sobrevivência desses animais após a indução da DRC, pois esses animais oferecem uma janela terapêutica de 12 semanas, o que possibilita a implementação de protocolo de exercício físico. Ao considerar a expectativa de vida de um coelho, em torno de sete a oito anos, aproximadamente dez vezes menor do que dos seres humanos, pode-se analogamente supor que o intervalo de observação de 12 semanas equivale a dois anos e meio de vida em *anima móbile*, o que caracteriza tempo suficiente para instalação da DRC. Além disso, apresentam uma maior volemia, comparados com os ratos, facilitando a retirada de amostras para as análises bioquímicas (COSTA et al, 2009). No presente experimento foi possível realizar coletas consecutivas de sangue para análises bioquímicas sem comprometer a vida dos animais, que permaneceram viáveis até a eutanásia.

O valor de normalidade para uréia e creatinina em coelhos tem uma grande variação na literatura. Os valores encontrados inicialmente (1ª coleta) neste experimento estão próximos aos obtidos por Emanuelli *et al.* (2008), que apresentaram em seu estudo padrões de normalidade de uréia e creatinina em coelhos. Segundo esses autores condições diferenciadas de clima e instalação podem interferir nestas variáveis, desta forma a 1ª coleta deste experimento foi usada como medida basal para a normalidade destas variáveis durante todo o estudo.

Após a 1ª coleta de sangue os animais passaram pelo procedimento cirúrgico de Isquemia e Reperfusão renal unilateral, para induzir o modelo animal de Doença Renal Crônica Experimental. Para tanto foi realizado o clampamento do pedículo renal esquerdo por 20 minutos, seguido de remoção dos clampes para reperfusão. Acreditava-se que em contraste com o coração e o cérebro, os rins poderiam recuperar-se completamente de um evento isquêmico. Entretanto isso tem ocorrido com menos frequência, sendo reconhecido que há lesão tecidual por isquemia/reperfusão (superior a 20 minutos) que pode deixar seqüelas que evoluam para DRC (ISHANI et al, 2009).

Um estudo realizado por Thompson *et al.* (2007) sobre o impacto clínico relacionado ao tempo de isquemia renal, sugere que o clampamento vascular do pedículo renal está associado com aumento do risco de deterioração crônica da

função renal. Este estudo demonstrou que isquemia por mais de 20 minutos está associado ao desenvolvimento de DRC. Estes autores relatam que danos irreversíveis ocasionados pelo processo de isquemia ocorrem após 30 a 45 minutos do procedimento. No experimento proposto por esta pesquisa a isquemia renal durou 20 minutos cronometrados, sendo suficiente para gerar lesões no tecido renal, posteriormente comprovadas pelas análises histopatológicas que mostraram diversas alterações de congestão, infiltrado, degeneração glomerular, atrofia glomerular e fibrose entre outras.

A lesão renal por isquemia/reperfusão é resultado de uma deficiência de oxigênio e liberação de nutrientes para a remoção de resíduos. O tecido renal necessita de uma demanda grande de oxigênio para realizar suas funções de transporte e síntese. No momento da isquemia há uma incompatibilidade entre a demanda e oferta de O_2 , associado ao acúmulo de substâncias residuais e produtos do metabolismo. Como resultado do desequilíbrio, as células do epitélio tubular renal sofrem danos graves, como morte por apoptose e necrose celular, gerando perturbações da homeostase da água e eletrólitos e consequente redução da excreção de resíduos de produtos do metabolismo, além do prejuízo para as funções de síntese de substâncias pelo tecido renal (BONVENTRE; YANG, 2011).

Uma razão para a sensibilidade renal à isquemia é que a microvasculatura renal é altamente complexa e deve atender a uma demanda de alta energia. Esse delicado equilíbrio entre oferta e demanda de O_2 é facilmente perturbado em casos de isquemia (SUTTON, 2009). Segundo Bonventre e Yang (2011) durante o processo de isquemia/reperfusão o fluxo de sangue para a medula renal é reduzido desproporcionalmente pela diminuição da perfusão renal. O endotélio vascular é lesado e pequenas arteríolas renais sofrem vasoconstrição em resposta a níveis teciduais elevados de mediadores químicos da inflamação (endotelina-1, angiotensina II, tromboxano A_2 e leucotrienos) e estimulação do Sistema Nervoso Periférico. Além disso, ocorre diminuição da resposta vasodilatadora das arteríolas, pelo declínio do óxido nítrico e outras substâncias vasodilatadoras, associado ao aumento de citocinas vasoativas (TNF- α , IL, endotelina), gerando como resultado ativação e adesão de leucócitos no endotélio. A formação de edema contribui ainda mais para a vasoconstrição arteriolar, resultando na interferência do fluxo sanguíneo para o túbulo proximal e alça de henle, que já

são normalmente hipóxicos devido às propriedades de permuta com os vasos retos renais.

Clinicamente todas essas alterações traduzem um aumento da lesão durante a fase de reperfusão, quando o consumo de O₂ aumenta com a demanda do transporte tubular. Dessa forma a lesão inicial leva a uma cascata de eventos que culminam em lesão vascular, congestão vascular e redução da capacidade de neutralizar os radicais tóxicos (MUNSHI, 2011). A filtração renal é prejudicada levando ao aumento progressivo dos níveis de uréia e principalmente de creatinina.

Este fato foi confirmado no presente experimento, pois os níveis de creatinina de todos os grupos sofreram um aumento gradativo com o passar do tempo (análise do efeito do momento da coleta, estatisticamente significativo), demonstrando a queda da TFG causada pela lesão e **consequências** do processo de isquemia/reperfusão. Para cada redução de 50% da taxa de filtração glomerular, a concentração sérica de creatinina pode duplicar (STEVENS et al, 2010).

Os níveis de uréia apresentaram um comportamento diferente da creatinina neste experimento. Os valores da 2^a coleta são maiores (análise do efeito do momento, estatisticamente significativo) que os valores da 1^a e 3^a coleta, que não diferem estatisticamente entre si. Este comportamento pode ser explicado pela dificuldade inicial de manter a taxa de filtração deste metabólito após a lesão renal induzida pelo processo cirúrgico, que com o passar do tempo foi sendo adaptada pelos néfrons residuais funcionantes.

Quanto à análise do efeito do exercício físico nas variáveis de uréia e creatinina, não foi encontrado diferenças estatísticas entre os grupos GC, GA e GR, e nem interação entre os grupos e os momentos de coleta. Este resultado mostra que o exercício não interferiu na função renal dos animais no decorrer do experimento.

A creatinina é utilizada como índice clínico de função renal, devido à constância de formação e excreção. Em virtude da sua relativa independência a fatores como dieta, grau de hidratação e metabolismo das proteínas, é um teste de triagem renal confiável (KIRSZTAJN et al, 2011). É derivada da creatina e da fosfocreatina durante o metabolismo muscular e filtrada pelos glomérulos renais (SODRÉ et al, 2007).

No presente experimento, quando foi iniciado o protocolo de exercícios físicos com os animais, os níveis de creatinina (2^a coleta) não estavam alterados

(sem diferença estatística) em relação ao momento pré-cirurgia (1ª coleta). Ao final das 4 semanas da aplicação do protocolo de exercício físico (3ª coleta), os níveis séricos de creatinina eram superiores e significativamente diferentes em relação aos outros 2 momentos de coleta. Esse aumento gradativo da creatinina aconteceu em todos os grupos de pesquisa. Entretanto, houve uma tendência dos níveis de creatinina serem superiores no GC e GR, quando comparados com o grupo GA, pois todos os animais do GA encontravam-se com os níveis de creatinina inferiores ao teto de normalidade descrito na literatura, enquanto que 50% dos animais dos outros 2 grupos encontravam-se com os níveis de creatinina acima do teto de normalidade para coelhos.

A tendência do GA em manter os níveis de creatinina em um patamar inferior ao dos outros grupos é de interesse para a prescrição deste tipo de exercício na DRC e deve ser alvo de investigações futuras. Alguns estudos destacam os benefícios do exercício aeróbico na DRC que incluem aumento no consumo máximo de oxigênio, diminuição da pressão arterial, aumento na capacidade de exercício, menor índice preditivo de mortalidade pela melhora do consumo de oxigênio, sem nenhum efeito sobre as taxas de filtração Glomerular (AFSHAR et al, 2010). Outros estudos relatam que o exercício pode melhorar a remoção de solutos durante a diálise, por aumentar o fluxo sanguíneo muscular, resultando em melhor fluxo de toxinas urêmicas no compartimento vascular (HENRIQUE et al, 2009; REBOREDO et al, 2010). Também é de consenso clínico que a prática de atividade física na DRC promove melhora da capacidade funcional, qualidade de vida e reduz os riscos de doença cardiovascular. Estes resultados são descritos na maior parte dos estudos em pacientes em estágio avançados da DRC e que realizam diálise (JOHANSEN; PAINTER, 2012).

Com relação ao grupo GR, que apresentou resultados de creatinina com comportamento semelhante ao GC, pode-se destacar que a prática do exercício resistido não produziu efeitos deletérios na função renal. Esta hipótese pode estar relacionada com o estímulo anabólico que este tipo de exercício impõe ao tecido para ganho de massa muscular, que apesar de não ter sido medida, pode ter influenciado os níveis de creatinina sérica obtidos com o exercício ou apenas uma evolução da DRC com o passar do tempo sem nenhuma influência adicional do exercício resistido na evolução da doença, já que os animais encontravam-se em condições controladas e iguais. Alguns estudos demonstrarem que o exercício físico

não tem influência na taxa de filtração renal da creatinina (MOINUDDIN; LEEHEY, 2008) o que condiz com os resultados deste experimento.

As análises histopatológicas demonstraram alterações no tecido renal do rim esquerdo (submetido à isquemia e reperfusão) e no rim direito (tabela 04) em todos os grupos. Os mecanismos de lesão tecidual renal devido à isquemia e reperfusão são multifatoriais, interdependentes e envolvem hipóxia, resposta inflamatória e dano por radicais livres. A hipóxia tecidual no rim leva a depleção de ATP com conseqüente disfunção mitocondrial, acúmulo de sódio intracelular, cálcio e espécies reativas de oxigênio e leva a ativação de múltiplos sistemas enzimáticos incluindo proteases, óxido nítrico sintases, fosfolipases e endonucleases. Estes sistemas são responsáveis pela destruição do citoesqueleto, lesão de membranas citoplasmáticas, degradação de DNA e morte celular (BERNARDI, 2007; COSTA-HONG et al, 2009).

Ishiani *et al.* (2009) acompanharam por 2 anos a função renal de indivíduos idosos hospitalizados que tiveram e não tiveram episódios tratados de doença renal aguda primária e secundária. Ele conclui após o período de acompanhamento, que os indivíduos que tiveram um episódio agudo de doença renal possuíam maior risco de desenvolvimento de DRC terminal com o passar do tempo que idosos que não sofreram lesão aguda. Isso reforça a hipótese de que quadros agudos renais podem causar injúrias crônicas. Thompson *at al* (2007) analisaram o tempo de isquemia renal em cirurgias de retirada de nódulo tumoral em rins humanos. Os autores concluíram que o tempo de 20 minutos de isquemia (ou superior) é suficiente para provocar danos ao tecido renal que evoluem com lesões crônicas.

A lesão por isquemia e reperfusão foi demonstrada em nosso experimento por achados histopatológicos em ambos os rins, principalmente, congestão medular e cortical, infiltrado linfoplasmocitário, degeneração das células tubulares, glomerulonefrite, atrofia glomerular e fibrose. Não houve diferença nos achados histopatológicos entre os grupos.

Para a avaliação do tecido ósseo foram analisadas as variáveis bioquímicas dos hormônios Pth e Calcitriol, da densidade óssea e da histomorfometria do osso trabecular em peça de tíbia direita.

Para o Pth foi observada diferença estatística significativa para o efeito do momento de coleta com aumento dos valores deste hormônio no pós-exercício. Não

houve diferença estatística para o efeito dos grupos (intervenção com exercícios) e não houve interação entre momento de coleta e grupos. Na comparação estatística entre os valores coletados por este experimento e o referencial de normalidade na literatura foram encontrados valores significativamente inferiores à normalidade no momento pré-exercício para GC e GR e valores acima da normalidade no momento pós-exercício para todos os grupos sem significância estatística. Este comportamento da variável do Pth é compatível com o esperado na DRC.

MacWay *et al.* (2012) destacam em sua revisão de literatura que em estágios iniciais da DRC os níveis séricos de Pth podem não estar elevados, pois o hormônio FGF23 pode suprimir sua secreção pela glândula paratireóide. Essa hipótese é reforçada pelo estudo de Zang *et al.* (2011), que analisa as concentrações séricas de FGF23 e Pth em indivíduos com e sem falência renal aguda e encontrou níveis séricos do hormônio FGF23 significativamente elevado nos pacientes com lesão renal aguda e níveis séricos de Pth dentro da normalidade quando comparados com pacientes sem lesão renal aguda.

Com o avançar da DRC e a perda progressiva de néfrons, ocorre alterações negativas dos mecanismos regulatórios do cálcio, incluindo elevação do Pth na maior parte dos casos. Esta elevação está relacionada com a hipocalcemia que ocorre pela diminuição da reabsorção de cálcio pelos túbulos renais e da absorção de cálcio intestinal. Esta condição aumenta a secreção de Pth por estímulo a receptores sensíveis ao cálcio nas células da paratireóide resultando inicialmente em aumento da síntese e secreção de Pth e na sequência desenvolvendo hiperplasia glandular. O aumento sérico do Pth circulante é o sinal clínico mais contundente da condição do HPTS, mostrando um aumento da atividade da paratireóide para compensar a baixa concentração de cálcio sérico elevando a reabsorção óssea deste mineral (HRUSKA; TEITELBAUM, 1995; K/DOQI, 2002; FUKAGAWA *et al.*, 2002; BARDIN, 2003; KANSAL; FRIED, 2010; MACWAY *et al.*, 2012).

Para o calcitriol foi observada diferença estatística significativa para o efeito do momento de coleta com aumento dos valores deste hormônio no pós-exercício. Não houve diferença estatística para o efeito dos grupos (intervenção com exercícios) e não houve interação entre momento de coleta e grupos. Na comparação estatística entre os valores coletados por este experimento e o referencial de normalidade na literatura foram encontrados valores significativamente

inferiores à normalidade no momento pré-exercício em todos os grupos e permanecendo desta forma no momento pós-exercício nos grupos GC e GR. Para o GA a média não diferiu estatisticamente do valor normal no momento pós-exercício.

A queda do calcitriol para valores inferiores à normalidade após a isquemia renal é compatível com a literatura. Hsu *et al.* (1988) descreveram a diminuição da produção de calcitriol em ratos após lesão isquêmica aguda. O hormônio FGF23 também influencia a secreção de calcitriol pelos rins, pois inibe e inativa a enzima 1- α -hidroxilase responsável pela síntese do calcitriol nos rins (MACWAY *et al.*, 2012). Jamal *et al.* (2012) descrevem que a redução do Calcitriol é maior (estatisticamente significativo) quanto mais avançado o estágio da DRC.

Com o avançar da DRC ocorre perda de maior quantidade de néfrons e aumenta o acúmulo de fosfato sérico (que reduz a eficácia da enzima 1- α -hidroxilase), culminando com uma menor secreção de calcitriol e conseqüente hipocalcemia, pois o calcitriol é responsável pela absorção intestinal do cálcio ingerido na dieta (K/DOQI, 2002; CRAVER *et al.*, 2007; KANSAL; FRIED, 2010; MACWAY *et al.*, 2012).

Neste experimento pode-se observar que os valores de calcitriol se elevaram significativamente no momento pós-exercício, comportamento este que difere do esperado em humanos. Segundo Redrobe (2002), em coelhos o cálcio da dieta é totalmente absorvido no intestino (com menor influência do calcitriol) e o excesso deste íon é excretado pela urina. Cálcio em excesso sendo excretado pelos rins pode causar urolitíase nestes animais. Outro aspecto particular em coelhos, segundo o mesmo autor, se refere à elevação do hormônio Pth que estimula a secreção de calcitriol. Estas particularidades podem explicar a elevação do calcitriol com o passar do tempo após a indução de DRC pelo processo de isquemia nos coelhos. Mesmo assim, cabe ressaltar que a elevação do calcitriol nos animais deste experimento não superou a média de normalidade dos valores de calcitriol para os grupos GC e GR. Apenas o GA apresentou elevação dos níveis séricos deste hormônio para valores dentro da média de normalidade.

Com relação ao efeito do exercício físico sobre a regulação hormonal do tecido ósseo, encontra-se na literatura experimentos com indivíduos saudáveis que verificaram a elevação do Pth imediatamente após a realização de exercício (efeito agudo do exercício) aeróbio (BOUASSIDA *et al.*, 2003) e resistido (RONG *et al.*, 1997) com valores dentro da normalidade 12 a 24 horas após o término da atividade. Os autores concordam que este efeito pode ser potencialmente benéfico para o tecido ósseo, pois uma súbita elevação do Pth ativa a atividade osteoblástica e

osteoclástica para o remodelamento ósseo, porém sem a manutenção de altas taxas do hormônio por períodos prolongados e sem outras interferências não fisiológicas o osso tende a remodelar e melhorar a formação óssea, sem causar reabsorção.

Não foi encontrada, neste estudo, correlação significativa entre o hormônio Pth e o marcador de função renal creatinina. Este fato pode ser explicado pela variabilidade biológica deste parâmetro e pela variabilidade intraindivíduo, que em condições patológicas pode se apresentar de maneira mais evidente. Também pelo fato de que o DMO-DRC é um distúrbio bastante complexo, no qual muitos mecanismos estão envolvidos, e a função renal isoladamente não define o grau de comprometimento do indivíduo ou o comportamento da glândula paratireóide, pois existem manifestações do DMIO-DRC que se apresentam com alto *turnover* ou baixo *turnover* em indivíduos com o mesmo grau de comprometimento da função renal (K/DOQI, 2002; CRAVER et al, 2007; MOORE et al, 2009; TANAKA et al, 2012). Esta hipótese é reforçada pelo estudo de Gardhan *et al.* (2010) que avaliaram a variação do Pth em indivíduos com DRC em hemodiálise, concluindo que existe uma grande variação no valor de Pth dos pacientes em hemodiálise, sendo necessária várias mensurações periódicas para propor e acompanhar o tratamento do DMO-DRC.

A densidade óssea avaliada neste experimento é medida de maneira indireta por meio de análise da escala de tons de cinza por ponto pixel com base em imagens de radiograma de membros inferiores. Não foram encontradas diferenças significativas para as variáveis de densidade mínima na área avaliada e média de densidade entre os momentos pré e pós-exercício. A variável de máxima densidade na área avaliada foi estatisticamente menor no momento pós-exercício. Estes resultados se referem ao efeito do momento de coleta, sem diferença estatística para o efeito do grupo (intervenção com exercícios) e sem interação entre grupos e momento de coleta. Este resultado é compatível com a evolução da DRC induzida no modelo de isquemia, pois com o avançar da DRC as alterações no tecido ósseo vão se desenvolvendo, prejudicando a capacidade normal de mineralização da matriz colágena, reduzindo e desorganizando a formação de matriz colágena e aumentando a reabsorção óssea levando às lesões da Osteodistrofia renal descritas anteriormente.

Cory *et al.* (2010) realizaram um estudo sobre aspectos tridimensionais da biomecânica do tecido ósseo avaliados por técnica específica de micro-tomografia.

Eles utilizaram a análise de densidade em conjunto com os aspectos de organização do osso trabecular e cortical para desenvolver cálculos de força compressiva e resistência do tecido ósseo. Estes autores realizaram o estudo em modelo animal de ratos com nefrectomia parcial, ratas ovariectomizadas e controles, concluindo que a densidade relativa do tecido ósseo dos ratos nefrectomizados está reduzida em relação aos ratos controles e em melhores condições que as ratas ovariectomizadas, resultando em menor resistência do tecido ósseo nos grupos de modelo animal de doença.

Outro estudo, realizado por Jamal *et al.* (2012) analisaram a densidade óssea mensurada exames de DXA e tomografia de alta resolução em pacientes com DRC em estágio 3 a 5 que tiveram e não tiveram fraturas. Estes autores encontraram menores valores de densidade óssea naqueles pacientes que já haviam tido um episódio de fratura, aumento do risco de fraturas a cada redução de um desvio padrão da medida de densidade óssea (valores mensurados em regiões do quadril e coluna lombar ajustados para idade, sexo, peso e estágio da DRC). Outro aspecto destacado por estes autores é a diferença nas formas de apresentação da doença óssea nos estágios da DRC, sendo que nas fases não dialíticas (estágio 3 e 4) há maior prevalência de hiperparatireoidismo (altas taxas de Pth séricos com alto *turnover* ósseo) e desta forma, maiores alterações nos parâmetros de densidade óssea. Em estágio avançado (estágio 5 em condições dialíticas) há maior evidência de lesões características da doença óssea de baixo *turnover* ósseo (osteomalácia, doença adinâmica, nas quais há aumento e desorganização da matriz colágena, com apresentação de lesões em osso cortical) e os resultados das avaliações de densidade pelo DXA são pouco específicos e não se relacionam com o risco de fratura.

Neste experimento foi encontrada correlação significativa e negativa do hormônio Pth com a variável de máxima densidade na área medida. Este resultado é condizente com o descrito no parágrafo anterior, no qual a elevação do Pth no hiperparatireoidismo (que se apresenta em estágio 3 e 4 pré-diálise com mais prevalência) aumenta a reabsorção óssea, reduzindo a densidade máxima da região. Este resultado é compatível com o estudo de Yamaguchi *et al.* (1996) que encontraram correlação significativa e negativa entre densidade óssea e Pth para a região distal do rádio em pacientes em hemodiálise e o estudo de Urena *et al.* (2003) que encontraram resultados similares para a região medial do rádio. Mais

atualmente, Ambrus *et al.* (2011) publicaram estudo que encontrou correlação significativa e negativa entre Pth e densidade óssea em pacientes que realizam hemodiálise e que possuíam níveis séricos de Pth acima de 100 pg/ml (altos valores em humanos) em todos os locais medidos (coluna lombar, colo do fêmur e região distal do rádio).

Em contraste com os nossos resultados Jamal *et al.* (2012) encontraram correlação negativa do hormônio Pth com as medidas de espessura cortical, área cortiça e densidade cortical, porém sem correlação do Pth com as medidas em osso trabecular.

Para as variáveis de morfometria não foram encontrados diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (GC, GA e GR) para o efeito da intervenção com exercícios nos cortes transversal e longitudinal. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os locais de medida (região medial e região proximal do osso) tanto pra o corte transversal quanto para o corte longitudinal. Pode-se observar tendência de menores números de espaços intertrabeculares nos grupos de intervenção, indicando um possível efeito positivo do exercício aeróbio e resistido na organização do osso trabecular em vigência de DRC.

Quanto aos aspectos morfométricos na DRC, o estudo de Jamal *et al.* (2012), avaliaram características morfométricas em tomografia de alta resolução em pacientes com DRC. A variável separação das trabéculas foi menor nos pacientes que não apresentaram histórico de fraturas quando comparadas com aqueles que possuíam história de fratura. As medidas de espessura trabecular, área trabecular e número total de trabéculas não diferiram entre os grupos com e sem histórico de fratura.

Em relação ao efeito do exercício na morfometria óssea, o estudo de Yeh *et al.* (2001) avaliaram efeitos sobre o tecido ósseo em ratos submetidos a exercícios vibratórios (com resposta isométrica de contração muscular) durante 6 semanas de protocolo e encontrou melhora na formação óssea em osso cortical e trabecular. Iwamoto *et al.* (1998) relata melhora na morfometria óssea (número de trabéculas e espessura trabecular) da área proximal da tíbia de ratas osteopênicas após 12 semanas de exercício aeróbio.

O estudo dos efeitos dos exercícios aeróbicos e de resistência nas doenças crônicas com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade, reduzindo o

estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial é de interesse e investigação na literatura atual. O exercício aeróbico e treinamento de resistência foram reportados por ter uma influência benéfica sobre citocinas inflamatórias, resistência à insulina, obesidade, fatores de risco doenças cardiovasculares, microalbuminúrica e anemia relacionada à distúrbios crônicos. Não está totalmente esclarecido se os benefícios relacionados ao exercício físico estendem-se para pacientes com DRC em todos os níveis. Possivelmente por causa dessa incerteza que a prescrição de exercícios físicos não é realizada na rotina clínica de tratamento de pacientes com DRC. Entretanto especialistas em reabilitação recomendam que um bom programa de exercícios deva combinar treinamento aeróbico e de resistência para que o catabolismo possa ser revertido, melhorando a capacidade funcional e prevenindo as doenças cardiovasculares, que são uma causa de morbimortalidade em pacientes com DRC (MOINUDDIN; LEEHEY, 2008; JOHANSEN; PAINTER, 2012).

Os estudos que pesquisaram os efeitos dos exercícios físicos na DRC justificam sua prescrição com base nos efeitos deletérios da doença sobre a funcionalidade do paciente. A DRC leva a uma gradativa perda de massa muscular, devido o aumento da degradação e diminuição da síntese protéica intramuscular relacionadas ao processo da miopatia urêmica, anemia, alterações nos sistemas cardiovascular, respiratório, nervoso e metabólico em geral que contribuem para prejuízos funcionais nestes pacientes (ADEY et al, 2000; JOHANSEN; PAINTER, 2012).

Os resultados dos benefícios da prática regular de exercícios são descritos na maior parte dos estudos em pacientes em estágio avançados da DRC e que realizam diálise. Em sua revisão, Johansen e Painter (2012) destacam um estudo que analisou a relação entre a TFG e a capacidade funcional de indivíduos idosos e encontrou uma relação entre a TFG e menor distância percorrida, menor força muscular de extensores de quadril em idosos que tinham TFG entre acima e abaixo de 60 ml/min (caracterizando indivíduos idosos em estágios iniciais para DRC).

Smart *et al.* (2013) destacam em sua revisão de literatura 4 estudos utilizando exercício resistido isoladamente em pacientes com DRC. Estes estudos são pouco conclusivos e descrevem a melhora da força muscular. Um número maior de artigos descreve os efeitos dos exercícios aeróbios testados isoladamente e protocolos combinados de exercícios aeróbios e resistidos, porém com uma

diversidade de aplicações (exercícios realizados durante a hemodiálise e realizados nos dias interdiálise), diferenças de volume, intensidade e frequência de realização dos exercícios, dificultando determinar a melhor opção terapêutica. Os autores sugerem que mesmo com grande variedade de protocolos os benefícios suplantam os problemas, pois a prática de exercícios em pacientes com DRC é seguro, sem nenhum óbito relatado especificamente relacionado à prática de exercícios em 30.000 pacientes-hora estudados

Estudos em estágios iniciais da DRC são raros e seus resultados pouco conclusivos, principalmente pela heterogeneidade desta população em estágios mais iniciais da DRC, não havendo descrição precisa em humanos da influência do exercício aeróbio e resistido sobre a função renal diretamente (JOHANSEN; PAINTER, 2012).

Algumas limitações podem ser descritas em relação a este estudo. O número de animais nas amostras finais, pós-eutanásia, foi reduzido por perdas amostrais que não puderam ser incluídas nas análises, pois a maioria dos óbitos ocorreu no período noturno, o que impossibilitou a coleta de amostras para estudo destes animais. A não existência de um grupo *shan*, para compor as amostras, pois não era possível, logisticamente, ter mais animais sob experimentação. Porém todas as análises procuraram utilizar como comparação o padrão existente na literatura. A não inclusão de análise de densidade óssea no momento pré-cirurgia ocorreu por indisponibilidade técnica para análise deste parâmetro neste momento, o que foi possível no seguimento do experimento com a utilização das análises por meio de radiografia simples de membros posteriores. Outra limitação foi em relação à impossibilidade técnica de mensurar a força aplicada durante o exercício resistido. Porém este protocolo, com a utilização de rampa, em coelhos, é inovador e de interesse para a literatura, por não utilizar nenhum artifício ou estímulo negativo que gere impactos estressores no animal. Cabe ressaltar que mesmo com limitações de logística para implementar outros possíveis parâmetros de análise no delineamento experimental, foi possível a inclusão de alunos de iniciação científica no processo, a organização de pesquisa com este tipo de animal na instituição UNIGRAN e a integração dos setores de análises clínicas, análises histopatológicas, fisioterapia e hospital veterinário em uma mesma pesquisa, além da parceria com outras instituições (UEL) para efetuar toda a coleta de dados.

7 CONCLUSÕES

A técnica de isquemia e reperfusão renal unilateral, sem necessidade de um segundo tempo cirúrgico para nefrectomia, foi efetiva no desenvolvimento de um modelo animal de Doença Renal Crônica em coelhos nova zelândia branco. Os animais apresentaram boa sobrevida, possibilitaram coletas sanguíneas consecutivas sem comprometer a volemia do animal, os níveis séricos de uréia e creatinina apresentaram aumento gradativo comparáveis com o desenvolvimento da DRC, o rim direito, que não sofreu intervenção, apresentou lesões histopatológicas compatíveis ao dano oxidativo causada pela isquemia do rim contralateral e posterior processo de reperfusão.

Em relação aos efeitos da aplicação do protocolo de exercícios aeróbio e resistido no modelo animal proposto podemos concluir que:

- não foram encontrados efeitos estatisticamente significativos dos exercícios aeróbio e resistido na variável de morfometria de osso trabecular analisada, mostrando que os exercícios não influenciaram a evolução da DRC;
- a variável de densidade máxima apresentou menores valores no momento da coleta final, comportamento compatível com a evolução da DRC; não foram encontrados efeitos estatisticamente significativos dos exercícios aeróbio e resistido nas variáveis de densidade óssea analisadas, mostrando que os exercícios não influenciaram a evolução da doença;
- não foram encontrados efeitos estatisticamente significativos dos exercícios aeróbio e resistido nas variáveis bioquímicas de uréia, creatinina, Ph e calcitriol, mostrando que os exercícios não influenciaram a evolução da DRC;
- foi encontrada correlação significativa e negativa da variável bioquímica do Pth e a variável de densidade máxima, comportamento este esperado para a evolução da DRC no decorrer do tempo;
- não houve diferenças estatisticamente significativas no comportamento de todas as variáveis na comparação do efeito do exercício aeróbio e resistido no modelo animal de DRC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams GR, Vaziri ND. Skeletal muscle dysfunction in chronic renal failure: effects of exercise. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290:753-61.

Adey D, Kumar R, McCarthy JT, Nair KS. Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 278:219-25.

Afshar R, Shergarfy L, Shavandi N, Sanavi S. Effects of aerobic and resistance training on lipid profile and state of inflammation in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Indian J Nephrol*. 2010; 20(4):185-9.

Ambrus CS, Almasi CS, Berta K, Deak GY, Marton A, Molnar MZ. Bone mineral density and parathyroid function in patients on maintenance hemodialysis. *Int Urol Nephrol*. 2011; 43:191-201.

Bardin, T. Musculoskeletal manifestations of chronic renal failure. *Current Opinion in Rheumatology*. 2003; 15:48-54.

Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 281:887-99.

Bernardi, RM. Papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da insuficiência renal isquêmica: possibilidade terapêutica do uso de antioxidantes [Dissertação]. Criciúma-SC: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2007.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* Boston. 2011; 121 (11):4210 -21

Bouassida A, Zalleg D, Ajina Z M, Gharbi N, Duclos M, Richalet JP, *et al.* Parathyroid hormone concentrations during and after two periods of high intensity exercise with and without and intervening recovery period. *Eur J Appl Physiol.* 2003; 88:339-44.

Castaneda C, Gordon PL, Parker RC, Uhlin KL, Roubenoff R, Levey AS. Resistance Training to Reduce the Malnutrition-Inflammation Complex Syndrome of Chronic Kidney Disease. *American Journal of Kidney Diseases.* 2004; 43(4):607-16.

Chang JI, Som PM, Lawson W. Unique Imaging Findings in the Facial Bones of Renal Osteodystrophy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007; 28:608–09.

Chen MM, Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, Sprintiz S. Effect of treadmill exercise on tibial cortical bone in aged female rats: a histomorphometry and dual energy x-ray absorptiometry study. *Bone.* 1994; 15(3):313-9.

Chikotas N, Gunderman A, Oman T. Uremic syndrome and end-stage renal disease: Physical manifestations and beyond. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners.* 2006; 18:195-202.

Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Lente FV, Levey AS. Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *JAMA.* 2007; 298(17):2038-47.

Cory E, Nazarian A, Entezari V, Vartanians V, Müller R, Snyder BD. Compressive axial mechanical properties of rat bone as functions of bone volume fraction, apparent density and micro-ct based mineral density. *J Biomech.* 2010; 43:953-60.

Costa AFN, Pereira LPM, Perreira LPM, Ferreira ML, Silva PC, Chagar VLA, Schanaider A. Modelo cirúrgico de insuficiência renal crônica: Estudo em coelhos. *Rev Col Bras Cir.* 2009; 36(1):78-84.

Costa-Hong V, Bortolotto LA, Jorgetti V, Consolim- Colombo F, Krieger EM, Lima JJG. Estresse Oxidativo e Disfunção Endotelial na Doença Renal Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 92(5):413-18.

Craver L, Marco MP, Martínez I, Rue M, Borràs M, Martin ML, *et al.* Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5-achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22:1171-6.

Devarajan P. Update on Mechanisms of Ischemic Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17:1503–20.

Diaz-Corte C, Díaz MLN, Alonso CG, Barreto S, Andía JBC. Prevention, diagnosis and treatment of renal osteodystrophy in Spain. Preliminary results from a multicentre enquiry. *Nephrol Dial Transplant* 1998. 13 Suppl 3:51–6.

Emanuelli MP, Lopes STA, Maciel RM, Garmatza BC, Tavares MO. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, ureia e creatinina em coelhos. *Ciência Animal Brasileira.* 2008; 9(1):251-5.

Ferreira A, Frazão JM, Monier-Faugere MC, Gil C, Galvão J, Oliveira C, Baldaia J, Rodrigues I, Santos C, Ribeiro S, Hoenger RM, Duggal A, Malluche HH. Effects of Sevelamer Hydrochloride and Calcium Carbonate on Renal Osteodystrophy in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 405-12.

Fukagawa M, Kazama JJ, Kurokawa K. Renal osteodystrophy and secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17 Suppl 10: 2–5.

Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, Brown G. ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20: 2587–93.

Hallan SI, Ritz E, Ritz E, Lydersen S, Romundstad S, Kvenild K, Orth SR. Combining GFR and albuminuria to classify CKD improves prediction of ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20:1069-77.

Hallan SI, Orth SR. The conundrum of chronic kidney disease classification and end-stage renal risk prediction in the elderly - what is the right approach? *Nephron Clin Pract*. 2010; 116(4):307-16.

Hallan SI, Matsushita K, Sang Y, Mahmoodi BK, Black C, Ishani A, *et al*. Age and association of kidney measures with mortality and end-stage renal disease. *JAMA*. 2012; 308(22):2349-60.

Headley S, Germain M, Mailloux P, Mulhern J, Ashworth B, Burris J, *et al*. Resistance training improves strength and functional measures in patients with end-stage renal disease. *Am J kidney Dis*. 2002; 40(2):355-64.

Heiwe S, Jacobson SH. Exercise training for adults with chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; 5(10):CD003236.

Henrique DMN, Reboredo MM, Chaoubah A, Paula RB. Treinamento aeróbico melhora a capacidade funcional de pacientes em hemodiálise crônica. [homepage na Internet]. Juis de Fora: Sociedade Brasileira de Cardiologia; 2009 [acesso em 8 julho 2012]. Disponível em: <http://www.arquivosonline.com.br>

Hornberger TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the fhl muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 2004; 29(1):16-31.

Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *N Engl J Med.* 1995; 333(3):166-74.

Hsu CH, Patel S, Young EW, Simpson RU. Production and metabolic clearance of calcitriol in acute renal failure. *Kidney Int.* 1988; 33(2):530-5.

Ikizler TA. Protein and energy: recommended intake and nutrient supplementation in chronic dialysis patients. *Semin Dial.* 2004; 17(6): 471-78.

Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, et al. Acute kidney injury increases risk of esrd among elderly. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20:223–8.

Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. Effect of exercise on tibial and lumbar vertebral bone mass in mature osteopenic rats: bone histomorphometry study. *J Orthop Sci.* 1998; 3:257-63.

Jamal SA, Cheung AM, West SL, Lok CE. Bone mineral density by DXA and HR pQCT can discriminate fracture status in men and women with stages 3 to 5 chronic kidney disease. *Osteoporos Int.* 2012; 23:2805-13.

Johansen KL. Exercise and dialysis. *Hemodial Int.* 2008; 12: 290-300.

Johansen KL, Painter P. Exercise in individuals with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2012; 59 (1):126-34.

Kang D, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson A, Kerjaschki D, *et al.* role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 806–16.

Kansal S, Fried L. Bone disease in elderly individuals with CKD. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010; 17(4):41-51.

K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39 Suppl 1:1-266.

Kelley GA, Kelley KS, Tran ZV. Exercise and bone mineral density in men: a metaanalysis. *J Appl Physiol* 2000; 88:1730–6.

Kelley GA, Kelley KS, Kohrt WM. Exercise and bone mineral density in men: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone*. 2013; 53:103-11.

Kirsztajn GM; Basto MG; Adriolo A. Proteinúria e creatinina sérica: testes essenciais para diagnóstico de doença renal crônica. *J Bras Patol Med Lab*. 2011; 47 (2):100-3.

Konstantinidou E, Koukouvou G, Kouidi E, Deligianis A, Tourkantonis A. Exercise training in patients with end-stage renal disease on hemodialysis: comparison of three rehabilitation programs. *J Rehabil Med*. 2002; 34: 40-5.

Kosmadakis GC, Bevington A, Smith AC, Clapp EL, Viana JL, Bishop NC, *et al*. Physical exercise in patients with severe kidney disease. *Nephron Clin Pract*. 2010; 115: 7-16.

Kouidi E, Albani M, Natsis K, Megalopoulos A, Gigis P, Guiba-Tziampiri O, *et al*. The effects of exercise training on muscle atrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13:685-99.

Legrand M, Mik EJ, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and disoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *J Mol Med*. 2008; 14 (7-8): 502-16.

Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, *et al*. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150:604-12.

Levey AS, Jong PE, Coresh J, Nahas ME, Astor BC, Matsushita K, *et al* . The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO controversies conference report. *Kidney Int*. 2011;80(1):17-28.

Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012; 379:165-80.

Luciano EP, Luconi PS, Sesso RC, Melaragno CS, Abreu PF, Reis SFS, *et al.* Estudo prospectivo de 2151 pacientes com doença renal crônica em tratamento conservador com abordagem multidisciplinar no Vale do Paraíba, SP. *J Bras Nefrol* 2012;34(3):226-34.

Magacho EJC, Pereira AC, Mansur HN, Bastos MG. Nomograma para a estimação da taxa de filtração glomerular baseado na fórmula CKD-EPI. *J Bras Nefrol* 2012;34(3):313-31.

Magro MCS, Vattimo MF. Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2007; 19(2):182-85.

MacWay F, Lessard M, Lafage-Proust MH. Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Joint Bone Spine*. 2012; 79: 544-9.

Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, *et al.* Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2006; 69:1945-53.

McIntyre CW, Selby NM, Sigrist M, Pearce LE, Mercer TH, Naish PF. Patients receiving maintenance dialysis have more severe functionally significant skeletal muscle wasting than patients with dialysis-independent chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 2210–6.

Meyer F, Silva FMDS, Bombonato GM, Lizana JN, Dziedricki LF, Krieger ML. Histological analysis and the blood flux in kidneys submitted to different periods of ischemia/reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2011; 2(6):451-5.

Moinuddin I, Leehey DJ. a comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2008; 15(1):83-96.

Moore C, Yee J, Malluche H, Rao S, Monier-Faugere MC, Adams E, *et al.* Relationship between bone histology and markers of bone and mineral metabolism in african-american hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4:1484–93.

Mueller PJ, O'Hagan KP, Skogg KA, Buckwalter JB, Clifford PS. Renal hemodynamic responses to dynamic exercise in rabbits. *Journal of Applied Physiology.* 1998; 85(5): 1605–14.

Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute. *BMC Med.* 2011; 9(11):1-6.

Ott SM. Histomorphometric measurements of bone turnover, mineralization, and volume. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:151–6.

Palm F, Nangaku M, Fasching A, Tanaka T, Nordquist L, Hansell P, *et al.* Uremia induces abnormal oxygen consumption in tubules and aggravates chronic hypoxia of the kidney via oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 299: 380-86.

Parsons TL, Toffelmire EB, Vlack CEK. Exercise training during hemodialysis improves dialysis efficacy and physical performance. *Arch Phys Med Rehabil.* 2006; 87: 680-7.

Passos VM, Barreto SM, Lima-Costa MF. Detection of renal dysfunction based on serum creatinina levels in Brazilian community: the Bambuí Health and Aging Study. *Braz J Med Biol Res.* 2003 Mar; 36(3):393-401.

Reboredo MM, Pinheiro BV, Neder JA, Ávila MPW, Ribeiro MLBA, Mendonça AF, et al. Effects of aerobic training during hemodialysis on heart rate variability and left ventricular function in end-stage renal disease patients. *J Bras Nefro.* 2010; 32 (4): 367-73.

Redrobe S. Calcium metabolismo in rabbits. *Sem Avian Exot Pet Med.* 2002; 11(2):94-101.

Romão Junior JE. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol.* 2004; 26(3) Suppl 1:1-3.

Rong H, Berg U, Torring O, Sundberg CJ, Granberg B, Bucht E. Effect of acute endurance and strength exercise on circulation calcium-regulation hormones and bone markers in young healthy males. *Scand J Med Sci Sport.* 1997; 7: 152-9.

Royal College of Physicians. Chronic kidney disease: national clinical guideline for early identification and management in adults in primary and secondary care. London, September, 2008.

Sakkas GK, Sargeant AJ, Mercer TH, Ball D, Koufaki P, Karatzaferi C, et al. Changes in muscle morphology in dialysis patients after 6 months of aerobic exercise training. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18:1854-61.

Sesso RCC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR. Diálise crônica no brasil - relatório do censo brasileiro de diálise, 2011. *J Bras Nefrol* 2012;34(3):272-7.

Sinha R, Nandi M, Tullus K, Marks SD, Taraphder A. Ten-year follow-up of children after acute renal failure from a developing country. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24:829–33.

Smart NA, Williams AD, Levinger I, Selig S, Howden E, Coombes JS, *et al*. Exercise & sports science Australia (ESSA) position statement on exercise an chronic kidney disease. *J Sci Med Sport*. 2013; 16: 406-11.

Sodré FL, Costa JCB, Lima JCC. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *J Bras Patol Med Lab*. 2007; 43(5):329-37.

Souza PHC, Costa NP, Veeck EB. Influence of soft tissues on mandibular gray scale levels. *Braz Oral Res*. 2004;18(1):40-4.

Stevens LA, Viswanathan G, Weiner DE. Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the elderly population: current prevalence, future projections, and clinical significance. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010; 17(4): 293-30.

Sutton TA. A. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvasc Res.* 2009; 77 (1): 4-7.

Tanaka H, Komaba H, Koizumi M, Kakuta T, Fukagawa M. Role of uremic toxins and oxidative stress in the development of chronic kidney disease—mineral and bone disorder. *J Ren Nutr.* 2012; 22(1):98-101.

Thompson RH, Frank I, Lohse CM, Saad IR, Fergany A, Zincke H, Leibovich BC, *et al.* The impact of ischemia time during open nephron sparing surgery on solitary kidneys: a multi-institutional study. *J Urol.* 2007; 177: 471-6.

Ureña P, Bernard-Poenaru O, Ostertag A, Baudoin C, Cohen-Solal M, Cantor T, *et al.* Bone mineral density, biochemical markers and skeletal fractures in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:2325-31.

Violan MA, Pomes T, Maldonado S, Roura G, De La Fuente L, Verdaguer T, *et al.* Exercise capacity in hemodialysis and renal transplant patients. *Transplant Proc.* 2002; 34:417-8.

Warren HB, Lausen NC, Segre GV, el-Hajj G, Brown EM. Regulation of calciotropic hormones in vivo in the New Zealand white rabbit. *Endocrinology.* 1989 Nov;125(5):2683-90.

Winearls CG, Glasscock RJ. Classification of chronic kidney disease in the elderly: pitfalls and errors. *Nephron Clin Pract* 2011;119 Suppl 1:2–4.

Yamaguchi T, Kanno E, Tsubota J, Shiomi T, Nakai M, Hattori S. Retrospective study on the usefulness of radius and lumbar bone density in the separation of hemodialysis patients with fractures from those without fractures. *Bone*. 1996; 19(5):549-55.

Yeh JK, Niu Q, Evans JF, Iwamoto J, Aloia JF. Effect of circular motion exercise on bone modeling and bone mass in young rats: an animal model of isometric exercise. *J Musculoskel Neuron Interact*. 2001; 1(3):235-40.

Youhua L. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 212–22.

Zhang M, Hsu R, Hsu CY, Kordesch K, Nicasio E, Cortez A, McAlpine I, Brady S, Zhuo H, Kangelaris KN, Stein J, Calfee CS, Liu KD. FGF-23 and PTH levels in patients with acute kidney injury. A cross-sectional case series study. *Ann Intensive Care*. 2011 Jun 14;1(1):21.

ANEXO

ANEXO A – Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais/ CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 280 da Mestranda Eliane Barbosa Togoe, sob a orientação da Profª. Drª. Iandara Schetter Silva, referente ao projeto de pesquisa, “Análise histopatológica da estrutura de um modelo de insuficiência renal crônica em coelhos submetidos ao exercício físico aeróbico e resistido”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 11 de março de 2011.

Campo Grande (MS), 11 de março de 2011.



Drª Joice Stein
Presidente da CEUA