

ELIANE BARBOSA TOGOE

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO AERÓBIO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE
VARIÁVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO E MORFOMETRIA MUSCULAR EM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA RENAL**

Campo Grande

2019

ELIANE BARBOSA TOGOE

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO AERÓBIO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE
VARIÁVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO E MORFOMETRIA MUSCULAR EM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA RENAL**

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^a Dra. Iandara Schettert
Silva

Campo Grande
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELIANE BARBOSA TOGOE

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO AERÓBIO DE ALTA INTENSIDADE SOBRE
VARIÁVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO E MORFOMETRIA MUSCULAR EM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA RENAL**

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 2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dra. Juliana Loprete Cury
Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN

Prof. Dr Daniel Martins Pereira
Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantana - UNIDERP

Prof. Dra. Susi Miziara
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS

Prof. Dr. Ruy de Araújo Caldas
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho, minha mãe, meu esposo, por me acompanharem durante minha trajetória e não me deixarem desistir, por eles e para eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Meu Deus** pela força que me concedeu para continuar a lutar sempre e nunca desistir. Agradeço pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho.

Agradeço à minha família. À minha **Mãe**, obrigada por sempre caminhar comigo em caminhos muitas vezes cheio de pedras e buracos, por ter me ensinado a nunca desistir dos meus sonhos. Ao meu filho **Lucas Kenji**, obrigado, e aqui agradeço a DEUS por você existir, você é a razão de todos os meus esforços, para você e por você. Ao meu esposo, **Nilton**, obrigada por seu apoio, paciência, sem sua presença e ajuda os obstáculos da estrada seriam mais difíceis, você me ajuda a ver luz no fim do túnel. De coração, obrigada.

À minha orientadora **Prof.^a Dra. Iandara Schettert Silva**, obrigada pela sua dedicação, pelos caminhos que me ajudou a percorrer e principalmente, por ter acreditado em mim desde o início, sem seu apoio esse sonho não se concretizaria. Minha Gratidão.

À minha orientadora, amiga, professora desde a graduação, **Prof.^a Dra. Juliana Loprete Cury**, obrigada por semear em mim a semente da pesquisa, por me incentivar e dizer que eu podia quando as vezes eu achava que não, por doar seu tempo e conhecimento, por sua paciência, pelas discussões que me ajudaram a ascender à luz do entendimento, por sempre estar disponível nas horas mais difíceis. Meu obrigado sempre.

À **Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS** agradeço a oportunidade de realizar o doutorado.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) agradeço o apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Centro Universitário da Grande Dourados obrigada pela gentil cedência de seus laboratórios.

Ao **Prof. Dr. Jesser de Almeida** obrigada por dividir comigo suas experiências relacionadas ao método do exercício.

Ao **Prof. Dr. Márcio Eduardo de Barros**, da Universidade Federal de Dourados – UFGD, agradeço por ceder laboratórios para realização de uma etapa desta pesquisa.

Às **Veterinárias Larissa S. Rosseti e Daniela Cantadori**, obrigada pela contribuição fundamental à execução desta pesquisa.

Ao **laboratório de patologia experimental e Professores**, agradeço p colaborar com o processamento do material biológico.

À **Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier**, agradeço imensamente pela gentil acolhida em seu laboratório, por disponibilizar tempo, conhecimento, recursos, tornando possível a análise deste estudo.

À Bioquímica Fernanda Paschoal, obrigada por sua paciência, dedicação e ensinamentos e sua imensa contribuição no processamento das amostras.

Ao **Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste**, Professores e Funcionários agradeço por possibilitarem a realização de um grande sonho.

Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.

Augusto Cury

RESUMO

TOGOE, E.B. **Influência do treinamento aeróbio de alta intensidade sobre variáveis de estresse oxidativo e morfometria muscular em modelo animal de doença renal.** [Tese de Doutorado] Campo Grande; 2019. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Introdução: A doença renal crônica (DRC) representa um grave problema de saúde pública, está associada a aumento nos riscos de mortalidade e comorbidades. A lesão por isquemia e reperfusão (I/E) no rim leva a uma lesão renal aguda e consequente efeitos secundários que levam a déficits na função renal. A lesão renal aguda é uma das maiores causas de desenvolvimento da doença renal crônica (DRC). Nesse processo há um quadro inflamatório crônico e aumento do estresse oxidativo que levam a perda de massa muscular, com consequente prejuízo na capacidade física. Uma das estratégias para reverter ou minimizar os déficits da função renal é o treinamento aeróbio.

Objetivo: Analisar efeito do treinamento aeróbio de alta intensidade sobre parâmetros de estresse oxidativo do tecido muscular e morfometria muscular em um modelo de doença renal.

Métodos: Utilizou-se 21 ratos adultos Wistar divididos em 3 grupos: saudável sedentário (SvSd), renal sedentário (RnSd) e renal treinamento (RnTn). Os grupos RnSd e RnTn realizaram isquemia e reperfusão renal unilateral por 10 minutos. Após 21 dias do procedimento o grupo RnTn realizou 6 semanas de treinamento aeróbio de alta intensidade (TAAI) modalidade natação. Após eutanásia foram analisados: creatinina sérica (Cr), níveis de proteínas carboniladas (PC). Quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido (QL) foi empregada para a estimativa de hidroperóxido lipídico com análise da curva de QL, área sob a curva, velocidade de emissão de fótons e pico. Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi avaliada e índice de estresse foi calculado. A área de secção transversa das fibras (AST) musculares do músculo gastrôcnemio foi mensurada.

Resultados: O nível de Cr (mg/dL) foi significativamente maior ($p=0,0053$) para RnSd ($0,82\pm0,04$) que os demais RnTn ($0,55\pm0,04$) e SvSd ($0,55\pm0,04$). Os resultados das variáveis obtidas na QL (em RLU/g de tecido) foram: curva de QL significativamente maior para RnSd ($333,2\pm14,00$, $p<0,05$) em comparação com os grupos SvSd e RnTn ($118,4\pm3,83$; $218,4\pm8,30$), área sob curva significativamente maior para RnSd (12.488 ± 1663 , $p=0,0018$) em relação SvSd e RnTn ($4.426\pm497,9$; 8.196 ± 1.425); velocidade de subida apresentou valor significativamente maior para RnSd ($46,38\pm7,48$, $p=0,0274$) que SvSd e RnTn ($17,54 \pm 5,95$; $28,34 \pm 4,02$); pico foi significativamente maior para RnSd ($480,00 \pm 67,09$, $p=0,0009$) em comparação com SvSd e RnTn ($161,60\pm19,33$; $302,70\pm48,13$). Os níveis de PC (em nmols de proteína carbonilada/mg tecido) foram significativamente maiores no RnSd ($35,33 \pm 2,33$) e RnTn ($27,01 \pm 0,87$) comparado com SvSd ($16,56\pm1,89$; $27,01\pm0,87$). Entre os grupos renais, RnSd apresentou níveis de proteína carbonilada significativamente maior que RnTn. Os níveis de GSH (em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) foram significativamente menores no RnSd e RnTn ($1,07 \pm 0,057$, $p=0,0007$; $0,96 \pm 0,034$, $p<0,0001$) comparado com SvSd ($1,44\pm0,072$). Não houve diferença nos níveis de GSSG (em $\mu\text{M}/\text{mg}$) proteína entre os grupos: SvSd ($0,05\pm0,001$), RnSd ($0,05 \pm 0,003$) e RnTn ($0,05 \pm 0,003$). O índice de estresse foi significativamente maior no RnSd e RnTn ($0,053 \pm 0,004$, $p<0,05$; $0,061 \pm 0,005$, $p<0,001$) comparado com SvSd ($0,037 \pm 0,001$). A análise morfométrica

(intervalo de classes de AST em μm^2 / frequência absoluta de fibras musculares em cada classe) indicou que o percentil 50 ocorreu em: SvSd 7ª classe (3000.00–3499.00 / 515), RnSd 8ª classe (3500.00–3999.00 / 484), RnTn 5ª classe (2000.00–2499.00 / 856). A AST das maiores fibras para RnSd, RnTn, SvSd foi de 9953,00, 9969,00, 11228,00, respectivamente. Observou-se alta frequência de fibras com menor AST ocorreu na 4ª, 5ª, 6ª e 7ª classe para RnTn, ausência de fibras na 22ª, 23ª classes (RnSd e RnTn).

Conclusão: o TAAI em modelo animal de doença renal mostrou efeito redutor da Creatinina sérica, foi capaz de promover uma menor peroxidação lipídica e níveis de proteínas carboniladas e consequentemente atenuou o estresse oxidativo no músculo, não incrementou as defesas antioxidantes, porém foi capaz de otimizar a defesa celular e promover um menor estresse oxidativo, induziu maior frequência de distribuição das fibras de menor área de secção transversa nos animais, indicando remodelamento muscular.

Palavras chaves: Isquemia e reperfusão, doença renal, estresse oxidativo, treinamento aeróbio.

ABSTRACT

TOGOE, E.B. **Influence of high intensity aerobic training on variables of oxidative stress and muscular morphometry in animal model of renal disease.** [Doctoral Degree Tesis] Campo Grande; 2019. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) is a serious public health problem, associated with an increased risk of mortality and comorbidities. Injury to ischemia and reperfusion (I / E) in the kidney leads to acute renal injury and consequent side effects leading to deficits in renal function. Acute kidney injury is one of the major causes of chronic kidney disease (CKD) development. In this process there is a chronic inflammatory picture and increased oxidative stress that lead to loss of muscle mass, with consequent impairment in physical capacity. One of the strategies for reversing or minimizing renal function deficits is aerobic training.

Objective: To analyze the effect of high intensity aerobic training (HIAT) on parameters of oxidative stress of muscle tissue and muscular morphometry in animal model of renal disease.

Methods: Twenty-one adult Wistar rats were divided into three groups: healthy sedentary (HS), renal disease sedentary (RDS), and renal disease with aerobic training (RDAT). The groups RDS and RDAT were subjected to unilateral renal ischemia-reperfusion for 10 min. Twenty-one days after the procedure, the RDAT group was subjected to 6 weeks of high intensity aerobic training (HIAT) (swimming). After euthanasia, serum creatinine (Cr) level, carbonyl protein (CP) were measured. Chemiluminescence stimulated by t-butyl hydroperoxide (CL) was used for the estimation of lipid hydroperoxide with analysis of the QL curve, area under the curve, photon emission velocity and peak, glutathione (GSH and GSSG) was evaluated and morphometric analysis of the cross-sectional area (CSA) of the gastrocnemius muscle was performed.

Results: The Cr level (in mg/dL) was significantly higher ($p = 0.0053$) in the RDS group (0.82 ± 0.04) than in the other groups (RDAT 0.55 ± 0.04 ; HS 0.55 ± 0.04). The results of the variables obtained in QL (in RLU / g tissue) were: significantly higher QL curve for the RDS (333.2 ± 14.00 , $p < 0.05$) compared to the HS and RDAT (118.4 ± 3.83 , 218.4 ± 8.30), area under the curve was significantly higher in the RDS (12488.00 ± 1663.00 $p = 0.0018$) than the HS and RDAT (4426.00 ± 497.9 ; 8116.00 ± 1425.00), photon emission velocity analysis showed a significantly higher value in the RDS (46.38 ± 7.48 , $p = 0.0274$) than the HS and RDAT (17.54 ± 5.95 ; 28.34 ± 4.02), photon emission peak was significantly higher in the RDS (480.00 ± 67.09 , $p = 0.0009$) compared with HS and RDAT (161.60 ± 19.33 ; 302.70 ± 48.13). The levels of PC (in nmolls of carbonyl protein/mg tissue) were significantly higher in the RDS (35.33 ± 2.33) and RDAT (27.01 ± 0.87) compared to HS (16.56 ± 1.89 , 27.01 ± 0.87). Among the renal groups, RDS had significantly higher levels of PC than RDAT. GSH levels (in $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein) were significantly lower in the RDS and RDAT (1.07 ± 0.057 , $p = 0.0007$, 0.96 ± 0.034 , $p < 0.0001$) compared with HS (1.44 ± 0.072). There was no difference in GSSG levels between groups: HS (0.05 ± 0.001), RDS (0.05 ± 0.003) and RDAT (0.05 ± 0.003).

The stress index was significantly higher in the RDS and RDAT (0.053 ± 0.004 , $p < 0.05$; 0.061 ± 0.005 , $p < 0.001$) compared with HS (0.037 ± 0.001). Morphometric analysis (class interval of CSA in $\mu\text{m}^2/\text{absolute frequency of muscle fibers in each class}$) indicated that 50th percentile occurred in: HS 7th class (3000.00–3499.00/515),

RDS, 8th class (3500.00–3999.00/484), RDAT 5th class (2000.00–2499.00/856). CSA of largest fibers in RDS, RDAT, HS was 9953.00 μm^2 , 9969.00 μm^2 , 11228.00 μm^2 , respectively. High frequency of fibers with lower CSA occurred in 4th, 5th, 6th and 7th class in RDA, absence of fibers into 22nd, 23rd classes (RDS and RDAT).

Conclusion: The HIAT in animal model of renal disease showed reductive effect of serum Creatinine, was able to promote a lower lipid peroxidation and levels of carbonylated proteins with consequently attenuated the oxidative stress in the muscle, did not increase the antioxidant defenses, but was able to optimize the cellular defense and to promote a lower oxidative stress, induced a greater frequency of distribution of the fibers of smaller cross-sectional area in the animals, indicating muscle remodeling.

Keywords: Ischemia-Reperfusion, Renal Disease, Muscle Atrophy, Aerobic Exercise.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Distribuição de grupos, intervenção, intensidade do treinamento físico e número de animais.....	42
Tabela 2. Características dos grupos relacionados a peso corporal, carga máxima, Creatinina sérica.....	50
Tabela 3. Comportamento da Glutathione Reduzida e Oxidada.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Mecanismos celulares relacionados ao estresse oxidativo e estado redox.....	26
Figura 02. Ilustração da liberação de miofilamentos mediada por calpaínas na atrofia muscular.....	32
Figura 03. Ilustração da degradação proteica induzida por UPS na DRC.....	33
Figura 04. Representação esquemática das vias de sinalização que levam à ativação de caspase-3.....	34
Figura 05. Potenciais mecanismos pelos quais as citocinas pró e anti-inflamatórias podem promover aterosclerose acelerada, perda de massa muscular e outras complicações urêmicas.....	35
Figura 06: Série temporal dos procedimentos e variáveis coletadas no delineamento experimental.....	42
Figura 07. Animais durante a prática de natação.....	44
Figura 08. Imagem capturada do software durante a mensuração da área de secção transversa das fibras musculares do músculo gastrôcnemio direito.....	48
Figura 9. Painel mostrando resultados obtidos por Quimiluminescência (QL) nos Níveis de hidroperóxido lipídico de tecido muscular de ratos renais submetidos a protocolo de exercício aeróbio de alta intensidade modalidade natação.....	52
Figura 10. Níveis de proteínas carboniladas em homogenato de músculo gastrôcnemio	53
Figura 11. Diferenças histológicas e morfométrica no músculo gastrocnêmio nos grupos de estudo.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AKT	Proteína Quinase B
AST	Área de Secção Transversa
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GH	Hormônio do Crescimento
GSH	Glutathione reduzida
GPx	Glutathione peroxidase
GRd	Glutathione Redutase
GSSG	Glutathione oxidada
IE	Índice de Estresse
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL6	Interleucina 6
IR	Isquemia e Reperfusão
KCL	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
LPO	Lipoperoxidação
MC	Massa Corporal
Myf-5	Fator de regulação miogênico
MyOD	Proteína de Determinação de Mioblasto
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Denucleotídeo Fosfato
PGC-1	Co-ativador de transcrição
QL	Quimiluminescência estimulada por Terc-butil hidroperóxido
RnSd	Renal Sedentário
RNTN	Renal treinamento
SOD	Superóxido Dismutase
SUP	Sistema Ubiquitina Proteossoma
SvSd	Saudável Sedentário
TAAI	Treinamento Aeróbico de alta Intensidade
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TNFα	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Doença Renal Crônica	20
2.2 Isquemia e Reperfusão Renal.....	22
2.3 Papel do Estresse Oxidativo na Doença.....	23
2.2 Estresse Oxidativo na DRC	27
2.4 Disfunção muscular na DRC	29
2.5 Mecanismos de Perda de Massa Muscular	31
2.6 DRC e Exercício Físico	36
3 OBJETIVO GERAL	40
3.1 Objetivos específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Tipo de Estudo	41
4.2 Amostra.....	41
4.3 Delineamento Experimental	41
4.3.1 Distribuição dos Grupos.....	42
4.4 Procedimentos da Pesquisa	43
4.4.1 Cirurgia: Isquemia e Reperfusão Renal	43
4.4.2 Protocolo de Exercício Físico	43
4.4.3 Eutanásia.....	45
4.5 Coleta e Preparação das Amostras	45
4.6 Análise Bioquímica.....	45
4.7 Determinação do estresse oxidativo	45
4.7.1 Quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido - QL.....	45
4.7.2 Quantificação de Proteínas Carboniladas -PC	46
4.7.3 Quantificação de Glutathione Reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) tecidual	47
4.8 Análise morfométrica do músculo gastrocnêmio	47
4.9 Análise estatística	48
5. RESULTADOS	50
5.1 Quimiluminescência estimulada por tert-butil (QL).....	51
5.2 Quantificação de Proteínas Carboniladas (PC)	53
5.3 Quantificação de Glutathione Reduzida (GSH) e Oxidada (GSSG) tecidual. ...	54
5.4 Análise morfométrica do músculo gastrocnêmio.....	55
6. DISCUSSÃO	57

7. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	66
APÊNDICE: Artigo.....	82
ANEXO A: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) representa uma grande preocupação de saúde pública, está associada à aumento nos riscos de mortalidade e comorbidades. Nos Estados Unidos, entre 2005 a 2012 aproximadamente 14% da população americana adulta apresentou DRC e em determinados grupos, como os com idade superior a 60 anos, a prevalência da doença chegou à 25%. (DHARMARAJAN *et al.* 2017). No Brasil, não há estimativa precisa da DRC pré-dialítica, estudos epidemiológicos sugerem que cerca de 3 a 6 milhões de brasileiros apresentam hipercreatinemia, uma taxa em torno de 3%. No entanto esses dados não estão de acordo com o panorama mundial, com estimativa de 10 a 15% da população afetada em algum grau pela DRC (LEVIN *et al.* 2017, MARINHO *et al.* 2017).

Os rins são órgãos responsáveis por várias funções essenciais para equilíbrio do organismo humano como regulação dos fluidos corporais, pressão arterial, excreção de resíduos, absorção de substâncias indispensáveis ao metabolismo. As doenças renais representam em todo mundo um problema de saúde com significativa morbidade e mortalidade entre adultos, principalmente idosos. Podem ser classificadas em dois tipos, lesão renal aguda e doença renal crônica (SURESHBABU; RYTER; CHOI, 2015).

A lesão por isquemia e reperfusão (I/R) é a maior causa da doença renal crônica (DRC). No rim a lesão I/R leva a consequências agudas e crônicas que culminam na diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e consequente aumento nos níveis de creatina sérica (Cr), marcador de disfunção renal (STEVENS; LEVEY, 2005; SUTTON, 2009).

Após uma lesão isquêmica, os rins passam por processo de reparo, adaptação ao estresse, alteração metabólica, infiltração de células inflamatórias. Uma consequente recuperação incompleta da lesão isquêmica leva à uma alteração crônica dos rins com persistente inflamação, rarefação vascular, atrofia tubular, fibrose intersticial e hipertrofia dos néfrons remanescentes. Estudos indicam que os efeitos imediatos e tardios de uma lesão renal aguda estão relacionados com a cronicidade do distúrbio renal e prejuízo da função levando ao desenvolvimento de DRC (GRGIC *et al.* 2012; YANG *et al.*; STRAUSSER; NAKANO; SOUMA, 2018; VENKATACHALAM *et al.*, 2015; ISHANI *et al.*, 2009; SCHNAPER, 2017).

A DRC leva a uma disfunção muscular importante caracterizada por perda de massa muscular que contribui para aumento da morbidade e mortalidade, com sérios prejuízos para qualidade de vida do indivíduo. Vários fatores relacionados à uremia contribuem para o desequilíbrio do balanço proteico como a redução da ingestão de nutrientes, inatividade física, acidose, inflamação e sepse (ADAMS; VAZIRI, 2005; CARRERO *et al.*, 2008).

Os mecanismos envolvidos na perda de massa muscular incluem aumento da degradação de proteínas, diminuição da síntese proteica e comprometimento das células satélite. Além disso, o estresse oxidativo presente na DRC é um importante regulador das vias que modulam a atrofia muscular (BAILEY *et al.*, 20016; TUCKER; SCANLAN; DALBO, 2015; POWERS; KAVAZIS; MCCLUNG, 2007).

Estratégias terapêuticas que contribuem para diminuir a perda de massa muscular na DRC incluem terapia hormonal, otimização na ingesta de nutrientes e exercício físico (JOHANSEN; PAINTER, 2012).

O treinamento físico aeróbio é uma das modalidades terapêuticas que tem recebido muita atenção pois reduz sintomas da uremia, inflamação, marcadores do estresse oxidativo, com melhora da função muscular esquelética, capacidade de exercício e qualidade de vida dos indivíduos (HEIWE; JACOBSON, 2011).

Apesar do exercício aeróbio estar associado a maior produção de radicais livres devido aumento do consumo de oxigênio e ativação de via metabólicas específicas, sabe-se que a longo prazo, durante um treinamento crônico, há uma adaptação ao estresse oxidativo com incremento na defesa antioxidante e diminuição do perfil inflamatório (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Alguns protocolos de treinamento físico que incluíram exercícios aeróbios e de resistência têm apresentado efeitos positivos como diminuição do estresse oxidativo, inflamação e preservação da massa muscular na DRC. No entanto, outro estudo não observou diferença significativa nos biomarcadores de estresse oxidativo de indivíduos com DRC submetidos a 12 meses de intervenção com exercício aeróbio e de resistência, intensidade moderada (ABREU *et al.* 2017; KOPPLE *et al.* 2007; SMALL *et al.* 2017).

Embora existam muitos estudos que recomendam a necessidade da prática do exercício físico como parte do tratamento para os pacientes com DRC, ainda não se reconhece com clareza seu verdadeiro efeito sobre uma série de fatores clínicos. Isso pode ser consequência de diferentes protocolos de exercícios descritos na

literatura, incluindo diferentes modalidades (aeróbio, resistência ou a combinação de ambos) e intensidades. Além disso, devido à dificuldade de estudar algumas variáveis em indivíduos humanos, ainda é inconclusivo até que ponto o treinamento físico é benéfico para indivíduos com DRC e qual intensidade de treinamento ofereceria maior benefício ou malefício (WILLIAMS; FASSETT; COOMBES, 2014). Nesse sentido o uso de animais se configura em uma importante estratégia para elucidar hipóteses que seriam difíceis em humanos.

Dessa forma o objetivo deste estudo é analisar efeito do treinamento aeróbio de alta intensidade sobre parâmetros de estresse oxidativo e morfometria muscular em um modelo animal de doença renal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença Renal Crônica

A Doença Renal Crônica (DRC) configura-se no contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT). As DCNT são um problema de saúde global e caracterizam-se como uma das principais fontes de cargas de doenças no Brasil e ameaçam a saúde e o desenvolvimento humano. A carga dessas doenças recai especialmente sobre países de baixa e média renda. Indivíduos acometidos por algum tipo de doença crônica sofrem alterações no seu cotidiano provocadas por restrições decorrente da enfermidade e seu tratamento (DUCAN et al, 2012).

Considerada uma epidemia mundial, a DRC é um grave problema de saúde pública. Estima-se que no mundo há cerca de 1,4 milhões de indivíduos com a doença, com um aumento anual de 8%. No Brasil, segundo Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica de 2016, há em torno de 122.825 pacientes em diálise, perfazendo um aumento anual de 6,3%. Entretanto, dados relacionados a DRC não dialítica ainda são escassos, mas estima-se que há cerca de 3 a 6 milhões de brasileiros com a função renal alterada. As principais doenças de base para DRC são hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus (BASTOS, KIRSZTAJN, 2011).

A detecção precoce da doença renal possibilita condutas terapêuticas apropriadas para o retardamento da sua progressão, além da redução do sofrimento do paciente e sua família. Nesse sentido, a *Kidney Disease Outcome Quality Initiative* (KDOQI), introduziu um modelo conceitual para abordagem da DRC que compreendeu avaliação, classificação e estratificação de risco. Esse modelo incluiu antecedentes associado ao aumento do risco em desenvolver DRC, estágios iniciais que poderiam progredir ou levar a complicações e doença renal terminal, quando o indivíduo necessita de terapia de substituição renal. A partir de então, o diagnóstico da DRC baseia-se em três componentes: anatômico ou estrutural (marcadores de dano renal); funcional (baseado na TFG) e temporal. Com base na TFG a doença foi então classificada em cinco estágios, sendo que sinal clínico mais claro de lesão renal é a presença de albuminúria e taxa de filtração glomerular (TFG) abaixo de 60 mL/min (K/DOQI, 2002; EKNOYAN, 2003; ROMÃO JUNIOR, 2004; LEVEY et al., 2011).

O sistema de classificação e estadiamento da DRC permite uma padronização da terminologia e facilita a comunicação dos profissionais de saúde da

área e a tomada de decisão para acompanhamento da progressão da doença. Assim, todos os pacientes com diagnóstico da DRC ou que fazem parte do grupo de risco, devem ser classificados de acordo com estágio de lesão renal (ENE-IORDACHE *et al.*, 2016; BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

Entretanto essa classificação não oferece parâmetros para análise do efeito funcional nos demais sistemas do organismo, que são afetados em estágios iniciais da DRC. Até alguns anos atrás, os estudos eram voltados para o estágio final da doença, no sentido de buscar aprimoramento nas terapias dialíticas e transplante renal. Atualmente as pesquisas se concentram no diagnóstico precoce da DRC e uma abordagem preventiva de sua evolução ou comorbidades, baseados no aumento significativo da prevalência da doença nos últimos anos em todo mundo. Dessa forma, emergiu o reconhecimento de que a DRC é uma doença multifatorial, problema de saúde pública com prevalência ascendente e precisa de diagnóstico precoce para que o tratamento o indivíduo se inicie na fase pré-dialítica, promovendo a manutenção da função renal e seu declínio progressivo, além de diminuir a necessidade de terapia renal substitutiva e transplantes, que juntos geram um enorme impacto nos gastos públicos (HALLAN; ORTH, 2010; LEVEY *et al.*, 2011).

A identificação precoce da DRC configura-se desafiadora, devido acesso limitado aos serviços de saúde, escassez de médicos especializados para o acompanhamento adequado dos indivíduos em estágios iniciais. Além disso, ausência de sistema de informação preciso que pudesse gerar dados confiáveis sobre a DRC contribui para deficiência de dados epidemiológicos confiáveis. No Brasil, alguns estudos sugerem 1,5% de DRC auto referida, níveis elevados de creatinina séria em 3% da população, considerando esses dados, estima-se que 3 a 6 milhões de adultos teriam a doença. A deficiência na estimativa da prevalência da DRC em estágios iniciais dificulta o planejamento de ações preventivas e assistenciais (BARRETO *et al.*, 2016; ENE-IORDACHE *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2017).

A causa da doença renal, muitas vezes não é facilmente perceptível, porém evidência epidemiológica sugere que a doença vascular, pode ser a etiologia predominante. Vários estados fisiopatológicos e medicamentos podem contribuir para a diminuição do fluxo sanguíneo renal e levar a lesão por isquemia e reperfusão (I/R) (BONVENTRE; YANG, 2011; STEVENS; VISWANATHAN; WEINER, 2010).

2.2 Isquemia e Reperusão Renal

A lesão por (I/R) pode ser definida como toda alteração devida à privação e reestabelecimento 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 (THOMPSON *et al.*, 2007).

O rim é composto por uma população de diferentes células que funcionam em conjunto para executar um certo número de processos controlados e complexos. O processo de isquemia leva a mudanças moleculares na vasculatura e interstício do rim, e a reperusão dá origem a uma resposta inflamatória aguda. Juntos, esses eventos induzem o rim à uma lesão, resultando em uma alteração da filtração glomerular. A persistência dos eventos isquêmicos leva à uma gradual e permanente lesão renal e consequente doença crônica. Estudos em animais demonstraram que as consequências da isquemia/reperusão dependem da duração, sendo 20 a 35 minutos, o tempo máximo que o rim pode tolerar a isquemia. Em humanos, rins expostos a 1 hora de I/R durante um transplante renal, torna-os inviáveis. (THOMPSON *et al.*, 2007; SHARFUDDIN; MOLITORIS, 2011; REQUIÃO-MOURA *et al.*, 2015).

Durante a isquemia, a privação de oxigênio leva à depleção de ATP (trifosfato de adenosina) e do metabolismo energético. Para sustentar a viabilidade celular, os tecidos passam a utilizar a glicólise anaeróbica como fonte de energia. No entanto, o metabolismo anaeróbio não satisfaz a demanda de tecidos aeróbicos e, como consequência os níveis de ATP intracelular caem rapidamente. Isso resulta em alteração do transporte dos elétrons ao longo da cadeia respiratória e diminuição intracelular do pH. Após a oxigenação e durante a reperusão, espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidos por redução incompleta de oxigênio molecular nas mitocôndrias desacopladas. Nesse momento o sistema antioxidante, representado pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, é requisitado para efetuar a proteção das células contra radicais que, no entanto, tem uma taxa de formação maior que sua remoção. O dano oxidativo inclui danos ao DNA (hidroxilação da guanina) e a peroxidação lipídica é responsável por lesões nas células, tecidos e órgãos. (VOLKER, 2011; LIU *et al.*, 2011; GUELLEC *et al.*, 2018).

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 é 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 de ERO, que causa uma diminuição ainda maior do fluxo sanguíneo medular. O aumento na produção de ERO 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).

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).

A redução da função renal leva a retenção de solutos urêmicos, consequente inflamação, estresse oxidativo e resistência à insulina, promovendo a perda de massa muscular. A atrofia muscular está associada a doença cardiovascular, alterações metabólicas, redução da função física e equilíbrio que geram grande impacto na qualidade de vida e progressão da doença (HARADA *et al.*, 2017).

Diferentes mecanismos estão envolvidos nos principais processos lesionais aos rins consequentes a I/R, incluindo estresse oxidativo, inflamação e expressão de citocinas, morte celular, disfunção microvascular, ativação do sistema imune ou fibrose intersticial (SALVADORI; ROSSO; BERTONI, 2015; BELLOMO; AKELLUM; RONCO, 2012).

2.3 Papel do Estresse Oxidativo na Doença

O oxigênio é essencial à vida, porém pode participar do processo de destruição dos tecidos através da formação das espécies reativas. As espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como as de nitrogênio (ERN), conhecidas coletivamente como radicais livres, são produtos do metabolismo celular normal, ocorrem na mitocôndria,

membranas celulares e no citoplasma e têm um importante papel na defesa contra infecções. Entretanto um excesso na produção de espécies reativas associado à uma falha do sistema oxidante pode ser deletério e gerar doenças (VALKO *et al*, 2004; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

A teoria da existência dos radicais livres, estresse oxidativo e sua relação com as doenças começou a ser esclarecida quando Gerschman *et al.* (1954) observaram em seus experimentos que a intoxicação por oxigênio produzia efeitos letais, possivelmente, através da formação de radicais livres. A partir de então iniciou-se uma pesquisa intensa no campo dos radicais livres e sistemas biológicos. McCord e Fridovich (1969) produziram um importante trabalho sobre o papel do antioxidante enzimático, evidenciando a importância dos radicais livres nos sistemas vivos.

Desde então, estudos tem demonstrado que os sistemas vivos desenvolveram uma adaptação à convivência com os radicais livres e os utilizam em várias funções biológicas, tanto para proteção como para gerar doença (MITTAL; MURAD, 1977). Harman (1988), publicou uma importante revisão, onde abordou a relação do envelhecimento e os radicais livres. Neste documento o autor conjecturou que as doenças de "radicais livres" caracterizavam-se como principais causas de morte, sob a forma de câncer e aterosclerose, indicando a relação estresse oxidativo e doenças crônicas.

A produção de radicais livres pode ocorrer em todas as células aeróbicas durante a ativação máxima das células de defesas e no combate à processos infecciosos, no entanto, apresentam um potencial destruidor das membranas biológicas. O radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) em combinação com metais e outros radicais, transforma-se na ERO mais reativa. Pode causar alterações na estrutura do DNA e gerar inativação ou mutação, inativar enzimas e está relacionada à peroxidação lipídica. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser considerado um radical livre, é um metabólico do O_2 extremamente deletério, pois durante sua metabolização ocorre a formação do radical hidroxila, atravessa camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e proteínas ligadas ao ferro intracelular. Esse metal pesado mais abundante no corpo humano está fortemente relacionado com a catalisação das reações de oxidação (MATSUBARA, 1977; BARBOSA *et al.*, 2010).

Nos sistemas biológicos aeróbicos é fundamental a existência de um equilíbrio entre agentes oxidantes e sistema antioxidante. Esse sistema age protegendo a célula de duas formas: neutraliza os agentes antes que eles causem danos ou reparam a

lesão ocorrida. Existem três sistemas antioxidantes, enzima Superóxido dismutase (SOD) na sua duas formas: SOD-cobre-zinco, presente principalmente no citosol, e SOD-manganês, presente na mitocôndria, enzima catalase (CAT) e o terceiro constituído pela Glutathione em conjunto com duas enzimas, a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione redutase (GRd). Além dos antioxidantes, considerados de baixo peso molecular, como os carotenoides, a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico, porém, as mais importantes micromoléculas são o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) (CADENAS, 1997; BARBOSA *et al.*, 2010).

A glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico, previne dano a importantes componentes celulares causados por ERO. Considerado um marcador de dano celular, participa da detoxicação de agentes químicos e eliminação de produtos da lipoperoxidação. Após a exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação em Glutathione oxidada (GSSH) pela ação da GPx. A GRd recupera a oxidação sofrida pela GSH, às custas de NADPH, após exposição ao radical livre, essa etapa é essencial para manutenção do sistema de produção. As células íntegras mantêm uma razão GSH/GSSH alta. A diminuição dos níveis de GSH está associada com maior suscetibilidade à lesão renal decorrente de I/R renal e lesão oxidativa (TAK YEE; JONES, 1990; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A catalase (CAT) é encontrada em todos os órgãos, principalmente nos hepatócitos e eritrócitos, participa na redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 . A SOD protege o DNA e catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (VINCENT; INNE; VINCENT, 2007; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Várias situações podem levar ao processo de estresse oxidativo como sofrimento celular, toxicidade, inflamação, doenças crônicas. Em consequência a agressão sofrida pela célula, dá-se início a ação do sistema antioxidante com a limpeza do radical superóxido e formação de peróxido de hidrogênio tóxico por várias enzimas antioxidantes que têm significado prognóstico em vários tipos de doenças (KRATA *et al.*, 2018).

O termo redox refere-se ao equilíbrio entre oxidação e redução celular. O estado redox de uma célula é mantido dentro de um estreito equilíbrio, assim como, por exemplo, a manutenção do pH. Em condições patológicas esse delicado equilíbrio pode ser alterado. Os radicais livres e as espécies reativas operam a baixa, porém mensurável, concentração na célula. Suas concentrações são determinadas pelo

equilíbrio entre suas taxas de produção e remoção pela defesa antioxidante (VALKO *et al.*, 2007).

Na figura 01 está ilustrada os mecanismos celulares relacionado ao estresse oxidativo e o estado redox da célula.

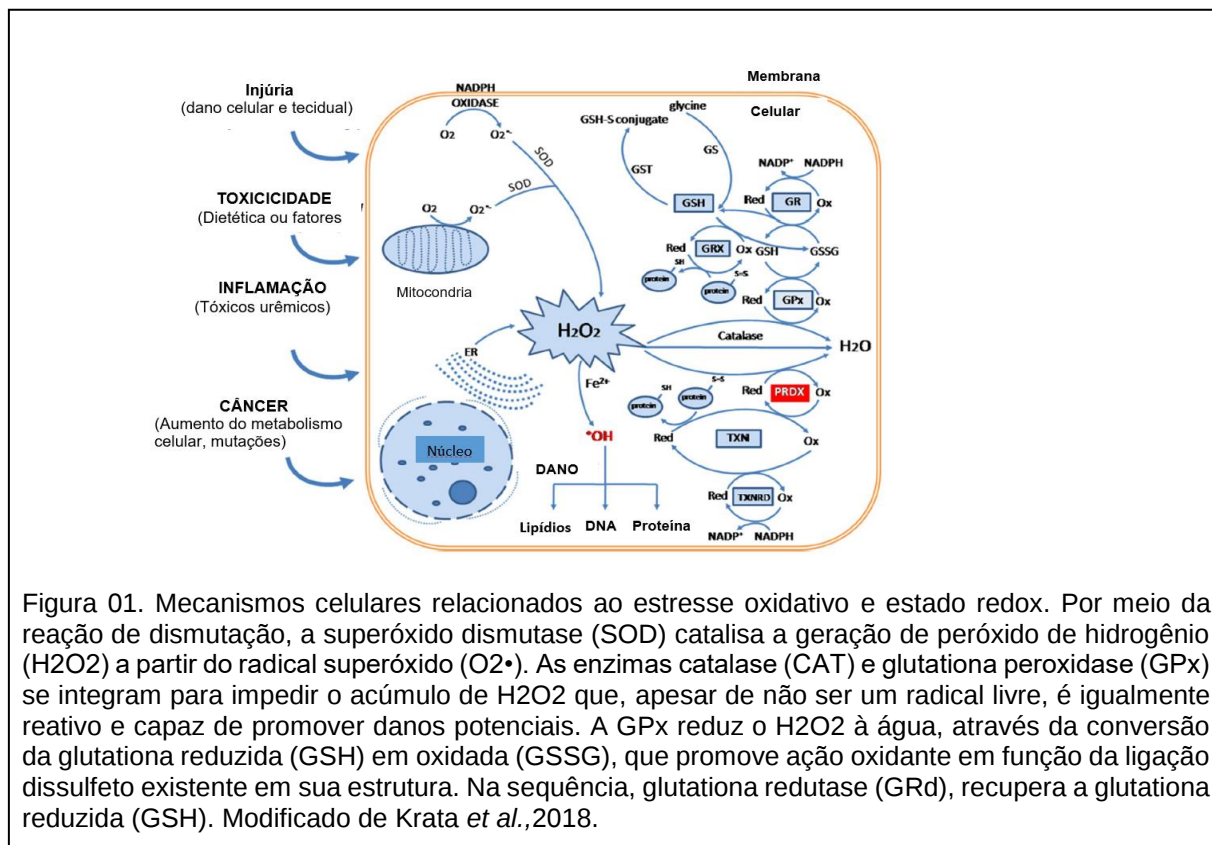


Figura 01. Mecanismos celulares relacionados ao estresse oxidativo e estado redox. Por meio da reação de dismutação, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$). As enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. A GPx reduz o H_2O_2 à água, através da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), que promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Na sequência, glutathione redutase (GRd), recupera a glutathione reduzida (GSH). Modificado de Krata *et al.*, 2018.

A capacidade antioxidante é dada principalmente pela GSH, considerada um tampão celular, indicador representativo do ambiente redox da célula. Em condições de estresse oxidativo aumentado, o conteúdo de GSSH aumenta e um grande número de proteínas envolvidas na sinalização, como receptores, proteínas quinases e alguns fatores de transcrição, podem ser alterados na sua função (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Quando as proteínas são oxidadas, servem de substrato para a digestão proteolítica e contribuem para manutenção do equilíbrio redox na célula. Após a exposição ao radical livre a proteólise pode aumentar em até 10x. O ciclo celular é caracterizado por flutuações no ambiente redox, mediado, principalmente, por alterações intracelulares na concentração de glutathione. A GSH desempenha um papel importante no resgate de células de apoptose pois, depleção de GSH, torna o ambiente celular mais oxidante e leva ao início da apoptose. Geralmente, um ambiente mais redutor (mantido por níveis elevados glutathione e tioredoxina) estimula

proliferação e uma ligeira mudança no ambiente para uma oxidação moderada inicia-se a diferenciação celular. Nesse sentido, é possível constatar que a apoptose é induzida por estímulos oxidantes moderados, a necrose é induzida por um efeito oxidante intenso. Assim o ambiente redox é um determinante crítico para o gatilho de morte celular (VOEHRINGER *et al.*, 2000; DROGE, 2002; EVENS, 2004).

Em situações de estresse oxidativo elevado, ocorre a oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos polinsaturados, mediada pelos radicais livres. Essa reação presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LIMA; ABDALLA, 2001).

Em resposta à LPO da membrana, e de acordo com circunstâncias metabólicas celulares específicas e capacidade de reparo, as células podem promover a sobrevivência celular ou induzir morte celular. Sob taxas de peroxidação lipídica fisiológica ou baixa (condições subtóxicas), as células estimulam sua manutenção e sobrevivência através de defesa antioxidante e contínua ativação de sistemas ou vias de sinalização que regulam proteínas antioxidantes, resultando em uma resposta adaptativa ao estresse. Entretanto, sob médias ou altas taxas de peroxidação lipídica (condições tóxicas) a extensão do dano oxidativo sobrecarrega a capacidade de reparo, e as células induzem apoptose ou necrose, processos esses que podem levar danos celulares e facilitar o desenvolvimento de vários estados patológicos e envelhecimento acelerado (GATÉ *et al.*, 1999).

2.2 Estresse Oxidativo na DRC

O estresse oxidativo (EO) desempenha um papel fundamental na progressão DRC, por lesão glomerular e isquemia renal e, indiretamente, com inflamação, hipertensão e lesão endotelial que leva a disfunção renal. Um crescente número de evidências demonstra que indivíduos com doença renal crônica apresentam um aumento do EO mesmo em estágios iniciais da doença, progride gradualmente com o agravamento do comprometimento renal com exacerbação pela hemodiálise. A DRC é acompanhada de oxidação pronunciada de proteínas, carboidratos e lipídios, levando a peroxidação lipídica e o acúmulo de produtos de glicação que causam

danos graves aos tecidos (STENVINKEL *et al.*, 1999; LOCATELLI *et al.*, 2003; LIAKOPOULOS *et al.*, 2017).

No rim, o EO pode causar mudanças drásticas, pois as moléculas oxidantes contribuem para a lesão renal progressiva, promovendo a isquemia, por incitar lesão glomerular, morte celular e apoptose e, finalmente, estimulando um processo inflamatório grave. Dessa forma, o EO é um preditor de mortalidade e morbidade nesses pacientes. Existem diferentes mecanismos que poderiam explicar a EO elevado em pacientes com DRC. Um dos mecanismos envolvidos seriam as características do indivíduo e sua carga de doença, idade avançada, diabetes e hipertensão arterial que predispõem a níveis crescentes de EO em comparação com a população em geral (CACHOFEIRO *et al.*, 2008; KRATA *et al.*, 2018).

Outra causa do EO em pacientes com DRC é a inflamação. Indivíduos com DRC apresentam um quadro de inflamação crônica caracterizado pela ativação de leucócitos polimorfonucleares e monócitos. Estas células inflamatórias aumentam a secreção NADPH oxidase e mieloperoxidases que aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio. Leucócitos de indivíduos com DRC produzem ânions superóxido, que inativam o óxido nítrico, reduzindo a capacidade de dilatação dos vasos sanguíneos, o que contribui para a hipertensão. A disfunção endotelial induzida por estresse oxidativo e alterações na permeabilidade vascular levam à entrada de colesterol na camada íntima das artérias e aumento dos níveis de oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), que estão envolvidos no processo de aterosclerose. Essas alterações levam à proteinúria, sinal de dano glomerular associado, que por sua vez, acarreta secreção de citocinas pró-inflamatórias, o que aumenta produção de espécies reativas de oxigênio, piorando a lesão renal (PRABHAKAR *et al.*, 2007; PUTRI; THAHA 2014).

Finalmente, em um estado de estresse oxidativo, a oxidação das membranas lipídicas dos eritrócitos diminui sua elasticidade encurtando seu tempo de vida e aumentando a probabilidade de hemólise. Isso pode explicar a causa da anemia em pacientes com DRC, além redução da síntese da eritropoietina (KARAMOUZIS *et al.*, 2008; LIGUORI *et al.*, 2018).

Geralmente, a alteração no estado redox sistêmico pode ser detectada em estágios iniciais de DRC e tende a aumentar junto com a progressão da doença renal, o que se traduz em lesão tecidual generalizada e contribui para comorbidades associadas. O aumento de mediadores do EO não é acompanhado por um aumento

da capacidade antioxidante do corpo, o que induz a um desequilíbrio no estado redox do paciente com DRC. Além disso, níveis aumentados de carbonilação de proteínas podem indicar ou mesmo contribuir para disfunção renal progressiva (KARAMOUZIS *et al.*, 2008; TUCKER; SCANLAN; DALBO, 2015; MIRANDA-DÍAZ *et al.*, 2016).

O dano oxidativo a proteínas leva a formação de carbonila, processo conhecido como carbonilação de proteínas, relatado na DRC. Esse processo é consequência da interação dos radicais livres com resíduos de aminoácidos, tais como lisina, arginina, prolina e treonina, considerado biomarcador mais geral e comumente utilizado a longo prazo para medir o estresse carbonílico. Miyata *et al.* (1999) notaram que a carbonilação de proteínas poderia ser o resultado de complicações da uremia a longo prazo. No entanto, a relação precisa entre o estresse oxidativo e a carbonilação de proteínas ainda não estão claros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNER, 2001).

2.4 Disfunção muscular na DRC

A DRC cursa com fraqueza muscular, perda de massa muscular, resistência limitada, intolerância ao exercício e fadiga, anormalidades morfológicas e funcionais, denominadas coletivamente de Miopatia Urêmica. Sabe-se que as alterações musculares acontecem primariamente na DRC (CAMPISTOL, 2002).

Os mecanismos relacionados ao estado urêmico estão envolvidos na perda de massa muscular, como aumento da degradação de proteínas, diminuição da síntese proteica e comprometimento das células progenitoras musculares (BAILEY, 2006).

Um importante desencadeador da perda de massa muscular na DRC é a deficiência/resistência do hormônio do crescimento (GH) e diminuição na sinalização do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1). Essas alterações levam à aumento da proteólise mediada pela caspase 3 e consequente ativação do sistema ubiquitina-proteossoma (SUP), inibição da fosforilação da proteína quinase B (AKt), relacionada à diversas vias de sinalização no controle do metabolismo, proliferação e crescimento muscular (LECKER, 2006; WIEZEL *et al.*, 2014; NADER, 2005; PICKERING *et al.*, 2002; WORKENEH *et al.*, 2006)

Além disso, o estresse oxidativo presente na DRC é um importante regulador das vias que modulam a atrofia muscular. Os primeiros indícios ligando estresse oxidativo ao processo de atrofia muscular apareceram na literatura a mais de duas

década, associando essa disfunção muscular e aumento de biomarcadores de estresse oxidativo, por exemplo lipoperoxidação lipídica (BARAZZONI *et al.*, 2012; POWERS; KAVAZIS; MCCLUNG, 2018).

A capacidade de promover o crescimento dos músculos é um processo altamente regulado. Músculos maduros são formados por fibras musculares que são circundadas por uma lâmina basal, que abrange não apenas miofibrilas, mas também células satélites (também conhecidas como células precursoras de músculos). Essas células são geralmente quiescentes, mas em resposta a lesões musculares ou alterações nos níveis de fatores de crescimento (por exemplo, IGF-1), começam a expressar os fatores reguladores miogênicos Myf-5 e proteína de determinação de mioblastos 1 (MyoD). A expressão desses fatores é seguida por proliferação e diferenciação das células satélites, resultando em mioblastos e, posteriormente, miócitos. Estes passam por fusão e posterior diferenciação para formar miofibrilas e podem, portanto, reparar ou ampliar miofibrilas (Zhang *et al.*, 2010; GREFFE *et al.*, 2007).

Há evidências que na DRC a função das células satélites está prejudicada pela diminuição do IGF1 em realizar síntese e degradação de proteína muscular e diminuição de MyoD, interruptor das células satélites. O IGF1 está envolvido em muitos processos de desenvolvimento, incluindo proliferação celular, diferenciação e regeneração, na DRC sua sinalização está prejudicada, provavelmente devido a inflamação e aumento das citocinas pró-inflamatórias que também são reguladas pelo IGF1. Dessa forma, inflamação, altos níveis de angiotensina II ou Interleucina 6 (IL6), podem desempenhar um papel na supressão das células satélites via diminuição da sinalização de IGF1. (ZHANG *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2004; KIEPE *et al.*, 2005; BARBIERI *et al.*, 2002).

Outro fator que contribui para perda de massa muscular é supressão da síntese de proteínas. Proteínas celulares no citosol, núcleo e organelas são continuamente degradados e substituídos pela síntese de proteínas. As taxas desses processos diferem amplamente, enzimas têm meias-vidas de minutos, algumas proteínas duram dias e proteínas estruturais são ainda mais estáveis. A taxa média de *turnover* de proteína também varia entre tecidos, células hepáticas humanas são substituídas a cada poucos dias, enquanto a substituição de proteínas nos músculos ou no cérebro ocorre durante semanas. Esta variabilidade considerável na rotatividade de proteínas

significa que o maquinário proteolítico deve ser altamente seletiva e firmemente regulado (MITCH; GOLDBERG, 1996).

Adey *et al* (2000) observaram síntese muscular defeituosa na DRC. Os pesquisadores mediram taxas sintéticas de proteínas musculares mistas, cadeia pesada de miosina e proteínas mitocondriais em amostras de biópsias musculares em série durante uma infusão contínua de leucina em 12 pacientes com insuficiência renal crônica e 10 controles saudáveis. Os autores observaram que pacientes com insuficiência renal crônica têm níveis significativamente reduzidos de síntese de várias proteínas musculares, indicando ser esta a provável base bioquímica da fraqueza muscular e atrofia visto nos indivíduos com DRC.

Outro fator importante a ser considerado é a acidose metabólica. Bailey, Ding e Mitch (1996) observaram que o desenvolvimento de acidose metabólica em ratos com DRC causa perda de estoques de proteína muscular, estimulando principalmente a degradação de proteínas mais do que inibindo sua síntese. Quando a acidose causada pela DRC foi corrigida, a degradação das proteínas musculares diminuiu, sugerindo que o principal efeito da acidificação no *turnover* de proteína muscular é estimulação da degradação de proteínas. Em estudos de músculo cultivado células e músculos isolados, acidose metabólica aumentada a expressão de mRNA de ubiquitina e subunidades do proteassoma, indicando ativação da proteólise (MITCH; BAILEY; GOLDBERG, 1994).

2.5 Mecanismos de Perda de Massa Muscular

A diminuição de massa muscular em pacientes com DRC tem impacto negativo na qualidade de vida e supressão da expectativa de vida. Vários mecanismos podem induzir a proteólise muscular nesses indivíduos. Muitos sistemas proteolíticos contribuem para a degradação de proteínas musculares. As proteases mais importantes no músculo estriado esquelético são as proteases ativadas pelo Ca^{2+} (ou calpaínas), caspase-3 e o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) (POWERS; KAVASIS; DeROUISSEAU, 2005).

As calpaínas (I e II) são proteases dependente de Ca^{2+} , ativadas no músculo durante o desuso ou doenças. A função das calpaínas é liberar as proteínas sarcoméricas pela clivagem de proteínas do citoesqueleto (titina e nebulina), responsáveis pela ancoragem dos elementos contrateis. A atividade das calpaínas é

regulada por muitos fatores, incluindo cálcio citosólico e concentração de calpastatina, um inibidor endógeno de calpaínas. Dessa forma, qualquer fator capaz de aumentar a concentração de cálcio citosólico e/ou diminuir níveis de calpastatina pode aumentar a atividade das calpaínas. A ERO pode interferir na concentração do cálcio, pois os produtos da lipoperoxidação podem reduzir a atividade da Ca^{2+} -ATPase, levando ao seu acúmulo e consequentemente ativando vias proteolíticas dependente de cálcio. A ativação do sistema de calpaínas no músculo estriado esquelético encontra-se resumida na figura 3 (GOLL *et al.*, 2003; PURINTRAPIBAN; WANG; FORSBERG, 2003; KOURIE, 1998; SIEMS *et al.*, 2003).

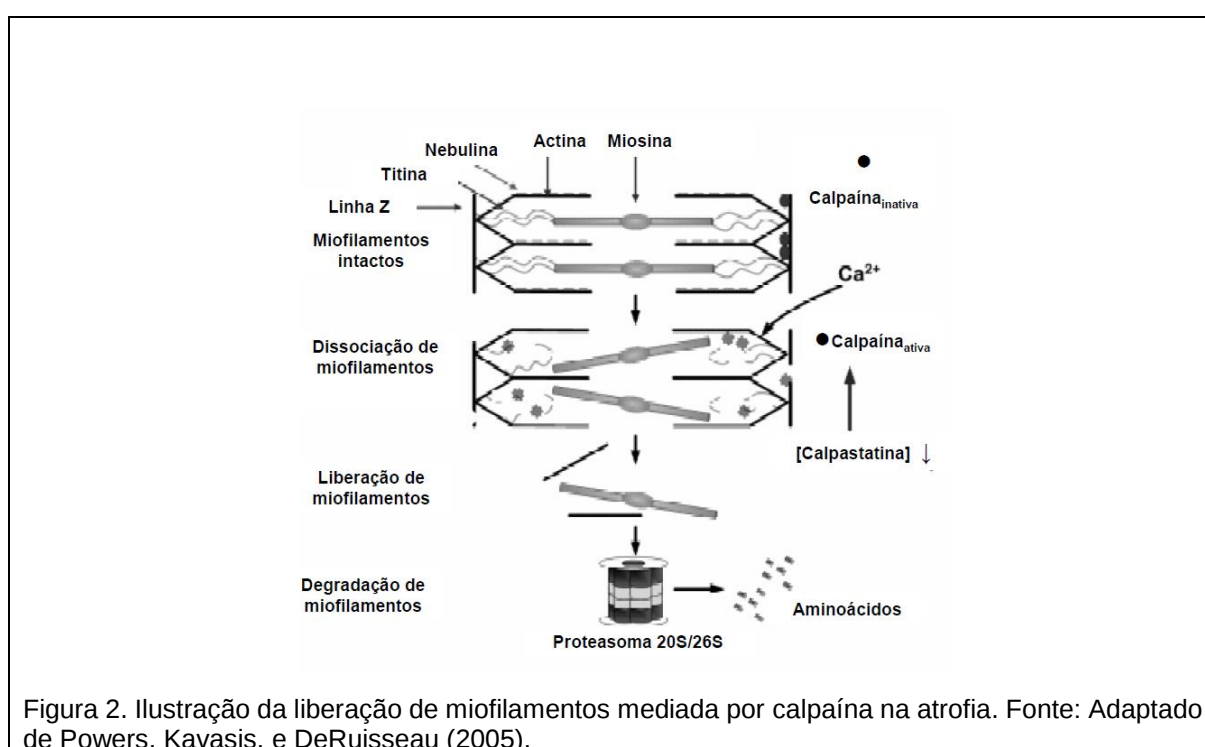
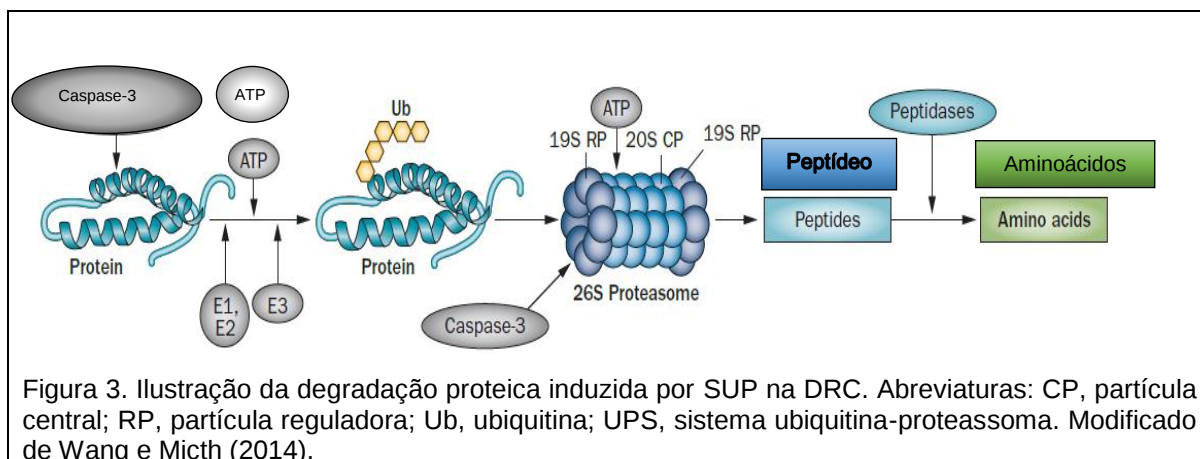


Figura 2. Ilustração da liberação de miofilamentos mediada por calpaína na atrofia. Fonte: Adaptado de Powers, Kavalis, e DeRuisseau (2005).

Harwood *et al* (2003) observaram em seu estudo aumento da atividade da calpaína e caspase 3 no músculo cardíaco de ratos urêmicos. Os autores sugerem que a uremia é a principal causa de estímulo dessa via de proteólise.

Outro importante mecanismo que degrada proteínas no músculo (e em outros tecidos) é o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP). A atividade deste sistema é regulada em várias etapas que estão ilustradas na figura 2 (LECKER; GOLDBERG; MITCH, 2006).

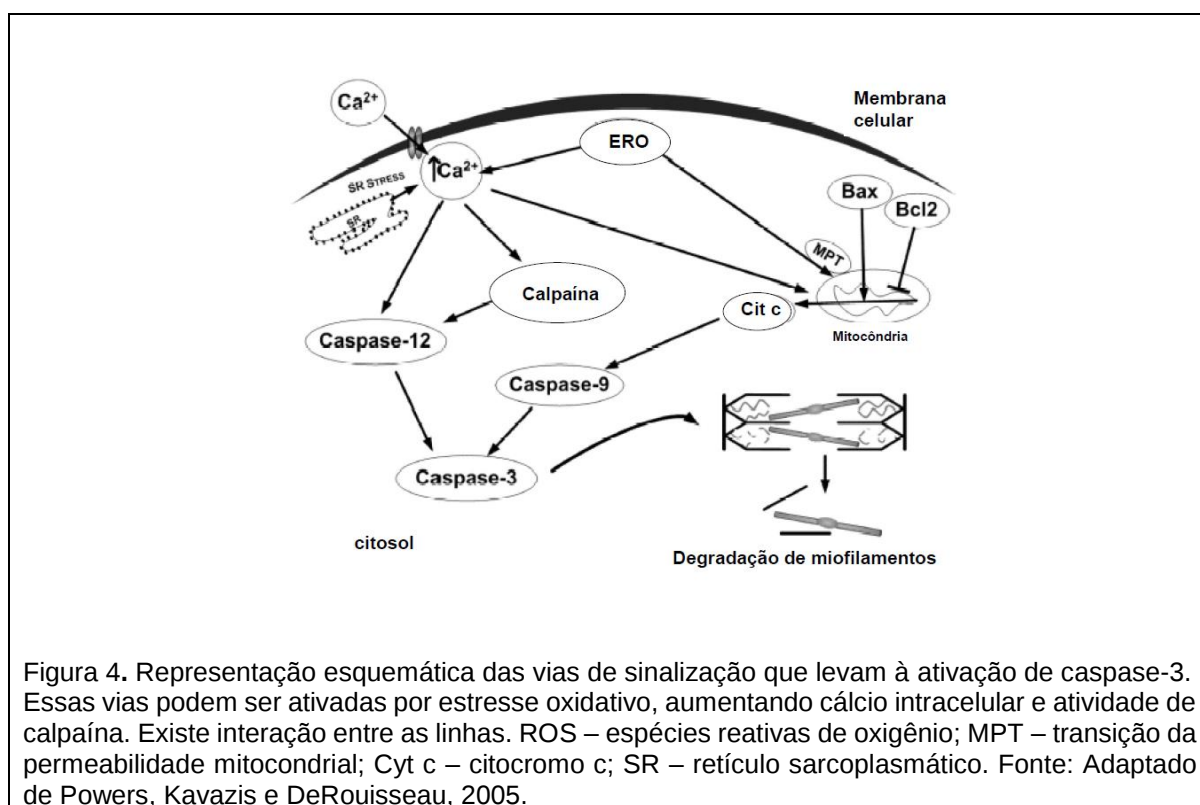


Quando uma proteína é destinada à degradação primeiro é marcada pela adição de ubiquitina, um pequeno membro da família de proteínas de choque térmico. Esta reação requer ATP e inicia-se por uma enzima de ativação da ubiquitina E1, seguida de interação com aproximadamente 20 proteases portadoras da ubiquitina E2 que podem interagir com uma enzima ubiquitina-ligase E3. Na presença de ATP, a ubiquitina ativada é transferida para uma lisina da proteína ou para lisinas que estão contidas na ubiquitina. O processo é repetido até que uma cadeia de cinco proteínas ubiquitinas forme um complexo que é reconhecido pelo proteassoma 26S e a proteína marcada é subsequentemente degradada (WANG; MICTH, 2014).

A degradação de uma proteína marcada ocorre no proteassoma 26S, um complexo consistindo por mais de 60 subunidades proteicas. O complexo é composto de um núcleo em forma de barril de 20S e partículas reguladoras 19S em uma ou ambas as extremidades do proteassoma 20S. Notavelmente, as partículas 19S consistem em muitas subunidades, que reconhecem as cadeias de poliubiquitinas que estão ligadas às proteínas. Usando o ATP, as partículas 19S clivam a cadeia de poliubiquitina da proteína substrato para liberar a ubiquitina, que pode ser reciclada para marcar outras proteínas do substrato. As partículas 19S usam o ATP para desdobrar proteínas, de modo que a proteína pode ser “injetada” na partícula 20S, onde é convertida em peptídeos, que são liberados no citoplasma e degradados pelas peptidases citoplasmáticas (SARIC; GRAEF; GOLDBERG, 2004; GROLL *et al.*, 2000).

Outra via relaciona a atrofia muscular é a ativação de um grupo de proteases denominado de capases que degradam proteínas e podem provocar morte programada das células. A caspase-3 e SUP trabalham em conjunto para estimular a perda de massa muscular em condições catabólicas (como a DRC) e atua para clivar a estrutura complexa das proteínas musculares. A estimulação da atividade

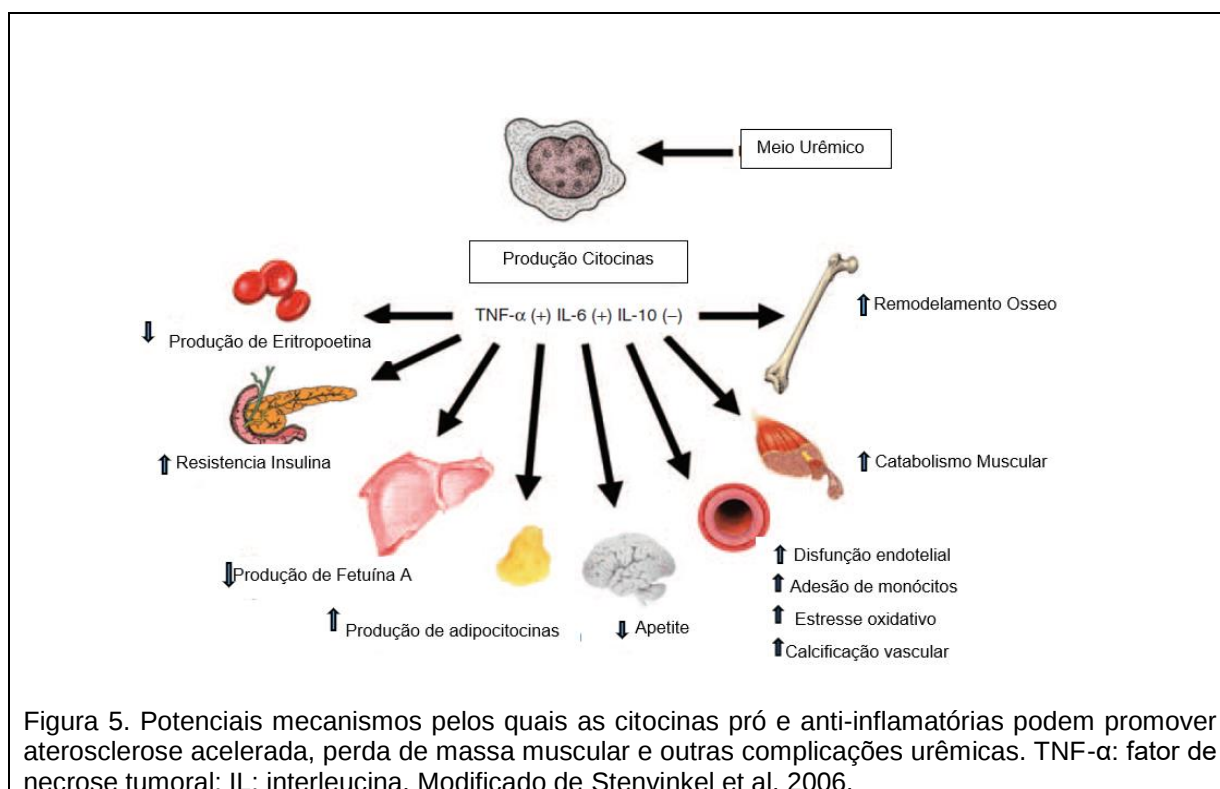
proteolítica da caspase-3 deixa um marcador de proteólise na fração insolúvel do tecido muscular, que acelera a degradação da actina. Além disso a atividade da caspase-3 pode estimular a degradação proteica mediada pela SUP no músculo estimulando diretamente a atividade proteolítica do proteassoma. O mecanismo bioquímico envolve a clivagem de proteínas subunitárias específicas da partícula 19S, que estão localizadas perto da abertura do canal central do proteassoma 20S e a sua clivagem pode, portanto, aumentar a quantidade de proteínas desdobradas a ser inserida no canal do proteassoma 20S (o local da proteólise). A chave da interação entre as vias de ativação da caspase-3 é que ambos os caminhos podem ser ativados por ERO (figura 4) (WANG *et al.*, 2010;(POWERS; KAVASIS; DERUISSEAU, 2005).



Outro fator que contribui para alteração muscular na DRC é a inflamação crônica consequente a uremia com estimulação dos fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, associados a alterações do metabolismo do cálcio e potássio. Os rins desempenham importante papel na depuração de citocinas pró-inflamatórias. Estudos em ratos indicam que esse órgão é o principal local de degradação de interleucinas. Níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, TNF α , amiloide sérica A e proteína C estão aumentados na DRC. A IL-6 desempenha papel central na

fisiopatologia dos efeitos adversos da inflamação na DRC e associado ao consequente estresse oxidativo aumentado causam atrofia muscular (WANG; MITCH, 2014; CHEUNG *et al.*, 2010).

Os potenciais mecanismos pelos quais as citocinas pró e anti-inflamatórias podem promover aterosclerose acelerada, perda de massa muscular e outras complicações urêmicas estão demonstrados na figura 5.



Esses mecanismos estimulam os sistemas proteolíticos envolvidos na degradação de proteínas como as proteases ativadas por cálcio (calpaínas e caspases) e SUP (PURINTRAPIBAN; WANG; FORSBERG, 2003; POWERS; SMUDERA; JUDGE, 2012).

Alguns estudos, baseados no esclarecimento dos distúrbios bioquímicos que causam perda de massa muscular, sugeriram métodos potenciais para prevenir ou suprimir as perdas de proteína muscular na DRC. Um candidato óbvio é corrigir a acidose metabólica. Estratégias terapêuticas que contribuem para diminuir a perda de massa muscular na DRC incluem terapia hormonal, otimização na ingestão de nutrientes e exercício físico (CHEN *et al.*, 2008; JOHANSEN; PAINTER, 2012).

O treinamento físico aeróbio é uma das modalidades terapêuticas que tem recebido muita atenção pois reduz sintomas da uremia, inflamação, marcadores do estresse oxidativo, com melhora da função muscular esquelética, capacidade de exercício e qualidade de vida dos indivíduos (HEIWE; JACOSON, 2011).

2.6 DRC e Exercício Físico

O declínio da capacidade física é observado não apenas em indivíduos com DRC que necessitam de diálise, mas também em fases anteriores da doença, estágios 3-4. Os indivíduos com DRC geralmente desenvolvem um estilo de vida sedentário, geralmente nos estágios iniciais da doença, levando a diminuição da capacidade física concomitante com o declínio da TFG, com impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo (HIRAKI *et al.*, 2017).

A prática de atividade física está relacionada à melhora da capacidade funcional, melhor controle da hipertensão arterial e diminuição do risco relativo de morte. A DRC, condição crônica, ainda é largamente ignorada como alvo potencial para terapia através do exercício físico, sendo que a oferta de programas de reabilitação e conselhos sobre exercícios ficam muito aquém dos serviços de reabilitação pulmonar e cardíaco. No entanto, já existe consenso que a prática de atividade física reduz a morbimortalidade na DRC (HENRIQUE *et al.*, 2009).

A atividade física e o exercício têm um papel fundamental na prevenção e tratamento de várias condições médicas e doenças crônicas. Considerando os avanços no tratamento da DRC, os indivíduos necessitam de mudanças na alimentação e prática de atividade física regular. Essas mudanças contribuem para melhora no perfil glicêmico, pressão arterial, obesidade (BASTOS, KIRSZTAJN, 2011).

Entretanto, 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. 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. Hellberg *et al.* (2018) realizaram um programa

de treinamento físico variado com indivíduos que se enquadravam nos estágios 3-4 da DRC, ou aqueles com algum risco de desenvolver, por 4 meses, com acúmulo de 150 minutos de atividade física por semana, e observaram uma melhora considerável na capacidade física. No estudo de Watson *et al.* (2015), 38 indivíduos com DRC (estágios 3-4) realizaram 8 semanas de exercício resistido progressivo, observaram hipertrofia muscular, aumento da força muscular e melhora da capacidade de exercício. Entretanto, os autores discutem a baixa adesão dos indivíduos para participar das atividades programadas e consideram esse fator uma barreira para a adoção da atividade física no cotidiano dos pacientes.

Além dos efeitos na capacidade física, força muscular, há muito interesse nos efeitos do exercício aeróbico e de resistência (força) sobre variáveis que avaliem o efeito bioquímico do exercício na DRC. O exercício aeróbico e treinamento de resistência exercem influência benéfica sobre citocinas inflamatórias, resistência à insulina, obesidade, doenças cardiovasculares, porém ainda não é claro se indivíduos com DRC podem se beneficiar desses efeitos (MOINUDDIN; LEEHEY, 2008).

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. Os autores analisaram tamanho e força muscular, PCR (proteína C-reativa) e IL-6 antes e após a intervenção e observaram uma diminuição desses níveis, além da hipertrofia muscular e aumento da força.

Outro debate importante que envolve treinamento físico para doentes renais, é seu efeito sobre estresse oxidativo. Sabe-se que na DRC predomina um ambiente oxidativo em virtude da redução do sistema antioxidante e aumento do estímulo pro-oxidante causados pelos tóxicos urêmicos, angiotensina 2, citocinas inflamatórias, infecções crônicas e desordens metabólicas (ISHIKAWA *et al.*, 2012). Essa característica da DRC exige estudos para dosificar adequadamente o exercício físico nessa população, a fim de proporcionar manutenção da saúde

Nas últimas décadas, estudos tem demonstrado que o exercício físico aumenta a produção de radicais livres. A atividade aeróbia e anaeróbia pode aumentar, respectivamente 20 a 50 vezes o consumo energético do tecido muscular, transformando a musculatura exercitada uma fonte geradora em potencial de radicais livres. No entanto, diferentes protocolos de treinamento físico afetaram positivamente a relação exercício físico e produção de radicais livres, com incremento na capacidade física, pressão arterial, função cardiovascular, metabolismo dos lipídios e glicose,

estado oxidativo (AMORIM, TIRAPEGUI, 2008; ANDRADE, MARREIRO, 2011; COELHO et al., 2010).

Outro fator importante é o efeito do exercício sobre a ativação das células satélites e inflamação. O músculo esquelético é composto por um longo multinucleado cilindro de fibras que percorrem o comprimento de um tecido longitudinalmente e são agrupados em feixes, referidos como fascículos. As miofibras são compostas de numerosas miofibrilas organizadas em séries, que por sua vez são compostas de sarcômeros, a unidade contrátil do tecido muscular necessária para a locomoção. Fibras musculares são altamente especializados, com capacidades metabólicas específicas para atender demandas contráteis distintas. No entanto, o músculo esquelético também é altamente plástico, exibindo notável capacidade de aumentar de tamanho após estímulos de hipertrofia ou reparar miofibras danificadas. Isto é proporcionado pela população de células satélites que fornecem novos mionúcleos para a regeneração ou miotubos em expansão (ZAMMIT, 2017; O'SULLIVAN; SMITH; WATSON, 2018).

As células satélites podem sair do estado quiescente com estímulos do exercício físico. Está bem documentado a contribuição das células satélites para hipertrofia após treinamento de resistência (KUROSAKA *et al.*, 2012; PETRELLA *et al.*, 2006). Entretanto, Joannis *et al.* (2015) mostraram que um estímulo não hipertrófico como o treinamento aeróbico pode levar à ativação das células satélites e remodelamento muscular.

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 proteinúria 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 no estágio final da DRC. No entanto essas alterações não aparecem para piorar uma alteração 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, benefício que pode ser traduzido em melhor qualidade de vida para o doente renal (IKIZLER, 2004).

Rhee *et al.* (2017) realizaram 6 meses de treinamento aeróbico e anaeróbico combinado durante a diálise e observaram melhora no estado de saúde física, na hipotensão intradialítica e em termos de saúde mental, na depressão. Segundo os autores, esse resultado deve encorajar profissionais de saúde especialistas a prescrever treinamento físico.

Apesar da intensa pesquisa sobre o efeito do exercício físico, seja na modalidade aeróbio, resistência ou a combinação de ambos, ainda existe divergências sobre seu verdadeiro impacto na saúde do indivíduo com DRC. Portanto é fundamental esclarecer os benefícios de treinamento físico na DRC, de forma que essa modalidade terapêutica possa ser instituída como parte indissociável do tratamento clínico, assim como nas doenças cardiovasculares e respiratórias.

3 OBJETIVO GERAL

Analisar efeito do treinamento aeróbio de alta intensidade sobre parâmetros de estresse oxidativo no tecido muscular e morfometria muscular em um modelo de doença renal.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da aplicação de um protocolo de TAAI, modalidade natação em um modelo de DR nos seguintes parâmetros:

- Avaliar efeito do TAAI, modalidade natação, em modelo animal de doença renal;
- Analisar efeito do exercício físico sobre níveis de creatinina sérica;
- Avaliar níveis de peroxidação lipídica;
- Avaliar níveis de proteínas carboniladas;
- Analisar os níveis Glutationa Reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG);
- Mensurar área de secção transversa das fibras musculares do músculo gastrocnêmio;

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 nº735/2015 (ANEXO A). A pesquisa foi realizada nas dependências do UFMS e no laboratório de patologia experimental da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

4.2 Amostra

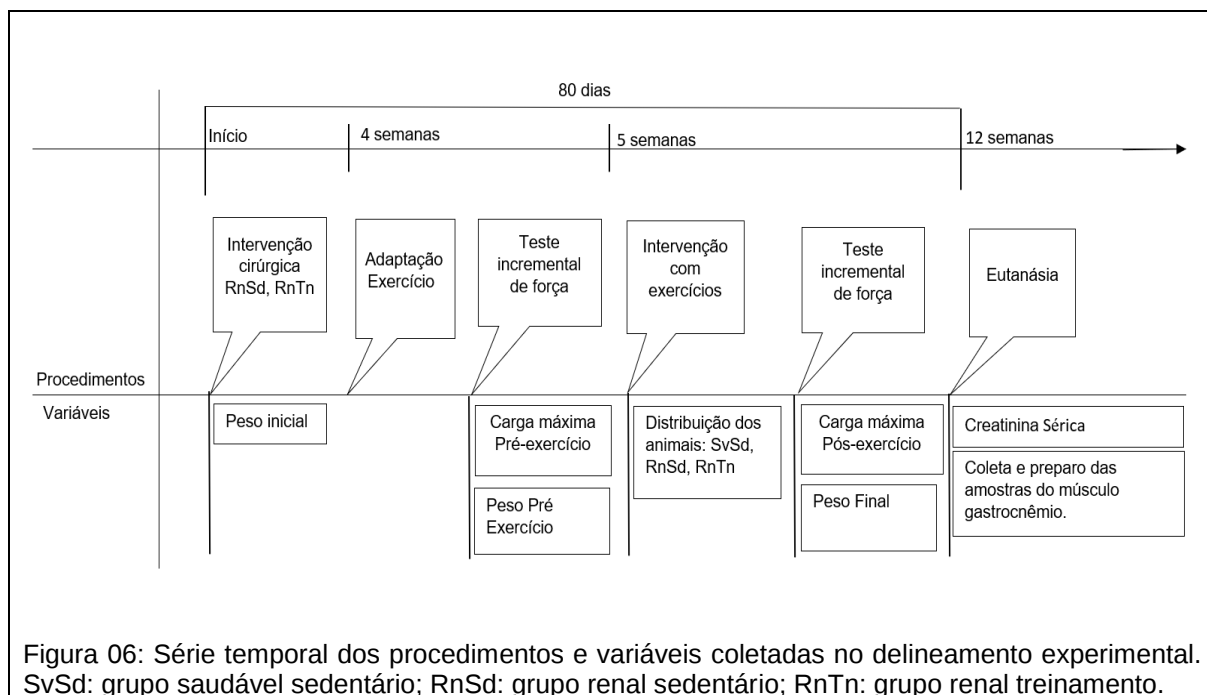
Utilizou-se na pesquisa 21 *ratos Wistar*, linhagem *albina*, espécie *Rattus norvegicus*, com 53 dias de vida e peso aproximado de 200 -250g, procedentes do criadouro da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, forradas com maravalha, na quantidade de 4 a 5 animais por caixa. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura, aproximadamente 22°C e submetidos a controle de luz, 12 por 12h. Havia livre acesso à água e ração comercial.

4.3 Delineamento Experimental

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

- Cirurgia de Isquemia e Reperusão renal para indução da DR;
- Adaptação dos animais ao exercício físico;
- Teste incremental para determinar carga de treinamento;
- Treinamento aeróbio de alta intensidade;
- Eutanásia;

A figura 06 apresenta série temporal dos procedimentos e variáveis coletadas no delineamento experimental.



4.3.1 Distribuição dos Grupos

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de acordo com as intervenções: Grupo saudável sedentário (SvSd), Grupo renal sedentário (RnSd), Grupo Renal treinamento. A distribuição dos grupos, intervenções realizadas estão descritas na tabela 01.

Tabela 01. Distribuição de grupos, intervenção, intensidade do treinamento físico e número de animais.

Grupo Experimental	Intervenção	Intensidade Treinamento Físico	Nr. animais
SvSd	Nenhuma	Nenhuma	7
RnSd	Intervenção cirúrgica	Nenhuma	7
RnTn	Intervenção cirúrgica Teste Incremental Treinamento Aeróbico	Intenso: 85%	7
Total de animais			21

Grupo saudável sedentário (SvSd): permaneceu sem intervenção; Grupo renal sedentário (RnSd): recebeu intervenção cirúrgica; Grupo Renal treinamento: recebeu intervenção cirúrgica, teste incremental realizado para determinar a intensidade do TAAI e treinamento aeróbico de alta intensidade. Todos os animais receberam cuidados diários de higiene, alimentação e água.

4.4 Procedimentos da Pesquisa

Os grupos RnSd, RnTn foram submetidos a intervenção cirúrgica de acordo com o modelo de doença renal preconizado por Bazzano et al.

4.4.1 Cirurgia: Isquemia e Reperfusão Renal

O protocolo de cirurgia para indução da lesão I/R renal foi realizado sob técnica asséptica e seguiu o modelo estabelecido por Bazzano et al.(2015). Os animais foram anestesiados com Ketamina a 10%, 50 a 100mg/kg, associado à xilazina 1 a 5mg/Kg, intraperitoneal. Após anestesia os animais foram submetidos à laparotomia do flanco esquerdo, para localização do rim esquerdo, o mesmo foi exteriorizado para afastamento da gordura perineal e isolamento do pedículo para clampeamento da artéria e veia renal com pinças não traumáticas. O clampeamento foi mantido por 10 minutos cronometrados e isquemia verificada visualmente pela mudança de cor do órgão. Transcorrido o tempo procedeu-se a reperfusão do rim, também confirmada visualmente pelo retorno da coloração inicial do órgão. Após a verificação da hemostasia, o rim foi realocado e em seguida feito o fechamento por planos com fio de mononylon 4-0. No pós-operatório imediato administrou-se uma dose de Flunixin meglumine, 2,5mg/Kg subcutâneo.

Os animais permaneceram em observação até a recuperação da anestesia, quando voltaram a apresentar comportamento normal em relação à locomoção e alimentação. Diariamente foram monitorados para o acompanhamento da ferida cirúrgica e cuidados gerais. Quando completaram 21 dias de pós-operatório foram então preparados para iniciar o protocolo de exercício físico.

4.4.2 Protocolo de Exercício Físico

Após um período de 21 dias de pós-operatório, os animais do grupo treinamento iniciaram a adaptação ao treinamento aeróbio, modalidade natação, por período de 7 dias, nos quais realizaram a atividade de maneira gradativa, sem carga de trabalho até completar 30 minutos de natação. Finalizada adaptação, o grupo RnTn iniciou protocolo de TAAI.

Para determinação da carga máxima de treinamento os animais foram submetidos à teste incremental de esforço, segundo o protocolo de Cunha e colaboradores(CUNHA *et al.*, 2009). Neste teste, os ratos foram colocados para nadar com carga inicial correspondente à 1% da massa corporal (MC) de cada animal, utilizando-se peças de chumbos de tamanho e peso variado que agrupados adequadamente produziam o peso estabelecido para o exercício. Os pesos foram afixados na parte distal da cauda dos animais com fita adesiva hipoalergênica. A cada 3 minutos de natação os animais eram retirados da água para descanso de 1 minuto e incremento de 1% da MC na carga do exercício. Esse ciclo se repetiu até alcançarem a exaustão

Para caracterizar protocolo de TAAI considerou-se carga de treinamento 85% da carga máxima alcançada no teste incremental, valor que correspondeu 4,5% da MC de cada animal. Semanalmente realizou-se a pesagem dos animais e o valor da carga máxima era corrigido de acordo com a MC do animal. Os pesos e modos de fixação foram os mesmos utilizados no protocolo de teste incremental. O TAAI foi realizado 5 vezes por semana, durante 6 semanas, com duração média 30 minutos cada sessão. Ao final do protocolo o teste incremental foi realizado novamente nos mesmos moldes do inicial. O SvSd e RnSd permaneceram sedentários, sob cuidados diários, até o final do período de treinamento de RnTn, quando procedeu-se eutanásia. A figura 07 apresenta a forma de treinamento aeróbio.



Figura 07. Animais durante a prática de natação.

4.4.3 Eutanásia

Após 6 semanas de treinamento os animais sofreram a eutanásia. Os animais foram submetidos a Dose letal de substâncias anestésicas utilizando associação de ketamina e xilazina, 100mg/Kg, intraperitoneal. Após o processo anestésico foi realizado laparotomia e exsanguinação por punção através da veia porta hepática.

4.5 Coleta e Preparação das Amostras

Após eutanásia dos animais, foram coletadas porções do músculo gastrocnêmio e coleta de sangue realizada no momento da eutanásia.

Para análise histológica, o músculo foi fixado com o fixador *Carnoy* de metanol por 1 h e conservado em álcool absoluto. Para análise do estresse oxidativo, as amostras musculares foram colocadas em criotubos e armazenados à -80°C.

4.6 Análise Bioquímica

Para análise da creatinina sérica, as amostras foram centrifugadas à 3000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA) para separação do soro, que foi mantido sob refrigeração (2 °C a 8 °C) até o momento da análise, através do método enzimático UV.

4.7 Determinação do estresse oxidativo

Para determinação do estresse oxidativo muscular foram utilizadas as seguintes técnicas: Quimiluminescência Estimulada por *tert*-butil hidroperóxido (FLECHA, BG; LLESUY, ;BOVERIS, 1991), quantificação de proteínas carboniladas (ABRAHAM Z.REZNICK, 1994), Glutathione Total e Oxidada (TIETZE F, 1969).

4.7.1 Quimiluminescência estimulada por *tert*-butil hidroperóxido - QL

O composto *tert*-butil hidroperóxido é um potente formador de radicais peroxil que ataca os lipídios de membrana gerando lipoperóxidos que podem reagir com outros lipídios, oxidando-os. Dessa forma, o *tert*-butil inicia uma reação de

lipoperoxidação que pode ser detectada através da emissão de fótons ocorrida durante a formação dos lipoperóxidos.

Os homogenatos foram preparados na proporção de 20mg de tecido/mL de tampão KH_2PO_4 10mM, pH 7.4 em NaCl 0,9%. As amostras (875 μL) foram incubadas com 105 μL de tampão fosfato de potássio monobásico a 30°C por 5 minutos ao abrigo da luz. A reação foi iniciada pela adição de 20 μL de t-butil (concentração final de 6 mM), preparado no momento do uso e ao abrigo da luz. Nos tubos de luminescência foi adicionado 100 μL de homogenato muscular e 890 μL de tampão fosfato mantidos em 37°C por 5 minutos. Após esse período foi adicionado 10 μL da solução de tert-butil no tubo. A reação de quimiluminescência iniciada foi avaliada usando um luminômetro TD 20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA, EUA), com um intervalo de resposta de 300 a 650 nm. Os tubos foram mantidos no escuro até a leitura e o ensaio foi realizado em uma sala com temperatura ambiente de 33 ° C. Para cada animal, uma curva de 40 minutos foi obtida por interpolação, onde cada ponto representava suavização diferencial de 12.000 leituras. A área sob a quimiluminescência da curva foi extraída por cálculo integral, para cada animal. Os resultados foram expressos em unidade relativa de luz por miligrama de tecido (URL/mg de tecido).

4.7.2 Quantificação de Proteínas Carboniladas -PC

Para quantificação de PC, cerca de 200 mg do gastrocnêmio foram colocados em 4 mL de KH_2PO_4 50 mM, 1mM EDTA, pH 7.4. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos, em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente para remoção de *debris*, e 1 mL de amostras foi removido e colocado em tubos separados. Cerca de 4 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) diluída em HCl 2,5 M foi adicionada a cada tubo e deixado em incubação por 1 hora em banho de gelo, agitados a cada 15 minutos. As amostras foram lavadas com uma solução de 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v), e centrifugados por 10 minutos para coleta dos precipitados de proteína. Uma outra lavagem com uma solução de TCA 10% foi feita e os pellets foram colhidos e quebrados mecanicamente na durante 3 lavagens com 4 mL de etanol etilacetato 1:1 (v/v) com o objetivo de remover DNFH livre e contaminação com lipídios. Os precipitados finais foram dissolvidos com 2 mL de solução de hidrocloreto de Guanidina 6M e qualquer material insolúvel foi removido por meio de uma

centrifugação adicional. O conteúdo de grupos carbonil foi calculado por meio da obtenção do pico de absorbância em um espectro de 355-390 nm de amostras tratadas com DNPH, contra amostras tratadas somente com HCl 2.5M. Para cálculo das concentrações, foi usada a seguinte fórmula: $C = \text{Abs}(355-390) \times 45,45 \text{ nmol/mL}$, onde C é a concentração de hidrazonas/mL, e 45,45 o coeficiente de absorção. O procedimento foi todo feito em gelo até a lavagem em TCA. Os resultados foram expressos em nanomoles de grupos carbonils/mL/mg de proteínas totais.

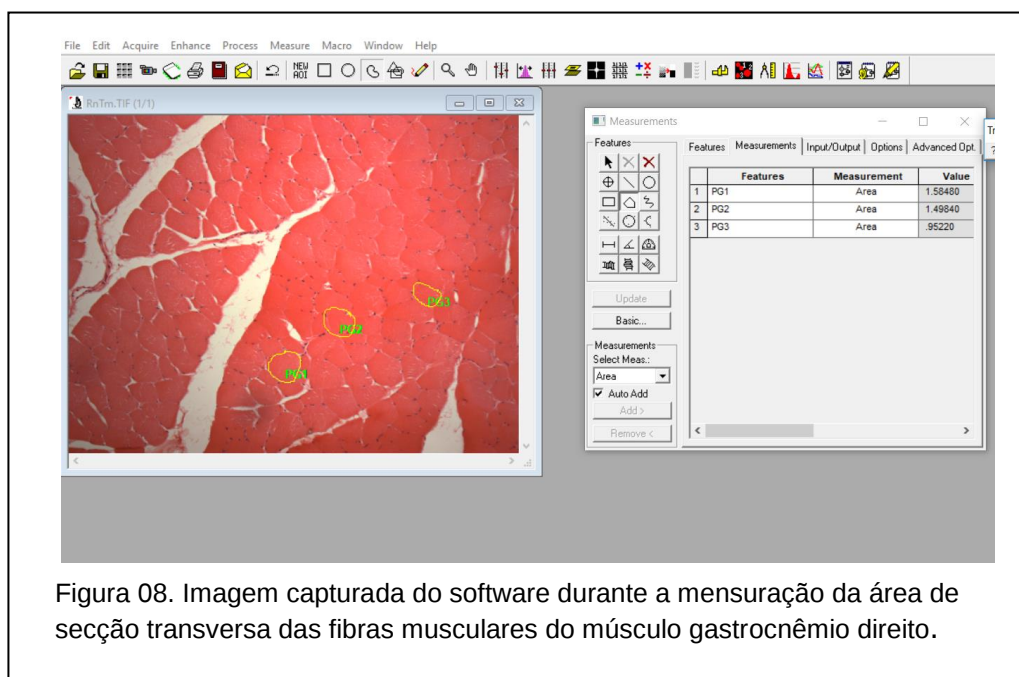
4.7.3 Quantificação de Glutathiona Reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) tecidual

A adição de NADPH inicia uma reação enzimática do GSH da amostra (porção do músculo gastrocnêmio direito) com o 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), levando, por redução do DTNB, à produção de uma substância cromófora, o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (NTB). Na reação, para cada mol de GSH, são produzidos 2 moles de NTB, o que aumenta consideravelmente a densidade óptica observada em 412nm e, conseqüentemente, a sensibilidade do método. Para a quantificação de GSSG, 900µL da amostra (porção do músculo gastrocnêmio direito) foram incubados com 15µL de vinilpiridina por 1 hora em temperatura ambiente para que o GSH fosse bloqueado. O incubado foi centrifugado a 11500 x g por 15 minutos e o sobrenadante utilizado no teste. Acompanhou-se espectrofotometricamente a cinética da reação durante 5 minutos e a concentração de glutathiona total na amostra foi calculada. Os resultados são expressos em micromoles por miligrama de proteína. O índice de estresse (%) foi calculado seguindo a seguinte equação, $IE = \text{GSSG} / (\text{GSH} - \text{GSSG})$.

4.8 Análise morfométrica do músculo gastrocnêmio

A área de secção transversa (AST) das fibras musculares do músculo gastrocnêmio da pata direita dos animais foi utilizada para estabelecer um parâmetro histológico de adaptação muscular após o treinamento aeróbio, segundo protocolo de Brunnquell *et al.* (2015). As amostras musculares foram coletadas e fixadas em metanol e ácido acético glacial (3: 1 v / v) por 70 min e depois embebido em parafina. Cada peça produziu uma lâmina, secções semiseriais de 5 µm foram feitas (5 cortes / lâmina, intervalo de 50 µm / corte) de cada animal e coradas com hematoxilina e eosina. Para análise da AST foram obtidas imagens dos cortes das lâminas, sem

identificação, para que o avaliador da AST desconhecesse qual grupo pertencia as lâminas analisadas. Foram capturados 5 campos por corte em cada lâmina, 25 fibras medidas por campo, totalizando aproximadamente 625 fibras/animal, utilizou-se microscópio óptico (aumento 100 x) acoplado à câmera de alta resolução. As imagens foram analisadas no software Image Pro-Plus 4.0; Média Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) no qual determinou-se a AST em micrômetros quadrados.



4.9 Análise estatística

Os resultados do peso, carga máxima e creatinina sérica estão apresentados em média e erro padrão da média (SEM).

Para a análise estatística de peso (fator de grupo, fator de tempo e interação), foi utilizada Análise de variância de medidas repetidas (ANOVA *two-way*) com pós teste de Tukey. O teste t de Student pareado foi usado para analisar a carga máxima de treinamento. Na análise dos resultados de creatinina sérica, proteínas carboniladas, glutathione reduzida, glutathione oxidada e índice de estresse foi utilizado análise de variância de uma via (ANOVA *one-way*) com pós teste de Tukey. Para análise da quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido (QL) utilizou-se análise de variância de medidas repetidas (ANOVA *two-way*) com pós teste de Sidak para variável curva por miligrama de tecido e Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn para as variáveis área sob a curva, velocidade de subida e pico. Os dados

da morfometria muscular mostram a medida da AST das fibras musculares (em μm^2) e foram organizados em frequência absoluta de ocorrência dividida em intervalo de classe (com 500,00 μm^2 cada), totalizando 24 classes de 0 a 11500,00 μm^2 e apresentadas como histogramas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

A tabela 2 apresenta as características dos grupos estudados no decorrer do experimento relacionadas a peso corporal, carga máxima obtidas nos testes incrementais e creatinina sérica.

Tabela 2. Características dos grupos relacionados a peso corporal, carga máxima, Creatinina sérica.

	SvSd	RnSd	RnTn
Peso Inicial (g)	202±4,44	204±3,92	241±5,88 ^a
Peso Pré-treino (g)	321±4,26	359±5,45 ^b	302±6,10
Peso Final (g)	418±15,94	453±16,19 ^c	399±6,97
Δ Peso (g)	215.00 ± 15,05 ^d	249.00 ± 19,49 ^{d,e}	158.00± 4,61 ^d
Carga máxima Pré-exercício (g)	_____	_____	19,72±0,32
Carga Máxima Pós-exercício (g)	_____	_____	24,98±1,16 [*]
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,55±0,04	0,82±0,04 [#]	0,55±0,04

SvSd: saudável sedentário, RnSd: renal sedentário, RnTn: renal treinamento. Δ Peso = Peso final – Peso inicial. Valores expressos em média ± SEM. Análise de variáveis ponderais – ANOVA de duas vias de medidas repetidas com teste pós teste de Tukey (p <0,0001 para fator tempo, p <0,004 para fator grupo e p <0,0001 para interação) – Pós teste de Tukey significativo: ^a Peso inicial p <0,01 comparando SvSd x RnTn e p <0,05 comparando RnSd x RnTn; ^b Peso pré-treinamento p <0,05 comparando SvSd x RnSd e p <0,001 comparando RnSd x RnTn; ^c Peso final p <0,05 comparando SvSd x RnSd e p <0,001 comparando RnSd x RnTn; ^d Δ peso p <0,001 comparando intra grupo; ^e Δ peso p <0,01 comparando os grupos SvSd x RnSd e RnSd x RnTn. [#] ANOVA de uma via com pós teste de Tukey: p=0,0053 comparando SvSd x RnSd e RnSd x RnTn. ^{*} Teste t de Student pareado: p=0,008 em comparação com a carga máxima antes do exercício.

A análise do peso corporal mostra que no início do experimento RnTn apresentou peso corporal significativamente maior que os demais grupos, apesar de serem animais com mesma idade, provenientes da mesma ninhada e submetidos aos mesmos procedimentos. Todos os grupos ganharam peso durante o decorrer do experimento de maneira significativa, como esperado pela condição da evolução da idade. Nos momentos pré-treinamento e ao final do experimento o grupo RnSd apresentou peso corporal significativamente maior que os demais grupos. O grupo RnTn apresentou menor peso total e menor variação de peso que RnSd ao final do experimento, mas não diferiu significativamente do grupo SvSd. Maior variação de

peso no RnSd pode estar relacionada à redução da função renal que pode resultar em retenção hídrica e estar associado também ao acúmulo de gordura corporal secundário ao sedentarismo. Este efeito não foi observado no grupo RnTn submetido ao HIAT.

A análise do teste incremental mostrou aumento significativo na carga máxima de trabalho para RnTn ao final do experimento, com incremento de 26,67% na carga máxima de trabalho final, resultado compatível com o protocolo de treinamento executado.

A dosagem de creatinina sérica é um marcador da função renal e apresentou-se maior no grupo RnSd que SvSd e RnTn. Não houve diferença na comparação entre SvSd e RnTn, mostrando que o treinamento aeróbio exerceu efeito protetor da função renal.

5.1 Quimiluminescência estimulada por tert-butil (QL)

A quimiluminescência iniciada por tert-butil hidroperóxido (QL) foi utilizada para analisar a integridade das defesas antioxidantes não enzimáticas e os níveis de hidroperóxidos lipídicos em homogenato muscular. O aumento do QL está intimamente relacionado com o estresse oxidativo sofrido anteriormente pelo tecido. Os resultados mostram um padrão de emissão de fóton diferente entre os grupos, indicando um aumento da Hidroperoxidação lipídica e consequente estresse oxidativo. A figura 9 (curva de QL), mostra o padrão de emissão de fótons pelos grupos, área sob a curva, velocidade de subida da emissão de fótons na reação da QL e pico de emissão de fótons na reação da QL.

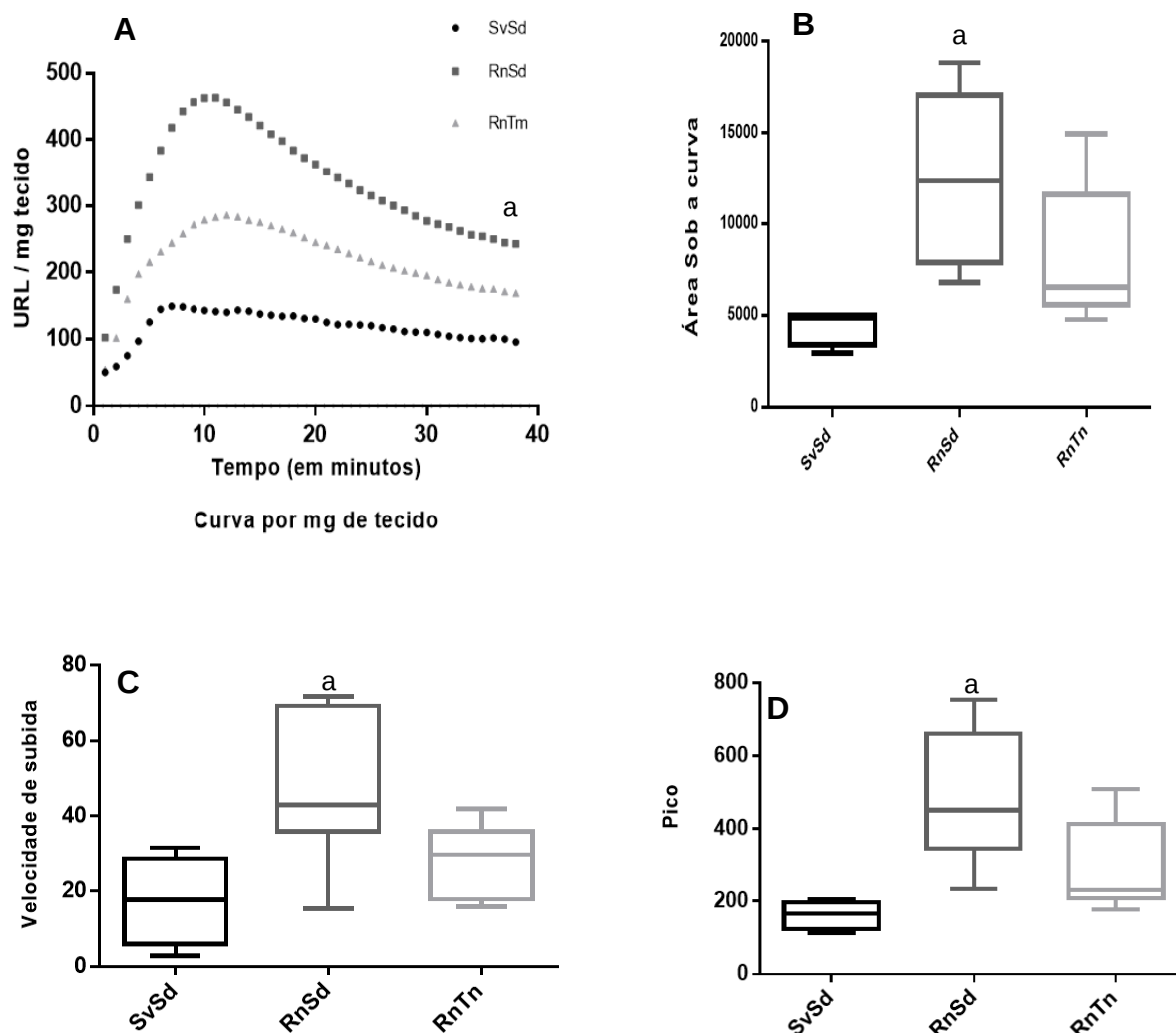


Figura 9. Painel mostrando resultados obtidos por Quimiluminescência (QL) nos níveis de hidroperóxido lipídico de tecido muscular de ratos renais submetidos a protocolo de exercício aeróbio de alta intensidade modalidade natação. SvSd = grupo saudável sedentário; RnSd = grupo renal sedentário; RnTn = grupo renal treinamento. Valores representam média $\pm$ SEM. ^a = diferença significativa quando comparado com SvSd. **A)** Curva da QL por miligrama de tecido - ANOVA de duas vias com pós teste de Sidak: ^a RnSd x SvSd $p < 0,05$. **B, C e D)** Área sob a curva da QL, velocidade de subida da emissão de fótons na reação da QL e pico de emissão de fótons na reação da QL respectivamente - Teste de Kruskal- Wallis com pós teste de Dunn: ^a RnSd x SvSd com $p=0,0018$ em B, $p=0,0274$ em C e $p=0,0009$ em D.

A figura 9 mostra o efeito da lesão isquêmica renal nos níveis de hidroperóxido lipídico muscular em ratos submetidos à natação e sedentários. A mais alta emissão de fótons, velocidade subida e pico observada no RnSd indicando a presença de lipoperóxidos na membrana e maior estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido neste grupo. Observou-se uma maior curva de QL para o grupo RnSd ($333,2 \pm 14,00$ RLU/g de tecido) em comparação com os grupos SvSd e RnTn ($118,4 \pm 3,83$; $218,4 \pm 8,30$

RLU/g de tecido). Quando a área da curva foi extraída observou-se valor significativamente maior para o RnSd (12.488 ± 1663 RLU/g de tecido) em relação ao grupo SvSd e RnTn ($4.426 \pm 497,9$; 8.196 ± 1.425). Na análise da velocidade de subida observou-se valor significativamente maior para o grupo RnSd ($46,38 \pm 7,48$ RLU/g de tecido) em relação ao grupo SvSd e RnTn ($17,54 \pm 5,95$; $28,34 \pm 4,02$ RLU/g de tecido). O pico de subida foi significativamente maior para o grupo RnSd ($480,00 \pm 67,09$ RLU/g de tecido) em comparação com o grupo SvSd e RnTn ($161,60 \pm 19,33$; $302,70 \pm 48,13$ RLU/g de tecido). Os resultados mostram que a condição renal leva a um maior nível de peroxidação lipídica muscular precocemente. No entanto, observa-se que o TAAI foi capaz de promover uma menor peroxidação lipídica e consequente menor estresse oxidativo prévio no grupo RnTn, indicando que esse tipo de treinamento e intensidade, utilizada nesse estudo, pode ter efeitos positivos no tecido muscular de ratos renais.

5.2 Quantificação de Proteínas Carboniladas (PC)

A carbonilação de proteínas é uma modificação causada às proteínas pela exposição ao estresse oxidativo. A figura 10 demonstra os níveis PC para todos os grupos, os valores estão expressos em nmols proteínas carboniladas / mg de proteínas totais.

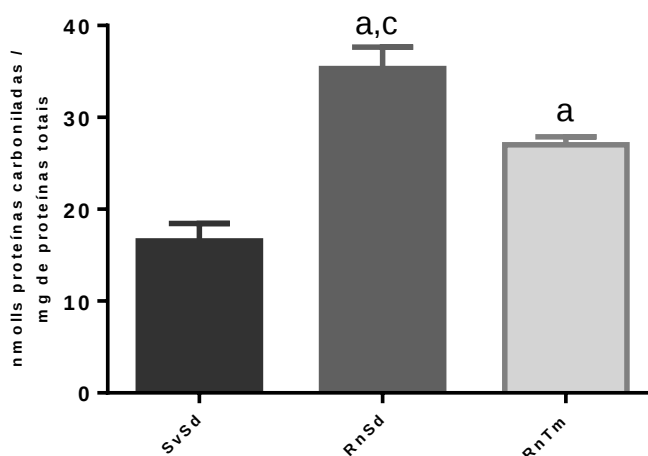


Figura 10. Níveis de proteínas carboniladas em homogenato de músculo gastrôcnemio. SvSd = saudável sedentário; RnSd = renal Sedentário; RnTn = renal treinamento. Valores representam média $\pm$ SEM. ^a = diferença significativa quando comparado com SvSd; ^c = diferença significativa

quando comparado com RnTn. ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. ^a SvSd x RnSd $p < 0,0001$ e SvSd x RnTn $p = 0,005$; ^c RnSd x RnTn $p = 0,02$.

Os níveis de PC foram significativamente maiores no RnSd ($35,33 \pm 2,33$) e RnTn ($27,01 \pm 0,87$) comparado com SvSd ($16,56 \pm 1,89$; $27,01 \pm 0,87$). Esse resultado evidencia o efeito sistêmico da condição renal que leva a estresse oxidativo no músculo precocemente. Contudo, entre os grupos renais RnSd apresentou resultado significativamente maior que RnTn. Esses resultados demonstram que a condição renal no RnTn está presente, entretanto o TAAI não provocou piora da condição de estresse oxidativo intracelular no músculo.

5. 3 Quantificação de Glutathiona Reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) tecidual.

Na tabela 3 apresenta os valores de média e erro padrão da média de Glutathiona Reduzida (GSH), Glutathiona Oxidada (GSSG) e índice de estresse para todos os grupos.

Tabela 3. Comportamento da Glutathiona Reduzida e Oxidada

	SvSd	RnSd	RnTn
GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)	$1,44 \pm 0,072$	$1,07 \pm 0,057^a$	$0,96 \pm 0,034^a$
GSSG ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)	$0,05 \pm 0,001$	$0,05 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,003$
Índice de estresse ($\text{GSSG}/\text{GSH} - \text{GSSG}$)	$0,037 \pm 0,001$	$0,053 \pm 0,004^a$	$0,061 \pm 0,005^a$

Níveis de Glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e índice de estresse em homogenato de músculo gastrocnêmio. SvSd = saudável sedentário; RnSd = renal sedentário; RnTn = renal treinamento. Valores expressos em média $\pm$ SE. ^a = diferença significativa quando comparado com SvSd. ANOVA de uma via com pós teste de Tukey. GSH: ^a SvSd x RnSd $p = 0,0007$ e SvSd x RnTn $p < 0,0001$. Índice de estresse: ^a SvSd x RnSd $p < 0,05$ e SvSd x RnTn $p < 0,001$.

Os maiores níveis de GSH foram encontrados no grupo SvSd e os menores no RnTn. Na comparação entre os grupos observou-se que os níveis de GSH para RnSd

e RnTn foram estatisticamente menores comparado com SvSd. Não houve diferença estatística entre os demais grupos. Os níveis de GSSG não mostrou diferença estatística entre os grupos. O índice de estresse que representa o estresse oxidativo celular, foi significativamente maior nos grupos RnSd e RnTn em relação ao grupo SvSd. Os resultados mostram que houve uma diminuição nos níveis de GSH e maior índice de estresse nos grupos renais que deve estar relacionado a condição renal (isquemia e reperfusão renal). Apesar do consumo de antioxidante observado entre os grupos renais, RnTn obteve um menor estresse oxidativo, como observou-se nos resultados de QL e proteína carbonilada neste grupo, esse resultado sugere que o TAAI foi capaz de promover uma otimização da defesa celular contra o estresse oxidativo.

5.4 Análise morfométrica do músculo gastrocnêmio

A análise da AST das fibras musculares do músculo gastrocnêmio mostrou distribuição de frequência diferente entre os grupos. As Imagens representativas estão demonstradas na figura 11.

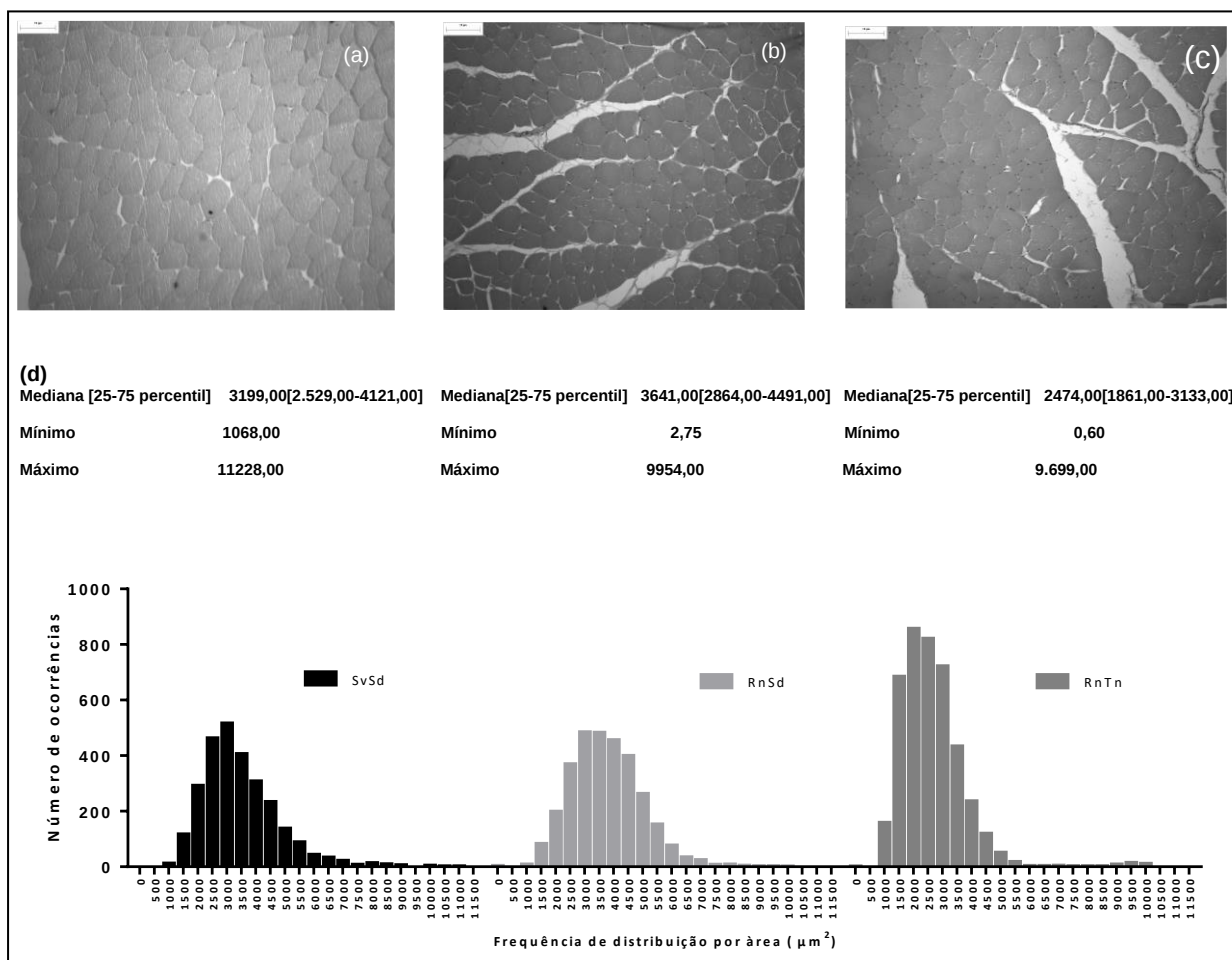


Figura 11. Diferenças histológicas e morfométrica no músculo gastrocnêmio nos grupos de estudo. a) grupo sedentário saudável (SvSd); b) Grupo renal sedentário (RnSd); c) grupo renal treinamento (RnTn); d) Histograma de distribuição de frequência de área de secção transversa da fibra muscular (μm^2). Valores de mediana [25-75 percentis], valores mínimos e máximos foram inseridos no gráfico para ilustrar as mudanças na distribuição entre grupos. Aumento de 100x

O percentil 50 da AST ocorreu na sétima classe para SvSd (3000-3499 μm^2), oitava classe para RnSd (3500-3999 μm^2) e quinta classe para RnTn (2000-2499 μm^2). A frequência cumulativa de observações de fibras musculares para a classe contendo percentil 50 foi de 515 ocorrências para SvSd, em comparação com 484 ocorrências para o RnSd e 856 para RnTn. Houve aumento na frequência das fibras de menor AST no RnTn (4^o, 5^o, 6^o e 7^o classe) e perda das fibras musculares com maior AST (22^o e 23^o classe) para RnSd e RnTn. As fibras com maior AST para RnSd foram (9.953 μm^2 , 21^o classe), RnTn (9969 μm^2 , 21^o classe) em comparação com SvSd (11228 μm^2 , 23^o classe).

6. DISCUSSÃO

O exercício aeróbio é conhecido por gerar vários benefícios como melhorar a capacidade física, função cardiovascular e regulação metabólica (ALI *et al*, 2017). Neste estudo analisou-se o efeito do TAAI sobre parâmetros de estresse oxidativo no tecido muscular e morfometria muscular em um modelo de DR.

O TAAI modalidade natação foi eficaz em melhorar a capacidade de exercício nos ratos renais treinados, como pode-se observar os resultados significativos de incremento na carga máxima suportada durante o esforço ao final do experimento. O treinamento aeróbio pode reduzir as adaptações musculares provocadas pela uremia e incrementar a função muscular, desempenhando papel fundamental na tolerância ao exercício (DE MORAES *et al.*, 2018).

O RnSd representa a evolução da doença renal após 80 dias do procedimento de I/R renal unilateral de 10 minutos. Observa-se que estes animais apresentaram alterações significativas nos níveis de Cr em comparação com os demais grupos. Um episódio de I/R nos rins causa alterações locais e sistêmicas em consequência do estresse oxidativo, pois já está bem documentado que uma lesão renal aguda causa alterações nos rins que levam a Insuficiência renal aguda e posterior DRC em algum grau, devido estresse oxidativo tecidual causado durante a lesão isquêmica e consequente reperfusão. O estresse oxidativo desempenha papel fundamental na progressão da DRC, devido à oxidação pronunciada de proteínas, carboidratos e lipídios, levando a peroxidação lipídica e o acúmulo de produtos de glicação que causam danos graves aos tecidos com consequente inflamação, lesão endotelial, lesão glomerular e mais isquemia renal, levando a um ciclo destrutivo ao ambiente renal (LOCATELLI, *et al.*, 2003; KRATA *et al.*, 2018).

Outro aspecto que corrobora neste contexto são as modificações estruturais e funcionais nos rins submetidos a procedimentos de I/R renal unilateral por curtos períodos de tempo. Bazzano *et al* (2015) observou que 10 minutos de I/R renal unilateral em ratos gerou piora de parâmetros urinários (proteína, ureia, glicose, excreção fracionada de potássio e ureia, depuração de creatinina e atividade urinária da fosfatase alcalina, enzimas gama-glutamil transferase) após 21 dias. Togoe *et al.* (2014) observou que 20 minutos de I/R renal unilateral em coelhos levou a lesões histopatológicas do tecido renal e aumento da creatinina sérica após 80 dias. Os resultados de creatina séria de nosso estudo complementam o estudo de Bazzano *et*

al. e demonstram que os danos renais de um episódio de I/R, mesmo que poucos minutos, podem ser deletérios aos rins e causar alterações na função renal progressiva e gerar doença renal. Assim, 10 minutos de I/R são suficientes para gerar um modelo de DR que simule fases iniciais (2-) da doença. Segundo Slocum, Heung, Pennathur (2012), após a queda abrupta da TFG, há um atraso de dias para que ocorra o aumento níveis de creatinina sérica e quando estes aparecem indicam uma queda na TFG de pelo menos 30%. Os valores encontrados para o grupo RnSd demonstram a progressão da lesão renal ao longo do tempo.

Níveis inferiores de creatinina sérica encontrados no grupo RnTn pode estar relacionado ao efeito do exercício no sistema nervoso simpático (SNS). A hiperatividade do sistema nervoso simpático está presente nos estágios iniciais da DRC, gera alterações a nível tubular e incremento no sistema renina-angiotensina que culminam em vasoconstrição renal, redução do fluxo sanguíneo e consequente redução da TFG. O exercício aeróbio pode regular a hiperatividade do SNS, induzir infra-regulação do sistema renina -angiotensina, incrementar o volume sanguíneo, consequentemente aumentar o fluxo sanguíneo renal no repouso e no exercício, e reduzir a isquemia renal (GRASSI *et al.*, 2011; WYNGAERT *et al.*, 2018).

Outros estudos corroboram com os achados desta pesquisa no efeito do exercício aeróbio nos níveis de creatinina sérica. Waldman *et al* (2017) observaram em ratos hipertensos submetidos a corrida, inibição simpática, menor excreção de aldosterona e consequentemente menor pressão arterial sem efeitos deletérios na função renal. Munõz *et al.* (2018) relatam que o exercício aeróbio diminui a expressão dos receptores de angiotensina II e uma regulação negativa do sistema pró-inflamatório e pró-oxidante e menor dano renal. Desta forma, TAAI pode ser benéfico em retardar a progressão da DRC devido seu efeito direto na inervação simpática dos rins e consequente manutenção da TFG, hipótese inovadora que deve ser explorada pois pode exercer efeito preventivo nos indivíduos em risco de desenvolver DRC.

As análises da variação de peso sugerem que possuir uma alteração renal e estar sedentário contribuem para um maior ganho de peso devido a retenção hídrica causada pelo decréscimo da função renal, além do acúmulo de gordura corporal secundária ao sedentarismo. Isso é reforçado pelos resultados de menor peso final e menor variação de peso encontrados no grupo RnTn quando comparado ao grupo RnSd, sem diferença significativa entre o grupo RnTn e SvSd. Esses resultados demonstram os efeitos positivos do exercício físico sobre a função renal (discutido

anteriormente na creatinina sérica) e composição corporal, pois o TAAI aumenta o gasto de energia, o que pode justificar a mudança na composição corporal. A literatura mostra que esses efeitos são dependentes da intensidade do esforço realizado e estão relacionados à liberação de catecolaminas, hormônio do crescimento, consumo de oxigênio após o exercício, atividade da lipoproteína lipase e melhora da resposta insulínica que geralmente têm repercussões na mobilização do triacilglicerol e na taxa de oxidação, resultando na redução da massa gorda (SERTIE *et al.*, 2019).

A QL foi utilizada para analisar os níveis de peroxidação lipídica no tecido muscular. O aumento da QL está intimamente relacionado com o estresse oxidativo sofrido anteriormente pelo tecido. Observou-se que o grupo RnSd apresentou resultado significativamente maior sobre todos os parâmetros de QL (curva por mg de tecido, área sob a curva, velocidade de subida e pico) que os demais grupos. O RnTn apresentou uma tendência ao aumento nos parâmetros da QL em relação SvSd, porém não significativa. Esses resultados demonstram maior estresse oxidativo nos grupos renais, porém muito mais intensos no RnSd e demonstra que uma lesão renal causada por isquemia de 10 minutos e consequente reperfusão gera repercussões sistêmicas, afeta precocemente o tecido muscular, aumenta o estresse oxidativo, inflamação, ativa via catabólicas e culmina na perda de massa muscular vista na DR (DU; HU; MITCH, 2005).

O efeito patológico causado no tecido muscular secundário a alteração renal pode ser mediado pela transmissão sistêmica do estresse oxidativo via substâncias condutoras de radicais como citocinas e subprodutos metabólicos. As citocinas inflamatórias (IL-1, IL6, TNF α) aumentam o estresse oxidativo através da ativação de leucócitos periféricos que invadem os tecidos e produzem excesso de oxidantes, causam lesão direta no tecido muscular ou ativam vias catabólicas. Além disso, substâncias que deveriam ser eliminadas na urina (isopropanos) podem afetar a liberação de citocinas de monócitos e neutrófilos e ativar vias catabólicas através da amplificação da resposta inflamatória e aumento do estresse oxidativo no músculo (MOYLAN; REID, 2007).

Os níveis de PC foram significativamente maiores nos grupos RnSd e RnTn em comparação com o SvSd e demonstram que a condição renal existente leva ao aumento desse marcador. As proteínas também são alvos das ERO e causam modificação em sua estrutura, provocando perda da função e fragmentação das estruturas proteicas, resultando em proteínas carboniladas, usadas como marcador

de oxidação na DRC estão relacionadas a complicações da uremia (LEVINE, 2002; COSTA et al., 2018).

Porém, entre os grupos renais, RnTn apresentou nível de PC significativamente menor que RnSd. Esse resultado corrobora com o resultado de QL e mostra que em condições de doença renal, o treinamento aeróbio, ainda que alta intensidade, pode exercer efeito protetor sobre o estresse oxidativo no músculo. O treinamento aeróbio pode induzir a renovação e remodelamento muscular através da ativação do sistema proteossoma, envolvido na degradação de proteínas modificadas oxidativamente, favorecendo o *turnover* de proteínas e diminuir o dano oxidativo, afetando positivamente a função fisiológica das proteínas (RADAK; YOUNG; GOTO, 2008). Esse efeito deve estar relacionado aos achados de proteína carbonilada no grupo RnTn.

Além disso, o treinamento aeróbio tem um importante efeito anti-inflamatório através do aumento da expressão de IL6 (interleucina 6), citocina produzida pelas fibras musculares esqueléticas em resposta ao exercício físico com efeito anti-inflamatório (PEDERSEN; FISHER, 2007). Esses efeitos, apesar de não terem sido medidos, podem estar envolvidos nos resultados deste estudo e corroboram com os resultados de estresse oxidativo.

A análise GSH mostrou uma diminuição significativa nos níveis desse antioxidante no RnSd e RnTn em relação ao SvSd. Não houve diferença nos níveis de GSSG entre os grupos renais, porém o índice de estresse, que indica consumo de antioxidante foi significativamente maior no RnSd e RnTn. Esses resultados nos níveis de GSH nos grupos renais confirmam que a doença renal, ainda que em fases iniciais, promove aumento do estresse oxidativo muscular e causa depleção nos níveis de antioxidante, na tentativa de neutralizar os agentes químicos e produtos da lipoperoxidação (SMALL et al., 2012).

Não houve diferença significativa nos níveis de GSH, GSSG e IE encontrados entre os grupos RnSd e RnTn. Considerando que os níveis de estresse oxidativo (QL e PC) foram mais intensos no RnSd, esses resultados pode indicar que o TAAI, mesmo com condição renal existente, contribuiu para otimizar as defesas antioxidantes no RnTn. Corroborando com este resultado, Peternelj et al. (2015) observaram menor níveis de glutathiona no músculo gastrocnêmio após submeter ratos ao exercício aeróbio de alta intensidade. Os autores relataram que o aumento de ERO é característica do exercício aeróbio e provavelmente essa é a causa de um menor

nível de GSH. Em contra partida, observaram melhora de fatores relacionados a modulação da atividade e expressão de enzimas antioxidantes e regulação da homeostase proteica.

Além disso, existem outros mecanismos relatados na literatura pelos quais o TAAI pode diminuir o estresse oxidativo na DRC. Tucker *et al.* (2015) relataram que o treinamento aeróbio crônico surgiu como uma terapia promissora em termos de redução de lesões decorrentes do estresse oxidativo e inflamação. Segundo os autores o mecanismo primário nesse efeito seria uma regulação positiva da enzima superóxido dismutase, redução de enzimas geradoras de ERO na mitocôndria (NADPH oxidase) responsáveis por uma grande fonte de estresse oxidativo via geração de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, o TAAI pode ter contribuído para manter um menor estresse oxidativo no RnTn, mesmo com condição renal existente, utilizando outras vias que não foram medidas neste estudo.

É consenso na literatura que produção constante de EROS durante o treinamento aeróbio pelo metabolismo mitocondrial promove uma adaptação específica, com aumento da capacidade antioxidante com expressão de proteínas antioxidante enzimáticas e não enzimáticas. Além disso, o treinamento aeróbio está associado a menores níveis de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) em ratos renais, gerando uma modulação da resposta inflamatória. (FREITAS *et al.*, 2018; RADAK; YOUNG; GOTO, 2008). Assim o TAAI, além de não piorar o estresse oxidativo na DR, pode melhorar o perfil inflamatório, envolvido diretamente na sinalização das vias catabólicas

Na análise da morfometria do músculo gastrocnêmio houve uma redução na frequência de fibras musculares de maior AST nos ratos renais (RnSd e RnTn) em relação ao grupo SvSd. O grupo RnTn apresentou maior frequência de observação de fibras de menor diâmetro que os demais grupos. A alteração morfométrica presente no RnSd indica que este grupo apresentou remodelamento muscular secundário à lesão renal, demonstra que mesmo em casos leves de DRC, há comprometimento muscular precoce. Considerando que o músculo esquelético é o principal estoque de proteína do corpo, nossos dados podem indicar redução significativa de proteína contrátil e um aumento similar no catabolismo muscular e / ou diminuição do anabolismo muscular que acontece primariamente na doença renal (WORKENEH; MITCH, 2010).

A atrofia muscular na DRC é causada principalmente pela ativação do catabolismo proteico. O estado urêmico, acidose metabólica, inflamação e estresse oxidativo ativam inúmeros mecanismos que estimulam o catabolismo proteico. Essas alterações levam a diminuição da proliferação e diferenciação das células satélites, resistência à insulina, ativação de fatores de inibição do crescimento do tecido muscular. Todos esses fatores estimulam a proteólise via caspase 3 e sistema ubiquitina-proteossoma levando a atrofia muscular (WANG; MITCH, 2014).

O TAAI não atenuou a perda das fibras musculares de maior AST no RnTn, porém observamos maior frequência de observação das fibras musculares de menor AST, quarta a sétima classe, indicando uma adaptação das fibras musculares com treinamento aeróbio. Sakas *et al.* (2003) relatam que o músculo gastrôcnemio é composto por 55% de fibras musculares tipo I (lenta/oxidativa) e 45% tipo II (rápida/glicolítica), sendo que a atrofia na DRC afeta ambos tipos de fibras, porém com predomínio nas fibras tipo IIa e IIx, com redução da capilarização. Os autores observaram que o treinamento aeróbio promoveu incremento em todos tipos de fibras do músculo gastrôcnemio. Posteriormente análises referentes ao tipo de fibra muscular devem ser realizadas para elucidar a contribuição do TAAI.

O aumento da frequência de observação de fibras musculares com menor AST pode estar relacionado à remodelamento das fibras tipo I, principalmente. Iepsen *et al.* (2016) relataram que o treinamento aeróbio provoca adaptação da fibra muscular em direção ao fenótipo muscular mais oxidativo. Entretanto, a confirmação dessa hipótese requer uma análise morfológica específica do tecido muscular.

Knopka e Harber (2014) defendem que o TAAI induz hipertrofia muscular das fibras musculares I e IIa, através da regulação de mecanismos proteolíticos e incremento da síntese proteica. As vias envolvidas na hipertrofia muscular induzido pelo exercício aeróbio incluem redução da expressão de miostatinas (inibidor das células satélite), aumento da expressão de proteínas (PGC-1 que regulam vias de funcionamento mitocondrial) e metabolismo proteico, com redução concomitante fatores catabólicos e incremento de fatores de crescimento muscular.

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL6, TNF- α , PCR) estão aumentados na DRC, estimulam a degradação de proteínas musculares. Moraes *et al.* (2018) demonstraram que o exercício aeróbio atenua a apoptose muscular via sinalização reativa AKt, reduz alterações nas proteínas, prevenindo a proteotoxicidade e pode gerar adaptações contra o estresse celular induzido pela uremia crônica

O TAAI pode ter influenciado a modulação da inflamação crônica e diminuição do estresse oxidativo muscular que acontece precocemente na DRC. Cardoso *et al.* (2018) observaram que exercício de natação de alta intensidade promoveu incremento nas defesas antioxidantes em ratos, além de prevenir o aumento dos marcadores inflamatórios. Miyagi *et al* (2014) observaram que o exercício aeróbio reduziu os níveis de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) em ratos renais, gerando uma modulação da resposta inflamatória. Esses mecanismos devem estar envolvidos em nossos resultados, considerando que os marcadores de estresse oxidativo foram menores no RnTn.

Entretanto o efeito do treinamento aeróbio na doença renal ainda é controverso na literatura. Yoshida *et al* (2017) realizaram exercício aeróbio de alta intensidade em esteira rolante, por cinco semanas em ratos renais associado a suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada e dieta de baixa proteína. Os autores não encontraram diferença na AST das fibras musculares do sóleo, mas observaram sinalização na síntese proteica no grupo com suplementação. Organ *et al.* (2018) realizaram corrida em esteira com ratos renais por 10 semanas e observaram aumento do catabolismo muscular esquelético devido aumento de atrogina 1 e ubiquitinação, sem síntese proteica concomitante, além de uma inadequada ativação das células satélites. Os autores concluíram que o exercício aeróbio, realizado por meio de corrida em esteira não foi protetor em animais com DRC. Considerando a crescente prevalência da DRC e precoce comprometimento muscular, há uma clara necessidade de entender como prescrever exercício e gerar benefícios.

Um aspecto importante a ser estudado para elucidar as hipóteses levantadas neste estudo é a interação de fatores externos (sistematização do treinamento, tipo de estímulo, nutrição adequada, qualidade do gesto técnico) com fatores genéticos, os quais são importantes para explicar as diferentes respostas ao treinamento físico (DIAS, 2011). Nesse sentido, a análise do genoma humano pode esclarecer muitos aspectos ainda obscuros sobre o efeito do treinamento aeróbio na DRC.

Os resultados deste estudo mostram que o treinamento aeróbio de alta intensidade exerceu efeito protetor sobre os rins, com diminuição dos níveis de creatinina sérica, promoveu menor peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, apresentou consumo de antioxidante que no entanto não piorou a condição geral de estresse oxidativo, não reverteu atrofia das fibras de maior AST, porém incrementou as fibras de menor AST no grupo treinamento. Apesar dos resultados não serem

conclusivos, podemos sugerir que o TAAI pode ser utilizado como uma estratégia para diminuir o estresse oxidativo muscular e retardar perda de massa muscular na DRC, visto que esse fenômeno acontece precocemente e tem repercussões graves na qualidade de vida do indivíduo.

O foco deste estudo são as fases iniciais e intermediárias da DRC (2-4), quando o indivíduo ainda não necessita de terapia substitutiva. Os resultados deste estudo sugerem que o Treinamento de alta Intensidade pode ser usado como estratégia alternativa para conservação da função renal, manutenção da massa muscular e aptidão física em indivíduos com DRC, favorecendo a qualidade de vida. Mais estudos se fazem necessário para que todas as hipóteses que envolvam exercício físico e doença renal possam ser elucidadas.

Considerando o impacto da DRC na saúde do indivíduo, reforça-se a importância da implementação de serviços de reabilitação com equipe multidisciplinar, destacando-se principalmente o papel do fisioterapeuta na avaliação funcional e prescrição de exercícios terapêuticos que contribuam para a manutenção da funcionalidade do indivíduo.

7. CONCLUSÕES

Neste estudo analisou-se efeito do treinamento aeróbio de alta intensidade sobre parâmetros de estresse oxidativo no tecido muscular e morfometria muscular em um modelo de doença renal. O modelo animal simulou fases iniciais da doença renal crônica não dialítica, promoveu alterações na função renal e alteração muscular, confirmou que na DR há comprometimento muscular precoce. Dessa forma conclui-se que:

- O protocolo utilizado neste estudo mostrou-se eficaz e adequado para a simulação de TAAI, causou menor sofrimento ao animal, uma vez que os ratos são nadadores natos. Mostrou-se superior em custo e benefício para a natureza do animal em relação a outros protocolos de treinamento aeróbio;
- O TAAI mostrou efeito redutor da creatinina sérica, indicando proteção da função renal pelo incremento do fluxo sanguíneo e menor reatividade do Sistema nervoso Simpático;
- Os níveis de peroxidação lipídica medidos através da QL apresentaram-se aumentados nos animais renais, mostrando que na DRC há aumento desse marcador precocemente. O TAAI foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica e consequentemente atenuar o estresse oxidativo no músculo;
- Os níveis de carbonilação de proteínas, também foram utilizados para medir o estresse oxidativo muscular. O resultado dessa variável corroborou com os resultados de QL, indicando estresse oxidativo aumentado no tecido muscular dos animais renais. O TAAI diminuiu os níveis de carbonilação de proteínas, contribuindo para menor estresse oxidativo muscular.
- Os níveis de GSH, GSSG e índice de estresse mostraram consumo de antioxidante em fases iniciais da DRC. O TAAI não incrementou as defesas antioxidantes, porém foi capaz de otimizar a defesa celular e promover um menor estresse oxidativo no RnTn;
- O TAAI induziu maior frequência de distribuição das fibras de menor área de secção transversa nos animais, indicando remodelamento muscular.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABREU, C. C. *et al.* Does resistance exercise performed during dialysis modulate Nrf2 and NF- κ B in patients with chronic kidney disease? **Life Sciences**, v. 188, p. 192–197, 2017. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/abs. Acesso em: 21 Nov 2018.
- ADAMS, Gregory R.; VAZIRI, Nosratola D. Skeletal muscle dysfunction in chronic renal failure: effects of exercise. **American Journal Physiology Renal Physiol**, v. 290, p. 753-761, 2006. Disponível em: <http://ajprenal.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajprenal.00296.2005>. Acesso em: 10 Nov 2018.
- ALI Badreldin H. *et al.* The effect of swimming exercise on adenine-induced kidney disease in rats, and the influence of curcumin or lisinopril thereon. **PLoS One**, v.12, n. 4, p. 1–20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176316>. Acesso em 15 Dez 2018.
- AMORIM, Aline Guimarães; TIRAPEGUI, Julio. Aspectos atuais da relação entre exercício físico, estresse oxidativo e magnésio. **Rev. Nutr.**, v. 21, n. 5, p. 563-575, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732008000500009>. Acesso em: 20 Nov 2018.
- ANDRADE, Laiana Sepúlveda de; MARREIRO, Dilina do Nascimento. Aspectos sobre a relação entre exercício físico, estresse oxidativo e zinco. **Rev. Nutr.**, v. 24, n. 4, p. 629-640, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732011000400011>. Acesso em: 10 Jun 2018.
- BARBOSA, Kiriaque Barra *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, Campinas, v 23, n 4, p. 629-643. 2010. Disponível em: www.scielo.br/scielo. Acesso em: 10 Jun 2018.
- BAILEY, James L. *et al.* Chronic Kidney Disease causes defects in signaling through the Insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway: Implications for Muscle Atrophy. **Journal American Society Nephrology**, v.17, p. 1388–1394, 2006. Disponível em: <https://jasn.asnjournals.org/content/17/5/1388>. Acesso em: 10 Nov 2018.
- BAILEY, JL; DING, X, MITCH, W E . The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-roteasome pathway. **Clin Invest.**, v.97, n.6, p. 1447-1453, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI118566>. Acesso em: 15 Jan 2019.
- BASTOS, Marcus Gomes; KIRSZTAJN, Gianna Mastroianni. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93-108, 2011. Disponível em: www.scielo.br. Acesso em: 22 Nov 2018.

BARRETO, Sandhi M. *et al.* Chronic kidney disease among adult participants of the ELSA-Brasil cohort: association with race and socioeconomic position. **Journal Epidemiology Community Health**, v. 70, p-380-389, 2016. Disponível em: <http://dx.doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1136/jech-2015-205834>. Acesso em 01 Dez 2018.

BARAZZONI, R. *et al.* Ghrelin and Muscle Metabolism in Chronic. **Journal of Renal Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 171–175, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2011.10.017>. Acesso em 05 Jan 2019.

BARBIERI, Michelangela *et al.* Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, p. E481–E487, 2003. Disponível em: www.physiology.org/journal/ajpendo. Acesso em: 22 Out 2018.

BAZZANO, Telma *et al.* Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 4, p. 277-88, 2015. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150040000007>. Acesso em: 10 Jan 2016.

BELLOMO, Rinaldo; AKELLUM, John ; RONCO, Claudio. Acute kidney injury. **The Lancet**, v. 380, n. 9843, August, p. 756-766, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61454-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61454-2). Acesso em: 23 Nov 2018.

BONVENTRE, Joseph V.; YANG, Li .Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4210-21, 2011. Disponível em: www.jci.org/articles/view/45161. Acesso em: 23 Nov 2018.

BRUNNQUELL, Claudia R *et al.* Oxidative and proteolysis-related parameters of skeletal muscle from hamsters with experimental pulmonary emphysema : a comparison between papain and elastase induction. **Int J Exp Pathol.**, v. 96, n. 3, p. 140-150, 2015. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/iep.12121>. Acesso em 20 Jun 2018.

CADENAS, Enrique. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Bio Factors**, v. 6, p. 391-397, 1997. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1002/biof.5520060404> Acesso em 25 Nov 2017.

CACHOFEIRO, Victoria *et al.* Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. **Kidney International**, v. 74, Suppl. 111, p. S4–S9, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ki.2008.516>. Acesso em: 03 Jan 2019.

CARRERO, Juan Jesu´s *et al.* Muscle atrophy, inflammation and clinical outcome in incident and prevalent dialysis patients. **Clinical Nutrition**, v. 27, p. 557-64. 2008. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 10 Nov 2018.

CASTANEDA, C. Resistance training to reduce the malnutrition-inflammation complex syndrome of chronic kidney disease. **American Journal of Kidney**

Diseases, v. 43, p. 607-616, 2004. Disponível em :
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2003.12.025>. Acesso em: 20 Dez 2018.

CHEN, Y. *et al.* Increased workload fully activates the blunted IRS-1/PI3-kinase/Akt signaling pathway in atrophied uremic muscle. **Kidney International**, v. 73, n. 7, p. 848–855, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002801>. Acesso em 16 de Jan 2019.

COELHO, Barbara LP *et al.* Physical Exercise Prevents the Exacerbation of Oxidative Stress Parameters in Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20, n. 3: p. 169–175, 2010. Disponível em:
<https://doi.org/10.1053/j.jrn.2009.10.007>. Acesso em: 10 Jun 2018.

CUNHA, Rafael Rodrigues *et al.* Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. **Cell Biochem Funct.**, v. 27, n. 6, p. 351-357, 2009. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1002/cbf.1580>. Acesso em Jan 2017.

CARDOSO, Gisele Henrique *et al.* High-Intensity Exercise Prevents Disturbances in Lung Inflammatory Cytokines and Antioxidant Defenses Induced by Lipopolysaccharide. **Inflammation**, v.41, n. 6, p.2060-2067, 2018. Disponível em: <https://link-springer-com.ez51.periodicos.capes.gov.br>. Acesso em 12 Nov 2018.

CAMPISTOL, Josep M. Uremic myopathy. **Kidney International**, v.62, p. 1901-1913, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00614.x>. Acesso em: 21 Jan 2019

COSTA, Aline Nara *et al.* Protein carbonyl concentration as a biomarker for development and mortality in sepsis-induced acute kidney injury. **Bioscience Reports**, v. 38, p. 1-8. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BSR20171238>. Acesso em: 21 Abr 2019.

DE MORAES, Wilson Max Almeida Monteiro *et al.* . Aerobic exercise training rescues protein quality control disruption on white skeletal muscle induced by chronic kidney disease in rats. **J Cell Mol Med.**, v. 22, n. 3, p. 1452-1463, 2018. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jcmm.13374>. Acesso em: 15 Dez 2018.

DEBORAH, Adey *et al.* Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.278, p. E219–E225, 2000. Disponível em: www.physiology.org/journal/ajpendo. Acesso em: 15 Jan 2019.

DIAS, Rodrigo Gonçalves. Genética, Performance Física Humana e Doping Genético: o Senso Comum Versus a Realidade Científica. **Revista Brasileira Medicina Esporte**, v. 17, n. 1, p. 62-70. 2011. Disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v17n1/v17n1a12.pdf>. Acesso em: 25 Maio 2019.

DHARMARAJAN, Sai H. *et al.* State-Level Awareness of Chronic Kidney Disease in the U.S. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 53, n. 3., p. 300-307. 2017. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih-

gov.ez51.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC5706661/. Acesso em: 10 Mar 2019.

DROGE, Wulf. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 48-75, 2002. Disponível em: www.physiology.org/journal/physrev. Acesso em 10 Out 2018.

DUCAN et al, 2012. Doenças não-transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista Saúde Pública**, v. 46 (supl), p.126-134, 2012. Disponível em: www.scielo.br/rsp. Acesso em: 21 Nov 2018.

EKNOYAN, Garabed . Meeting the challenges of the new K/DOQI guidelines. American **Journal of Kidney Diseases**, v. 41, Supl. 5, Jun, p. 3-10, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(03\)00371-8](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(03)00371-8). Acesso em: 22 Nov 2018.

ENE-IORDACHE, Bogdan *et al.* Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): a cross-sectional study. **Lancet Glob Health**, v. 4, p. 307-3019, 2016. Disponível em: www.thelancet.com/lancetgh. Acesso em: 22 Nov 2018.

EVENS, Andrew M. Motexafin gadolinium: a redox-active tumor selective agent for the treatment of câncer. **Current Opinion in Oncology**, v. 16, p. 576-580, 2004. Disponível em: <https://insightsovid.ez51.periodicos.capes.gov.b>. Acesso em 10 Out 2018.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Medica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>. Acesso em: 20 Nov 2018.

FREITAS, Daniel A. *et al.* High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. **Physiology & Behavior**, v. 184, p. 6-11. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.027>. Acesso em: 15 Mar 2019.

FLECHA, Beatriz Gonzalez; LLESUY, Susana; BOVERIS; Alberto. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, p. 93-100, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K). Acesso em: 10 Mar 2017.

GATÉ, L *et al.* Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed & Pharmacother** , v. 53, p. 169-180, 1999 ; 53. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(99\)80086-9](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(99)80086-9). Acesso em: 12 Out 2018.

GUELLEC, Chantal Barin-Le *et al.* Ischemia/reperfusion-associated tubular cells injury in renal transplantation: Can metabolomics inform about mechanisms and help identify new therapeutic targets? **Pharmacological Research**, v. 129, p. 34-43, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.032>. Acesso em: 25 Nov 2018.

GERSCHMAN, Rebeca *et al.* Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in common. **Science**, Vol. 119, p.623-623, 1954. Disponível em: <http://science.sciencemag.org>. Acesso em 20 FEV 2018.

GREEN, Katherine; BRAND, Martin D.; MURPHY, Michael P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. **Diabetes**, v. 53, Suppl 1, p. 110-118, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.S110>. Acesso em: 20 Set 2018.

GREFTE, Sander *et al.* Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem cells and development**, v.16, p. 857–868, 2007. Disponível em: www.liebertpub.com . Acesso em 21 Out 2018.

GRGIC, Ivica *et al.* Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. **Kidney International**, v.82, p. 172-183. 2012. Disponível em: www.kidney-international.org. Acesso em: 15 Nov 2018.

GROLL, Michael *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. **Nature Structural Biology**, v.7, n. 11, November, p. 1062-1067, 2000. Disponível em: <http://structbio.nature.com>. Acesso em 16 Jan 2019.

GOLL, Darrel E. *et al.* The Calpain System. **Physiol Rev**, v. 83, p. 731-787, 2003. Disponível em: www.physiology.org/journal/physrev. Acesso em: 8 Jan 2019.

GRASSI, Guido *et al.* Early Sympathetic Activation in the Initial Clinical Stages of Chronic Renal Failure. **Hypertension**, v. 57, n. 4, p. 846-851, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164780>. Acesso em: 20 Dez 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine, **Oxford University Press**, Oxford, 1999.

HARADA, K. *et al.* Impact of Skeletal Muscle Mass on Long-Term Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease. **American Journal Cardiology**, v. 119, n. 8, p. 1275-80, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.01.003>. Acesso em: 21 Nov.2018.

HALLAN, Stein Ivar; ORTH, Stephan Reinhold. The Conundrum of Chronic Kidney Disease Classification and End-Stage Renal Risk Prediction in the Elderly – What Is the Right Approach? **Nephron clinical Practice**, v. 116, p. 307-316, 2010. Disponível em: www.karger.com.ez51. Acesso em 24 Nov 2018.

HARMAN, Denham. Free radicals in aging. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 84, p. 155-161, 1988. Disponível em: <https://link.springer-com.ez51.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2FBF00421050.pdf>. Acesso em: 03 Mar 2018.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results

mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-255, 2004. Disponível em: www.nature.com/bjp. Acesso em 02 Jan 2019.

HARWOOD, Steven M. *et al.* Calpain is activated in experimental uremia: Is calpain a mediator of uremia-induced myocardial injury? **Kidney International**, v. 63, p. 866-877, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00823.x>. Acesso em: 22 Jan 2019.

HEIWE, S.; JACOBSON, S. H. Exercise training for adults with chronic kidney disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 10, 2011. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003236.pub2>. Acesso em: 16 de Jan 2019.

HENRIQUE, Diane Michela Nery *et al.* Treinamento aeróbico melhora a capacidade funcional de pacientes em hemodiálise crônica. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, Juiz de Fora, 2009. Disponível em: <http://www.arquivosonline.com.br>. Acesso em: 21 Jan 2019.

HIRAKI, Koji *et al.* Effects of home-based exercise on predialysis chronic kidney disease patients: a randomized pilot and feasibility trial. **I. BMC Nephrology**, v. 18, p. 1-7, 2017. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s12882-017-0613-7>. Acesso me: 22 Jan 2019.

HUANG, Honglei *et al.* Proteo-metabolomics reveals compensation between ischemic and non-injured contralateral kidneys after reperfusion. **Scientific Report**, v. 8, n. 1, p. 1-12. 2018. Disponível em: www-nature.ez51.periodicos.capes.gov.br/article. Acesso em: 20 Nov 2018.

HEIWE, S; JACOBSON, SH. Exercise training for adults with chronic kidney disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.10. Art. No.: CD003236, 2011. Disponível em: www.cochranelibrary.com/cdsr. Acesso em: 21 Nov 2018.

ISHANI, Areef *et al.* Acute Kidney Injury Increases Risk of ESRD among Elderly. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, p. 223–228. 2009. Disponível em: www.jasn.org. Acesso em: 10 Nov 2018.

ISHIKAWA, Yuji *et al.* Effect of Exercise on Kidney Function, Oxidative Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetic KK-A^y Mice. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1-10, 2012. Disponível em: www.hindawi.com. Acesso em 20 Nov 2018.

IKIZLER TA. Protein and energy: recommended intake and nutrient supplementation in chronic dialysis patients. **Semin Dial**, v. 17, n. 6, p. 471-78, 2004. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.0894-0959.2004.17608.x>. Acesso em 20 Jan 2019.

IEPSEN, Ulrik Winning *et al.* Effect of endurance versus resistance training on quadriceps muscle dysfunction in COPD: a pilot study. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.**, v. 11, n. 1, p. 2659-2669, 2016. Disponível em: <https://www.dovepress.com/>. Acesso em: 05 Dez 2018.

JOHANSEN, Kirsten L.; PAINTER, Patricia. Exercise in Individuals With CKD. **American Journal Kidney Disease**, v. 59, n. 1, p. 126-134, 2012. Disponível em: www.sciencedirect.ez51.periodicos.capes.gov.br. Acesso em: 21 Nov 2018.

JOANISSE, Sophie et al. Satellite cell activity, without expansion, after nonhypertrophic stimuli. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 309, p. R1101–R1111, 2015. Disponível em: www.physiology.org/journal/ajpregu. Acesso em: 10 Jan 2019.

KARAMOUZIS, Ioannis et al. Increase in Oxidative Stress but Not in Antioxidant Capacity with Advancing Stages of Chronic Kidney Disease. **American Journal Society Nephrology**, v.28, p. 397-404, 2008. Disponível em: www.karger.com/ajn. Acesso em: 10 Out 2018.

K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. **American Journal Kidney Disease**, v. 39, Suppl 1, p.1-266. 2002. Disponível em: www.kidney.org. Acesso em: 23 Nov 2018.

KRATA, Natalia et al. Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence? **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 66, n. 3, p. 211-220, 2018. <https://link-springer-com.ez51.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007%2Fs00005-017-0496-0>. Acesso em: 02 Jan 2018.

KISIC, Bojana et al. Role of Myeloperoxidase in Patients with Chronic Kidney Disease. **Oxidative. Medicine and Cellular Longevity**, v.2016, p. 1-10, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1069743>. Acesso em: 05 Jan 2019.

KIEPE, Daniela et al. Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I Stimulates Cell Proliferation and Induces IGF Binding Protein (IGFBP)- 3 and IGFBP-5 Gene Expression in Cultured Growth Plate Chondrocytes via Distinct Signaling Pathways. **Endocrinology**, v.146, n. 7, p. 3096–3104, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/146/7/3096/2500276> Acesso em: 21 Out 2018.

KOURIE, J. I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.275, p.C1–C24, 1998. Disponível em: www.ncbi.nlm-nih-gov.ez51.periodicos.capes.gov.br Acesso em 8 Jan 2019.

KUROSAKA, M. et al. Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. **Acta Physiol**, v. 205, p. 159-166, 2012. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1748-1716.2011.02381.x> . Acesso em 10 Jan 2019.

KONOPKA, Adam R; HARBER, Matthew P. Skeletal Muscle Hypertrophy after Aerobic Exercise Training. **Exerc Sport Sci Rev.**, v.42, n. 2, p. 53-61, 2014.

Disponível em: <http://ovidsp.txovid.ez51.periodicos.capes.gov.br>. Acesso em: 05 Jan 2018.

KOPPLE, Joel. D. *et al.* Exercise in Maintenance Hemodialysis Patients Induces Transcriptional Changes in Genes Favoring Anabolic Muscle. **Journal American Society Nephrology**, v. 18, p. 2975–2986, 2007. Disponível em: www.jasn.org. Acesso em 21 Nov 2018.

LEVIN, Addera *et al.* Review Global kidney health 2017 and beyond : a roadmap for closing gaps in care , research , and policy. **Lancet**, v. 390, p.1888–917, outubro, 2017. Disponível em: www.sciencedirect.ez51.periodicos.capes.gov.br/science/article. Acesso em: 15 Nov 2018.

LEVEY, Andrew S *et al.* The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. **Kidney International**, v. 80, p. 17-28, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ki.2010.483>. Acesso em: 24 NOV 2018.

LOCATELLI, Francesco *et al.* Oxidative stress in end-stage renal disease: an , p. emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 1272-1280, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/ndt/article-abstract/18/7/1272/1809799> Acesso em 02 Jan 2019.

LIU, Jia *et al.* Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 6469-6501, 2011. Disponível em: www.mdpi.com/journal/ijms. Acesso em: 20 Nov 2018.

LIAKOPOULOS,Vassilios *et al.* Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature. Oxidative. **Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/3081856>. Acesso em 02 Jan 2019.

LECKER, Stewart H., GOLDBERG, Alfred L.; MITCH, William E. Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 1807–1819, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083>. Acesso em 15 jan 2019.

LIGUORI, Ilaria *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757-772, 2018. Disponível em: www.dovepress.com. Acesso em 10 Out 2018.

LIMA, Émersom Silva; ABDALLA, Dulcineia Saes Parra. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, set./dez., p. 293-303, 2001. Disponível em: www.researchgate.net. Acesso em: 21 Jan 2019.

MYOLAN, Jennifer S.; REID, Michael B. Oxidative stress, chronic disease and muscle wasting. **Muscle & Nerve**, v. 35, n. 4, p. 411-429. 2007. Disponível em

<https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1002/mus.20743>. Acesso em: 15 Mar 2019.

MARINHO, Ana Wanda Guerra Barreto *et al.* Prevalência de doença renal crônica em adultos no Brasil: revisão sistemática da literatura. **Caderno Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p- 379-388, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 01 Dez 2018.

MCCORDS, Joe M; FRIDOVICH, Irwin. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, November, p. 6049-6065, 1969. Disponível em: <http://www.jbc.org/>. Acesso em 28 Feb 2018.

MITTAL, Chandra K.; MURAD, Ferid. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: A physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n.10, p-4360-4364, 1977. Disponível em: <https://www.ncbi-nlm-nih-gov.ez51.periodicos.capes.gov.br/pmc/articles/PMC431941>. Acesso em: 03 Mar 2018.

MIRANDA-DÍAZ, Alejandra Guillermina *et al.* Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy with Early Chronic Kidney Disease. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1-7, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7047238> . Acesso em : 10 Out 2018.

MIYATA, Toshio *et al.* Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. **Kidney International**, v. 55, n. 2, p. 389-399, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00302.x>. Acesso em: 21 Jan 2019.

MITCH, W E, BAILEY, J L, GOLDBERG, A L. Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. **J Clin Invest.**, v. 93, n. 5, p. 2127-2133, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI117208>. Acesso em: 03 Jan 2019.

MITCH, William E.; GOLDBERG, Alfred L. Mechanisms of muscle wasting. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 25, p. 1897-1905, 1996. Disponível em: [www. ejm.org](http://www.nejm.org). Acesso em: 15 Jan 2019.

MOINUDDIN I; LEEHEY, DJ. A Comparison of Aerobic Exercise and Resistance Training in Patients with and Without Chronic Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 15, n. 1, p. 83-96, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2007.10.004>. Acesso em: 21 Jan 2019.

MUÑOZ, Ana *et al.* Physical Exercise Improves Aging-Related Changes in Angiotensin, IGF-1, SIRT1, SIRT3, and VEGF in the Substantia Nigra. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 00, n. 00, p. 1-8, 2018. Acesso em: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/advance-article-abstract/doi/10.1093/gerona/gly072/4969203>. Acesso em: 17 Out 2019.

MORAES, Wilson Max Almeida Monteiro *et al.* Aerobic exercise training rescues protein quality control disruption on white skeletal muscle induced by chronic kidney disease in rats. **J. Cell. Mol. Med.** v. 22, n. 3, p. 1452-1463, 2018. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/jcmm.13374>. Acesso em: 02 Dez 2018.

MIYAGI, Mariana Yasue Saito *et al.* Long-Term Aerobic Exercise Protects against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Modulating the Expression of IL-6 and HO-1. **Plos One**, v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108543>. Acesso em 10 Dez 2018.

NADER, G. A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: Getting the “AKT” together. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 10, p. 1985–1996, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.026>. Acesso em 03 Jan 2019.

NORDBERG, Jonas; ARNER, Elias S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9). Acesso em: 20 Set 2018.

O’SULLIVAN, Tom F.; SMITH, Alice C.; WATSON, Emma L. Satellite cell function, intramuscular inflammation and exercise in chronic kidney disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 11, n. 6, p. 810-821, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/ckj/article-abstract/11/6/810/5061533>. Acesso em: 17 Jan 2019.

ORGAN, J.M. *et al.* Effects of treadmill running in a rat model of chronic kidney disease. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.16, p. 19-23, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.09.001>. Acesso em: 05 Dez 2018.

PEDERSEN, Bente K.; FISCHER, Christian P. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.10, p.265–271.2007. Disponível em : <https://ovidsp.txovid.ez51.periodicos.capes.gov.br> . Acesso em 10 Mar 2019.

PETRELLA, John K. *et al.* Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, p. E937–E946, 2006. Disponível em: www.physiology.org/journal/ajpendo. Acesso em 10 Jan 2019.

POWERS, Scott K.; KAVAZIS Andreas N.; MCCLUNG Joseph M.. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, p- 2389–97, 2007. Disponível em: www.physiology.org/journal/jap by. Acesso em: 20 Nov 2018.

PUTRI, Alisia Y.; THAHA, Mochammad. Role of Oxidative Stress on Chronic Kidney Disease Progression. **Acta Medica Indonesiana**. v. 46, n. 3, p. 244-252, 2014. Disponível em: <http://www.inaactamedica.org>. Acesso em: 02 Jan 2019.

PRABHAKAR, Sharma *et al.* Diabetic Nephropathy Is Associated with Oxidative Stress and Decreased Renal Nitric Oxide Production. **American Journal Society Nephrology**, v. 18, p. 2945-2952, 2007. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov.ez51.periodicos.capes.gov.br. Acesso em: 05 Jan 2019.

PICKERING, W. P. *et al.* Nutrition in CAPD: Serum bicarbonate and the ubiquitin-proteasome system in muscle. **Kidney International**, v. 61, n. 4, p. 1286–1292, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00276.x> Acesso em 04 Jan 2019.

POWERS, Scott K.; KAVAZIS Andreas N.; MCCLUNG Joseph M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, p- 2389–97, 2007. Disponível em: www.physiology.org/journal/jappl by. Acesso em: 20 Nov 2018.

POWERS, Scott K.; SMUDERA, Ashley J.; JUDGE, Andrew R. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.15, p. 240–245, 2012. Disponível em: www.co-clinicalnutrition.com. Acesso em 04 Jan 2019.

PURINTRAPIBAN, J.; WANG, M. C.; FORSBERG, N. E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v.136, p.393–401, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00201-X) Acesso em 8 Jan 2019.

RADAK, Zsolt; CHUNG, Hae Young; GOTO, Sataro. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 153-159. 2008. Disponível em: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed Acesso em 16 Mar 2019.

REQUIÃO-MOURA, Lúcio Roberto *et al.* Lesão de isquemia e reperfusão no transplante renal: paradigmas hemodinâmico e imunológico. **Einstein**, v. 13, n. 1, p. 129-135. 2015. Disponível em <https://journal.einstein.br/pt-br/article/lesao-de-isquemia-e-reperfusao-no-transplante-renal-paradigmas-hemodinamico-e-imunologico/>. Acesso em 10 Mar 2019.

REZNICK, Abraham Z.; PACKER, Lester. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Meth Enzymol**, v.233, p. 357-63, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7). Acesso em 10 Mar 2017.

RHEE, So Yon *et al.* Intradialytic exercise improves physical function and reduces intradialytic hypotension and depression in hemodialysis patients. **The Korean Journal of Internal**, v. 25, p. 1-11, 2017. Disponível em: www.kjim.org. Acesso em: 18 Jan 2019.

ROMÃO JUNIOR, João Egidio. *Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação*. **Jornal Brasileiro Nefrologia**, v. 25, n. 3, Supl., Agosto, 2004. Disponível em: <http://www.bjn.org.br>. Acesso em: 22 Nov 2018.

SMALL, David M. *et al.* Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 17, p. 311-321. 2012. Disponível em <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x>. Acesso em 16 Mar 2019.

SERTIE, Rogério A.L. *et al.* The mechanisms involved in the increase adiposity induced by interruption of regular physical exercise practice. **Life Sciences**, v. 222, p. 103-111. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.051>. Acesso em: 30 Mar 2019.

SURESHBABU, Angara ; RYTER, Stefan W. ; CHOI Mary E. Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury. **Redox Biology**. v. 4, p. 208-14, April. 2015. Disponível em: www.sciencedirect.ez51.periodicos.capes.gov.br. Acesso em: 20 Nov 2018.

STRAUSSER, Sara A.; NAKANO, Daisuke; SOUMA, Tomokazu. Kidney injury to chronic kidney disease transition: insufficient cellular stress response. **Current Opinion Nephrology Hypertension**, v.27, n. 4, p. 314-322. 2018. Disponível em: www.co-nephrolhypertens.com. Acesso em: 20 Nov 2018.

SCHNAPER, William H. The Tubulointerstitial Pathophysiology of Progressive Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 24, n. 2, p. 107-116. 2017. Disponível em: www.sciencedirect.ez51.periodicos.capes.gov.br. Acesso em: 10 Nov 2018.

SCHNEIDER, Cláudia Dornelles; OLIVEIRA, Alvaro Reischak. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira Medicina Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-3013. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbme/v10n4/22047.pdf>. Acesso em: 25 Maio 2019.

STEVENS, Lesley A.; LEVEY, Andrew S. Measurement of Kidney Function. **The Medical Clinics of North America**, v. 89, p. 457-473. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.11.009>. Acesso em: 25 May 2019.

SMALL, David. M. *et al.* Effects of exercise and lifestyle intervention on oxidative stress in chronic kidney disease. **Redox Report**, v. 22, n. 3, p. 127–136, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1276314>. Acesso em: 21 Nov 2018.

STEVENS, Lesley A.; VISWANATHAN, Gautham; WEINER, Daniel E. Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the elderly population: current prevalence, future projections, and clinical significance. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 17, p. 293-301, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2010.03.010> Acesso em: 23 Nov 2018.

SHARFUDDIN, Asif A.; MOLITORIS, Bruce A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 4, p. 189-200, 2011. Disponível em: www-nature.ez51.periodicos.capes.gov.br Acesso em: 23 Nov 2018.

SALVADORI, Maurizio; ROSSO, Giuseppina, BERTONI, Elisabetta. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. **World Journal Transplantation**, v. 24, n. 2, p. 52-67, June, 2015. Disponível em: www.wjgnet.com Acesso em: 23 Nov 2018.

SARIC, Tomo; GRAEF, Claudia I.; GOLDBERG, Alfred L. Pathway for Degradation of Peptides Generated by Proteasomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46723–46732, 2004. Disponível em: <http://www.jbc.org/>. Acesso em 15 Jan 2019.

SAKKAS, Giorgos K. *et al.* Changes in muscle morphology in dialysis patients after 6 months of aerobic exercise training. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 9, p. 1854-61, 2003. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1093/ndt/gfg237>. Acesso em: 15 Ago 2019.

STENVINKEL, Peter *et al.* Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. **Kidney International**, v. 55, p. 1899-1911, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00422.x>. Acesso em: 02 Jan 2019.

SCHAFER, Freya Q.; BUETTNER, Garry R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4) Acesso em: 10 Out 2018.

SCOTT, K.; POWERS, Andreas N.; DERUISSEAU, Keith C.. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, p. R337–R344, 2005. Disponível em: www.physiology.org/journal/ajpregu. Acesso em: 18 Jan 2019.

SIEMS, W.; CAPUOZZO, E.; LUCANO, A.; SALERNO, C.; CRIFO, C. High sensitivity of plasma membrane ion transport ATPases from human neutrophils towards 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal. **Life Sci**, v.73, p.2583–2590, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00661-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00661-1). Acesso em: 8 Jan 2019.

SLOCUM Jessica L; HEUNG Michael; PENNATHUR, Subramaniam . Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine ?. **Transl Res**, v. 159, n. 4, p. 277-289, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.014>. Acesso em 20 Dez 2018.

SUN, Di Fei *et al.* Chronic Uremia Attenuates Growth Hormone–Induced Signal Transduction in Skeletal Muscle. **J Am Soc Nephrol** 15: 2630–2636, 2004. Disponível em: <https://jasn.asnjournals.org>. Acesso em 10 Jan 2019.

TAK YEE, Xiaoqin Shan; JONES, Dean P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov.ez51.periodicos.capes.gov.br/pubmed/2195557. Acesso em 25 Jun 2018.

TUCKER, Patrick S.; SCANLAN, Aaron T.; DALBO, Vincent J. Chronic Kidney Disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-8, 2015. Disponível em: www.hindawi.com/journals/omcl/2015/806358/. Acesso em: 10 Nov 2018.

THOMPSON, RH *et al.* The Impact of Ischemia Time During Open Nephron Sparing Surgery on Solitary Kidneys: A Multi-Institutional Study. **The Journal of Urology**, v. 177, p. 471-476. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.09.036>. Acesso em: 10 Nov 2017.

TUCKER, Patrick S.; SCANLAN, Aaron T.; DALBO, Vincent J. Chronic Kidney Disease Influences Multiple Systems: Describing the Relationship between Oxidative Stress, Inflammation, Kidney Damage, and Concomitant Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, ID 806358. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/806358>. Acesso em: 10 Out 2018.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, v.27, p.502-522, 1969. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5). Acesso em: 10 Mar 2017.

TOGOE, Eliane B *et al.* Borges JHS, Saturnino KC. Animal model of chronic kidney disease using a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion in White New Zealand rabbits. **Acta Cir Bras**, v.29, n. 10, p. 651-7, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-8650201400160005>. Acesso em: 10 Jan 2016.

VENKATACHALAM, Manjeri A. *et al.* Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, p. 1765–76. 2015. Disponível em: www.jasn.org. Acesso em 20 Nov 2018.

VOLKER, Vallon. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. **American Journal of Physiology**, v. 300, p. 1009–1022, 2011. Disponível em: www.physiology.org/journal/ajpregu. Acesso em: 18 Fev 2018.

VALKO, Marian *et al.* Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37–56, 2004. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15646026. Acesso em: 10 Jun 2018.

VALKO, Marian *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>. Acesso em: 10 Out 2018.

VOEHRINGER, D. W. *et al.* Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 14, n 97, p. 2680-2685, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15989/>. Acesso em 10 Out 2018.

VINCENT, Heather K.; INNE, Kim E.; VINCENT; Kevin R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, p. 813-839, 2007. Disponível em: Acesso em : 02 Jan 2019.

WILLIAMS, Andrew D.; FASSETT; Robert G.; COOMBES, Jeff S. Exercise in CKD: Why Is It important and How Should It Be Delivered? **American Journal Kidney Disease**, v 64, n 3, p.329-331, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.06.004>. Acesso em: 21 Nov 2018.

WIEZEL, D. *et al.* Impaired renal growth hormone JAK / STAT5 signaling in chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 29, n. 4, April , p. 791-799, 2014. Disponível em: <https://doi-org.ez51.periodicos.capes.gov.br/10.1093/ndt/gfu003>. Acesso em: 03 Jan 2019.

WORKENEH, B. T. *et al.* Development of a Diagnostic Method for Detecting Increased Muscle Protein Degradation in Patients with Catabolic Conditions. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 17, n. 11, p. 3233–3239, 2006. Disponível em: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2006020131>. Acesso em: 04 Jan 2019..

WANG, Xiaonan H; MITCH, William E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. **Nat. Rev. Nephrol**, v. 10, p. 504-516, 2014. Disponível em: www.nature.com/nrneph. Acesso em 15 Jan 20189.

WANG, Xiaonan H. *et al.* Caspase-3 Cleaves Specific 19 S Proteasome Subunits in Skeletal Muscle Stimulating Proteasome Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21249-21257, 2010. Disponível em: <http://www.jbc.org/>. Acesso em 15 Jan 2019.

WILLIAMS AD, FASSETt RG; COMBEES, Jeff. Exercise in CKD: Why Is It important and How Should It Be Delivered? **Am J Kidney Dis**, v. 64, n. 3, p. 329-331.2014. Disponível em: www.sciencedirect.ez51.periodicos.capes.gov.br. Aceso em 18 Jan 2019.

WATSON, Emma L. *et al.* Progressive Resistance Exercise Training in CKD: A Feasibility Study. **Am J Kidney Dis.**, v. 66, n. 2, p. 249-257, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.10.019>. Acesso em: 22 Jan 2019.

WYNGAERT, Karsten Vanden *et al.* The effects of aerobic exercise on eGFR, blood pressure and VO2peak in patients with chronic kidney disease stages 3-4: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v.13, n. 9, p. 1-19, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203662>. Acesso em: 30 Nov 2018.

WALDMAN, Brian M *et al.* Effects of voluntary exercise on blood pressure, angiotensin II, aldosterone, and renal function in two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Integrated Blood Pressure Control**, v.10, p. 41-51, 2017. Disponível em: <https://www.dovepress.com>. Acesso em: 30 Sep 2018.

WORKENEH, Biruh; MITCH, William E. Review of muscle wasting associated with chronic kidney disease. **Am J Clin Nutr**, v. 91, p. 1128S-32S, 2010. Disponível em: www.ajcn.org. Acesso em: 30 Jun 2018.

WANG, Xiaonan H.; MITCH, William E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. **Nat Rev Nephrol**, v.10, n 9, p. 504-516, 2014. Disponível em: www-nature.ez51.periodicos.capes.gov.br. Acesso em: 10 Nov 2018.

YANG, Li *et al.* Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. **Nature Medicine**, v. 16, N. 5, p- 535-43. 2010. Disponível em: www-nature.ez51.periodicos.capes.gov.b. Acesso em: 15 Nov 2018.

YOSHIDA, Takuya *et al.* Effect of endurance training and branched-chain amino acids on the signaling for muscle protein synthesis in CKD model rats fed a low-protein diet. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.313, p. F805–F814, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00592.2015>. Acesso em 05 Dez 2018.

ZHANG, Liping *et al.* Satellite Cell Dysfunction and Impaired IGF-1 Signaling Cause CKD-Induced Muscle Atrophy. **J Am Soc Nephrol**, v. 21, p. 419–427, 2010. Disponível em: www.jasn.org. Acesso em : 05 Jan 2019.

ZAMMIT, Peter S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 72, p. 19-32, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.011>. Acesso em 10 Jan 2019.

APÊNDICE: Artigo

MUSCLE CHANGES WITH HIGH-INTENSITY AEROBIC TRAINING IN AN ANIMAL MODEL OF RENAL DISEASE¹

Muscle Changes With High-Intensity Aerobic Training In An Animal Model Of Renal Disease

Eliane Barbosa Togoe^{II}, Landara Schettert Silva^{III}, Juliana Loprete Cury^{III}, Flavia Alessandra Guarnier^{IV}

I Ph.D. student of the Health and Development Program of the Center-West Region of the Universidade Federal do Mato Grosso do Sul–UFMS. Study planning and design; data acquisition, analysis, and interpretation; technical procedures; preparation and writing of the manuscript; critical review of the manuscript.

II Ph.D., Associate Professor of the School of Medicine, Health, and Development Program of the Central-West Region of UFMS. Study planning and design; data acquisition; technical procedures; critical review of the manuscript.

III Ph.D., Associate Professor of the Centro Universitário da Grande Dourados–UNIGRAN. Study planning and design; data analysis, and interpretation; preparation and writing of the manuscript; critical review of the manuscript.

IV Ph.D., Associate Professor, Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual de Londrina–UEL. Technical procedures; Histopathological examinations; data analysis and interpretation.

ABSTRACT

Objective: To analyze the muscle changes with high-intensity aerobic training (HIAT) in an animal model of renal disease (RD).

Methods: 21 adult Wistar rats were divided into 3 groups: healthy sedentary (HS), RD sedentary (RDS), RD aerobic training (RDAT). RDS and RDAT were subjected to unilateral renal ischemia-reperfusion (10 min) and 21days after that, RDAT was subjected to 6 weeks HIAT (swimming). Serum creatinine (Cr) and muscle morphometry (cross-sectional area = CSA) of gastrocnemius were analyzed.

Results: Cr was higher ($p = 0.0053$) in RDS (0.82 ± 0.04) than in the others (RDAT 0.55 ± 0.04 ; HS 0.55 ± 0.04). Morphometric analysis (class interval of CSA in μm^2 /absolute frequency of muscle fibers in each class) indicated that 50th percentile occurred in: HS 7th class (3000.00–3499.00/515), RDS, 8th class (3500.00–3999.00/484), RDAT 5th class (2000.00–2499.00/856). CSA of largest fibers in RDS, RDAT, HS was $9953.00 \mu\text{m}^2$, $9969.00 \mu\text{m}^2$, $11228.00 \mu\text{m}^2$, respectively. High frequency of fibers with lower CSA occurred in 4th, 5th, 6th and 7th class in RDA, absence of fibers into 22nd, 23rd classes (RDS and RDAT).

Conclusion: HIAT in an animal model of RD resulted in increased the number of muscle fibers with smaller CSA.

Keywords: Renal Disease, Muscle Atrophy, Aerobic Exercise.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a remarkable public health concern associated with an increased risk of mortality and comorbidities. It is estimated that 10%–15% of the general population is affected by CKD worldwide¹.

Ischemia-reperfusion (IR) injury is the leading cause of CKD. In the kidneys, IR injury leads to acute and chronic complications that result in deficits in renal function and increased serum creatinine (Cr) levels due to a decrease in the glomerular filtration rate (GFR).²

The GFR is used to classify renal disease (RD) in five stages (1–5) according to the degree of impairment of the kidneys. However, this classification does not provide parameters for assessing the functional effects on the other systems affected in the early stages of CKD development. The reduction in renal function leads to retention of uremic solutes, which causes inflammation, oxidative stress, and insulin resistance, thereby promoting the loss of muscle mass. Muscle atrophy is associated with cardiovascular disease, metabolic changes, and reduced physical function and balance, strongly impacting the quality of life and disease progression.³

Therapeutic strategies that help reduce the loss of muscle mass in CKD have been proposed, including aerobic training (AT). AT reduces the symptoms of uremia, inflammation, and oxidative stress markers, and improves skeletal muscle function, exercise capacity, and the quality of life of individuals. However, the effect of aerobic exercises depends on the load, type, and level of training.⁴

Analyzing the impact of AT on skeletal muscle is not feasible in clinical practice because it increases the complexity of the routine of renal patients. Therefore, animal models of disease are necessary to evaluate variables which cannot be adequately assessed in humans. This study aimed to analyze the muscle changes with HIAT in an animal model of RD.

METHODS

This study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Universidade Federal do Mato Grosso–UFMS) under Protocol No. 735/2015.

Twenty-one albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 53 days and weighing 200–250 g were obtained from the UFMS animal facility. The animals were reared in cages lined with wood shavings, with four to five animals per cage, under controlled temperature (approximately 22°C) and a light-dark cycle of 12/12h, with free access to water and commercial feed. The animals were randomly divided into three groups: a healthy sedentary (HS) group, rats with RD and sedentary (RDS), and rats with RD and subjected to AT (RDAT). The animals in the RDS and RDAT groups underwent surgery as per an IR procedure for induction of RD. The HS group was not subjected to surgery and received daily care.

The surgical protocol was performed under aseptic conditions according to the methodology proposed by Bazzano *et al.*⁵ The animals were anesthetized with intraperitoneal 10% ketamine (50–100 mg/kg) and xylazine (1–5 mg/kg). Next, the animals were subjected to left flank laparotomy to locate the left kidney, which was externalized to remove the perirenal fat and isolate the pedicle. The renal artery and vein were clamped with non-traumatic forceps for 10 min and, during this period, ischemia was visually confirmed by a color change in the organ. After releasing the forceps, renal reperfusion occurred and was visually confirmed by the return of the initial and natural color of the organ. Hemostasis was achieved, the kidney was repositioned, and the incision was closed in planes using 4-0 mononylon. In the immediate postoperative period, flunixin meglumine (2.5 mg/kg) was subcutaneously administered, and the animals were continuously monitored.

After 21 days of surgery, the RDAT group initiated its adaptation to an AT (swimming) protocol for 7 days; they gradually performed exercises without a working load until completing 30 min of swimming. The exercises were performed in 100-L tanks (75 × 85 × 40 cm³) at a temperature of 28°C–32°C.

After the 7-day adaptation period, the RDAT group was subjected to a high-intensity AT (HIAT) protocol. To determine the maximum training load, the animals were subjected to an incremental exercise test according to the protocol described by Cunha *et al.*⁶ In this test, the rats were required to swim with an initial load corresponding to 1% of the body mass (BM) using pieces of lead of different sizes and weights to reach the weight appropriate for the exercise. The weights were attached to the distal part of the tail of the animals with hypoallergenic adhesive tape. The animals were removed from the water at every 3 min of swimming and rest for 1 min,

and the exercise load was increased by 1% of the BM. This cycle was repeated until the animals reached exhaustion.

In the HIAT protocol, the training load was 85% of the maximum load achieved in the incremental test, and this value corresponded to 4.5% of the BM. The maximum load was adjusted weekly according to the BM of each animal. The weights and modes of attachment of the weights to the animals were the same as those used in the incremental test protocol. HIAT was performed five times a week for 6 weeks, and each training session lasted an average of 30 min. At the end of the protocol, the incremental test was performed again in the same manner as the initial test. The groups HS and RDS remained sedentary under daily care until the end of the training period of the RDAT group, when euthanasia was performed.

All animals were subjected to euthanasia by an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine, both at 100 mg/kg. Laparotomy and exsanguination were performed by puncture of the hepatic portal vein. Blood samples were collected for biochemical analysis, and right gastrocnemius muscle samples were collected for morphometric analysis.

To measure serum creatinine, samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min using an automatic refrigerated centrifuge (Sorvall, Suwanee, USA) for serum separation. The serum was kept under refrigeration (2°C–8°C) and later assayed using the UV enzymatic method.

The cross-sectional area (CSA) of gastrocnemius muscle fibers was used to establish a histological parameter of muscle adaptation to AT according to the method described by Brunnquell *et al.*⁷ Muscle samples were collected and fixed in methanol and glacial acetic acid (3:1, v/v) for 70 min and embedded in paraffin. Each specimen was fixed on separate slide. Semi-serial sections (5- μ m thickness, five sections per slide, and a 50- μ m interval between sections) of each specimen were stained with hematoxylin and eosin. In CSA analysis, images of the tissue sections were not labeled to blind the examiner to group allocation. Five fields were captured per section on each slide, and 25 muscle fibers were measured per field, resulting in approximately 625 measurements per animal using an optical microscope (100 $\times$ magnification) coupled to a high-resolution camera. The images were analyzed using the Image Pro-Plus software version 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), and the CSA was measured in square micrometers.

The results of weight, maximum load, and serum creatinine levels are presented as mean and standard error of the mean. Two-way ANOVA repeated measure with Tukey's post-hoc test was used for the statistical analysis of weight (group factor, time factor and interaction). One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test was used for the statistical analysis of serum creatinine. Paired Student's *t*-test was used for analyzing the maximum training load. Muscle morphometry data show the measurement of the CSA of the muscle fibers (in μm^2) and were organized in absolute frequency of occurrence divided in class interval (with 500.00 μm^2 each), totalizing 24 classes from 0 to 11500.00 μm^2 and presented as histograms. P-values of <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The results of comparison of body weight, maximum load in incremental tests, and serum creatinine levels in the study groups are shown in Table 1.

Table 1. Body weight, maximum load, and serum creatinine levels in the study groups.

	HS	RDS	RDAT
Initial weight (g)	202.00 $\pm$ 4.44	204.00 $\pm$ 3.92	241.00 $\pm$ 5.88 ^a
Pre-training weight (g)	321.00 $\pm$ 4.26	359.00 $\pm$ 5.45 ^b	302.00 $\pm$ 6.10
Final weight (g)	418.00 $\pm$ 15.94	453.00 $\pm$ 6.19 ^c	399.00 $\pm$ 6.97
Δ weight (g)	215.00 $\pm$ 15.05 ^d	249.00 $\pm$ 19.49 ^{d,e}	158.00 $\pm$ 4.61 ^d
Maximum pre-exercise load (g)	_____	_____	19.72 $\pm$ 0.32
Maximum post-exercise load (g)	_____	_____	24.98 $\pm$ 1.16*
Serum creatinine (mg/dL)	0.55 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.04 [#]	0.55 $\pm$ 0.04

HS: healthy sedentary group, RDS: renal disease sedentary group, RDAT: renal disease group. Δ weight = final weight– initial weight. All variables are shown as mean $\pm$ SE. Weight variables analysis - Two-Way ANOVA repeated measure with Tukey's post-hoc test ($p < 0.0001$ for time factor, $p < 0.004$ for group factor and $p < 0.0001$ for interaction) – Significant Tukey's post hoc test: ^a Initial weight $p < 0.01$ comparing HS x RDAT and $p < 0.05$ comparing RDS x RDAT; ^b Pre-training weight $p < 0.05$ comparing HS x RDS and $p < 0.001$ comparing RDS x RDAT; ^c Final weight $p < 0.05$ comparing HS x RDS and $p < 0.001$ comparing RDS x RDAT; ^d Δ weight $p < 0.001$ comparing intra group; ^e Δ weight $p < 0.01$ comparing between groups HS x RDS and RDS x RDAT. [#] One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test:

$p < 0.05$ comparing HS x RDS and RDS x RDAT. * Paired Student's *t*-test: $p < 0.05$ comparing with maximum pre-exercise load.

The analysis of the incremental test results indicated a significant increase in the maximum load ($p = 0.008$) in the RDAT group at the end of the training period, with an increase of 26.67% in the final maximum load, and this result was compatible with the adopted training protocol.

Serum creatinine is a marker of renal function and was higher ($p = 0.0053$) in the RDS group than in the other two groups. Nonetheless, there was no significant difference in serum creatinine between the HS and RDAT groups, which demonstrated that HIAT protected renal function.

The analysis of body weight shows that RDAT group presented significantly higher weight than the other groups at the beginning of the experiment, even though they were animals of the same age, from the same brood under the same daily care. All groups gained weight throughout the experiment as expected by the effect of growth and age. At the pre-training moment and at the end of the experiment the RDS group presented significantly higher body weight than the other groups. The RDAT group presented lower total weight and lower weight variation than RDS group at the end of the experiment but did not differ significantly from the HS group. This fact may be related to the reduction of renal function that results in fluid retention and can also be associated with the accumulation of body fat secondary to sedentarism. This effect was not observed in the RDAT group submitted to HIAT.

The frequency distribution of the CSA of gastrocnemius muscle fibers was significantly different between the groups (Figure 1). The 50th percentile of CSA occurred in the seventh class (3000.00–3499.00 μm^2) in the HS group, eighth class (3500.00–3999.00 μm^2) in the RDS group, and fifth class (2000.00–2499.00 μm^2) in the RDAT group. The cumulative number of muscle fibers in the 50th percentile in the groups HS, RDS, and RDAT was 515, 484, and 856, respectively. There was an increase in the frequency of observations of muscle fibers with smaller CSA in the RDAT group (4th, 5th, 6th and 7th class) and an absence of observation of muscle fibers with larger CSA (22nd and 23rd classes) in the RDS and RDAT groups. The CSA of largest muscle fibers observed in the RDS group was 9954.00 μm^2 (belonging to 21th class), 9969.00 μm^2 (belonging 21th class) in the RDAT group and 11228.00 μm^2 (belonging to 23th class) in HS group.

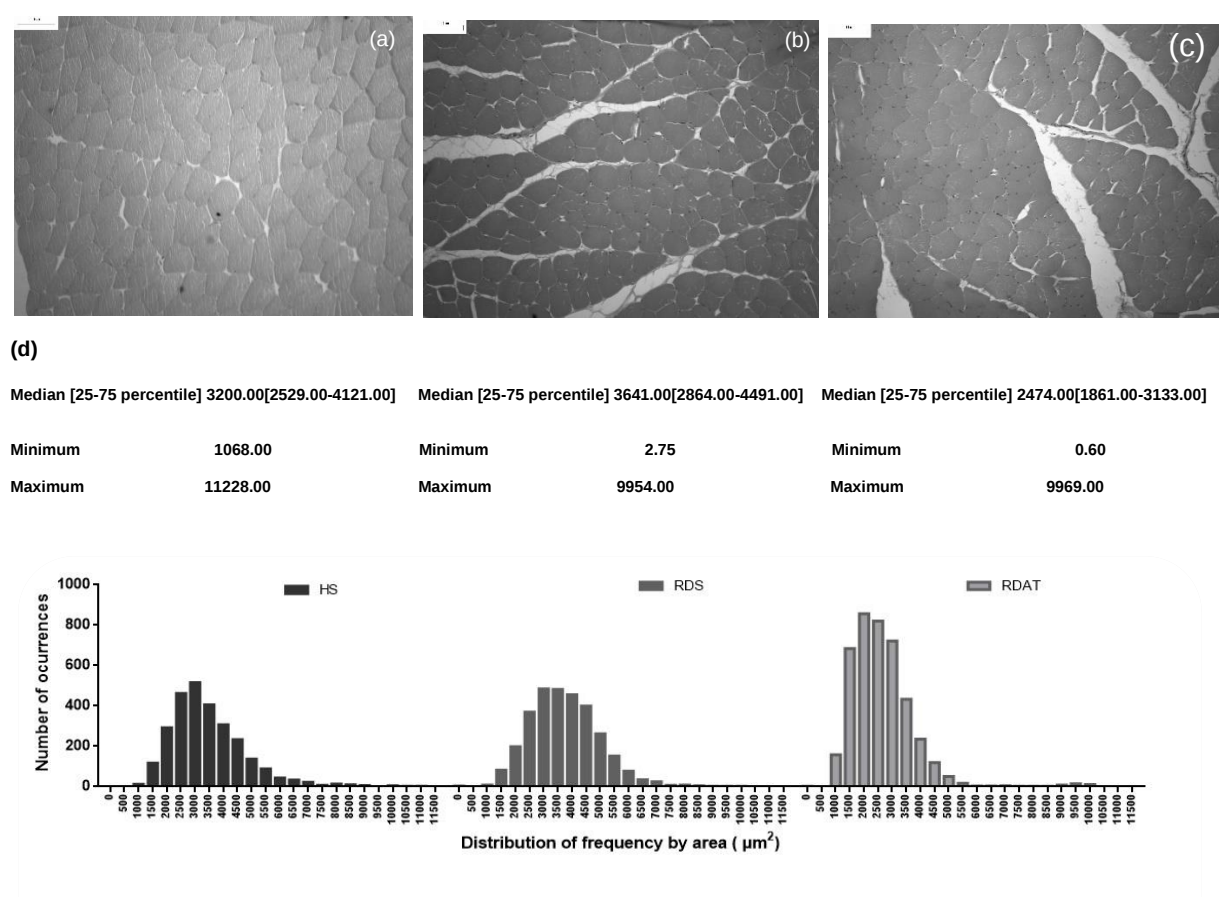


Figure 1. Histological and morphometric differences in the gastrocnemius muscle into study groups. a) healthy sedentary (HS); b) renal disease sedentary (RDS; c) renal disease aerobic training (RDAT); d) histogram of the frequency distribution of the cross-sectional area of the muscle fibers (μm^2). Median values (25–75 percentile) and minimum and maximum values were added in the graph to indicate the changes. 100× magnification.

DISCUSSION

Aerobic exercise has been shown to have several benefits, including improvement in physical capacity, cardiovascular function, and metabolic regulation⁸. In this study, the effect of HIAT on muscle tissue was assessed in an animal model of RD.

HIAT (swimming) improved exercise capacity in trained rats with RD by significantly increasing the maximum load supported during effort at the end of the

training period. AT can reduce the effect of uremia on muscle tissue and increase muscle function, consequently improving exercise tolerance⁹.

The RDS group represented the progression of RD after 80 days of 10-min unilateral renal IR procedures. These animals exhibited significant changes in Cr levels relative to the other groups. Renal IR causes local and systemic changes as a consequence of oxidative stress, and it is well documented that acute kidney injury promotes changes in the kidneys that lead to acute renal failure and subsequent CKD to some degree due to oxidative stress during IR injury¹⁰. Oxidative stress plays an essential role in CKD progression because of the significant oxidation of proteins, carbohydrates, and lipids, leading to lipid peroxidation and the accumulation of glycation products that damage tissues, causing inflammation, endothelial lesion, glomerular lesion, and further renal ischemia, leading to severe damage to the renal environment¹¹.

Another contributing factor in this context is the structural and functional changes that occur in kidneys subjected to unilateral IR procedures for short periods. Bazzano *et al.*⁵ observed that 10-min unilateral renal IR in rats worsened urinary parameters (protein, urea, glucose, fractional excretion of potassium and urea, creatinine clearance, and activity of alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase) 21 days after injury. Togoe *et al.*¹² found that 20-min unilateral renal IR in rabbits led to histopathological lesions of the renal tissue and increased serum creatinine 80 days after injury. The creatine results in our study are consistent with those reported by Bazzano *et al.* and demonstrate that IR episodes, even for a few minutes, damage the kidneys and result in progressive RD. Slocum *et al.*¹³ reported that after an abrupt decrease in the GFR (by minimum 30%), the increase in serum creatinine is delayed by days. The serum creatinine levels found in the RDS group demonstrate the progression of renal injury over time.

The lower serum creatinine detected in the RDAT group may be related to the effect of exercise on the sympathetic nervous system (SNS). The SNS is hyperactive in the early stages of CKD, causing changes in the tubular structure and stimulating the renin-angiotensin system, thereby leading to renal vasoconstriction, decreased blood flow, and reduction in GFR¹⁴. Aerobic exercise can restore SNS hyperactivity, suppress the renin-angiotensin system, increase blood volume, and consequently increase renal blood flow at rest and exercise, and ultimately reduce renal ischemia¹⁵.

Waldman *et al.*¹⁶ observed that hypertensive rats subjected to running exercise exhibit sympathetic inhibition, lower excretion of aldosterone, and consequently lower blood pressure; however, renal function was not affected. Munõz *et al.*¹⁷ found that aerobic exercise decreased the expression of angiotensin II receptors, suppressed the pro-inflammatory and pro-oxidant system, and reduced renal damage. Therefore, HIAT may help delay the progression of CKD by a direct effect on the sympathetic innervation of the kidneys and the consequent maintenance of the GFR, and this new hypothesis should be investigated because it may prevent the development of RD.

The body weight analysis suggest that having a renal disease and being sedentary contribute to weight gain due to fluid retention caused by a decrease in renal function added an increased of body fat secondary to sedentary lifestyle. This is reinforced by the results of lower final weight and lower weight variation found in the RDAT group when compared to the RDS group, without significant difference between RDAT and HS groups, and show the positive effects of physical exercise on renal function (discussed previously) and body composition, because HIAT increases energy expenditure which can justify the change in body composition. The literature shows that these effects are physical exercise intensity dependent and related to the release of catecholamines, growth hormone, oxygen consumption after exercise, lipoprotein lipase activity and improvement of the insulin response that usually affect the mobilization of triacylglycerol and in the oxidation rate, resulting in reduction of fat mass¹⁸.

The morphometric analysis of the gastrocnemius muscle indicated that there was a decrease in the number of muscle fibers of larger CSA in rats with RD (RDS and RDAT) compared with that in the HS group. The RDAT group had a higher number of fibers of smaller CSA than the other groups. The morphometric changes in the RDS group indicated that muscle remodeling occurred in this group secondary to renal injury, which shows the occurrence of early muscle impairment even in cases of mild CKD. Considering that skeletal muscle is the main protein storage tissue in the body, the morphometric results suggest a significant reduction in contractile proteins due to an increase in muscle catabolism and/or decrease in muscle anabolism in RD¹⁹.

Muscular atrophy in CKD is primarily caused by the activation of protein catabolism. The uremic state, metabolic acidosis, inflammation, and oxidative stress activate mechanisms that stimulate protein catabolism. These changes lead to decreased proliferation and differentiation of satellite cells, insulin resistance, and

activation of inhibitory factors of muscle tissue growth. These factors stimulate proteolysis via caspase 3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to muscle atrophy²⁰.

HIAT did not attenuate the loss of muscle fibers of larger CSA in the RDAT group. However, there was a higher number of muscle fibers of smaller CSA, of fourth to seventh class, indicating the adaptation of muscle fibers to HIAT. Sakas *et al*²¹ have shown that the gastrocnemius muscle is composed of 55% type I (slow/oxidative) fibers and 45% type II (fast/glycolytic) fibers, and muscle atrophy in CKD affects both fiber types but predominantly IIa and IIx fibers, with a decrease in capillarization. The authors observed that AT promoted an increase in all fiber types in the gastrocnemius muscle.

The increased number of muscle fibers with smaller CSA may be related to the remodeling of type I fibers. Lepsen *et al*.²² reported that AT stimulated the adaptation of muscle fibers to a more oxidative phenotype. However, the confirmation of this hypothesis requires specific morphological analysis of muscle tissue.

Knopka *et al*²³ argue that HIAT induces hypertrophy of muscle fibers I and IIa by regulating proteolytic mechanisms and increasing protein synthesis. The pathways involved in aerobic exercise-induced muscle hypertrophy include the upregulation of myostatin mRNA expression (satellite cell inhibitor), upregulation of the expression of PGC-1 coactivators, which control mitochondrial function, an increase in protein metabolism with concomitant reduction in catabolic factors, and an increase in muscle growth factors.

The levels of pro-inflammatory cytokines (IL6, TNF- α , and C-reactive protein) are increased in CKD, which stimulate the breakdown of muscle proteins. Moraes *et al*.⁹ demonstrated that aerobic exercise attenuated muscle apoptosis via Akt signaling, reduced protein changes, thereby preventing proteotoxicity, and reduced cellular stress induced by chronic uremia.

Cardoso *et al*.²⁴ observed that high-intensity swimming exercise increased antioxidant levels in rats and prevented the increase in inflammatory markers. Miyagi *et al*.²⁵ found that aerobic exercise reduced the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in rats with RD, thereby modulating the inflammatory response. These mechanisms may explain our results and will be analyzed in future studies.

Yoshida *et al*²⁶ subjected rats with RD to AT for 5 weeks and found no significant differences in the CSA of muscle fibers or changes in protein synthesis and

degradation. Organ *et al.*²⁷ demonstrated that aerobic exercise in rats with RD increases skeletal muscle catabolism via the upregulation of the atrogin-1 gene and increase in ubiquitination, without a concomitant increase in protein synthesis and the inadequate activation of satellite cells. Nonetheless, the effect of AT on RD remains controversial and needs to be further investigated.

Our results indicate that AT protected the kidneys, did not reverse the atrophy of muscle fibers of higher CSA, but increased the number of fibers of smaller CSA in the training group. These results are not conclusive but suggest that HIAT can be used to delay the loss of muscle mass in CKD because this complication occurs early and decreases the quality of life of the individual. However, biochemical analysis of specific markers should be performed to support the use of HIAT as a strategy to minimize the loss of muscle mass in RD.

CONCLUSION

The results demonstrated that HIAT in an animal model of RD increased the number of muscle fibers of smaller CSA.

REFERENCES

- 1- Levin A, Tonelli M, Bonventre J, Coresh J, Donner J, Fogo AB, Fox CS, Gansevoort RT, Heerspink HJL, Jardine M, Kasiske B, Köttgen A, Kretzler M, Levey AS, Luyckx VA, Mehta R, Moe O, Obrador G, Pannu N, Parikh CR, Perkovic V, Pollock C, Stenvinkel P, Tuttle KR, Wheeler DC, Eckardt KU. Review Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet*. 2017 Oct 21; 390(10105):1888–917. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30788-2.
- 2- Huang H, Dullemen LFAV, Akhtar MZ, Faro MLL, Yu Z, Valli A, Dona A, Thézénas ML, Charles PD, Fischer R, Kaiser M, Leuvenink HGD, Ploeg RJ, Kessler BM. Proteo-metabolomics reveals compensation between ischemic and non-injured contralateral kidneys after reperfusion. *Sci Rep*. 2018 Jun 4; 8(1):1–12. doi: 10.1038/s41598-018-26804-8

- 3- Harada K, Suzuki S, Ishii H, Aoki T, Hirayama K, Shibata Y, Negishi Y, Sumi T, Kawashima K, Kunimura A, Shimbo Y, Tatami Y, Kawamiya T, Yamamoto D, Morimoto R, Yasuda Y, Murohara T. Impact of Skeletal Muscle Mass on Long-Term Adverse Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease. *Am J Cardiol.* 2017 Apr 15; 119(8): 1275–80. doi: 10.1016/j.amjcard.2017.01.003.

- 4- Gollie JM, Harris-Love MO, Patel SS, Sholey Argani S. Chronic kidney disease : considerations for monitoring skeletal muscle health and prescribing resistance exercise. *Clin Kidney Journal.* 2018 Dec; 11(6): 822–31. doi: 10.1093/ckj/sfy054

- 5- Bazzano T, Restel TI, Porfirio LC, Souza AS, Silva IS. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal. *Acta Cir Bras.* 2015 Apr; 30(4): 277–88. doi: 10.1590/S0102-865020150040000007

- 6- Cunha RR, Cunha VN, Segundo PR, Moreira SR, Kokubun E, Campbell CS, Oliveira RJ, Simões HG. Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. *Cell Biochem Funct.* 2009 Aug; 27(6): 351-7. doi: 10.1002/cbf.1580.

- 7- Brunnquell CR, Vieira NA, Sábio LR, Sczepanski F, Cecchini AL, Cecchini R, Guarnier FA. Oxidative and proteolysis-related parameters of skeletal muscle from hamsters with experimental pulmonary emphysema : a comparison between papain and elastase induction. *Int J Exp Pathol.* 2015 Jun; 96(3): 140-50. doi: 10.1111/iep.12121.

- 8- Ali BH, Karaca T, Al Suleimani Y, Al Za'abi M, Al Kalbani J, Ashique M, Nemmar A. The effect of swimming exercise on adenine-induced kidney disease in rats, and

the influence of curcumin or lisinopril thereon. PLoS One. 2017 Apr 26; 12(4): 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0176316.

9- De Moraes WMAM, de Souza PRM, da Paixão NA, de Sousa LGO, Ribeiro DA, Marshall AG, Prestes J, Irigoyen MC, Brum PC, Medeiros A. Aerobic exercise training rescues protein quality control disruption on white skeletal muscle induced by chronic kidney disease in rats. J Cell Mol Med. 2018 Mar; 22(3): 1452–63. doi: 10.1111/jcmm.13374

10- Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease : an emerging threat to patient outcome. Nephrol Dial Transplant. 2003 Jul; 18(7): 1272-80. PMID:12808161.

11- Krata N, Zagożdżon R, Foronczewicz B, Mucha K. Oxidative Stress in Kidney Diseases : The Cause or the Consequence ? Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2018 Jun; 66(3): 211-20. doi: 10.1007/s00005-017-0496-0.

12- Togoe EB, Silva IS, Cury JL, Souza AS, Borges JHS, Saturnino KC. Animal model of chronic kidney disease using a unilateral technique of renal ischemia and reperfusion in White New Zealand rabbits. Acta Cir Bras. 2014 Oct; 29(10): 651-7. PMID:25317997.

13- Slocum JL, Heung M, Pennathur S. Marking renal injury: can we move beyond serum creatinine ?. Transl Res. 2012 Apr; 159(4): 277-89. doi:10.1016/j.trsl.2012.01.014

14- Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, Arenare F, Volpe M, Furiani S, Dell'Oro R, Mancia G. Early Sympathetic Activation in the Initial Clinical Stages of Chronic

Renal Failure. Hypertension. 2011 Apr; 57(4): 846-51.
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164780

- 15-Vanden Wyngaert K, Van Craenenbroeck AH, Van Biesen W, Dhondt A, Tanghe A, Van Ginckel A, Celie B, Calders P. The effects of aerobic exercise on eGFR, blood pressure and VO₂ peak in patients with chronic kidney disease stages 3-4 : A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2018 Sep 11; 13(9): 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0203662.

- 16- Waldman BM, Augustyniak RA, Chen H, Rossi NF. Effects of voluntary exercise on blood pressure, angiotensin II, aldosterone, and renal function in two-kidney, one-clip hypertensive rats. Integr Blood Press Control. 2017 Nov 29; 10: 41-51. doi: 10.2147/IBPC.S147122.

- 17-Muñoz A, Corrêa CL, Lopez-Lopez A, Costa-Besada MA, Diaz-Ruiz, Labandeira-Garcia JL. Physical Exercise Improves Aging-Related Changes in Angiotensin, IGF-1, SIRT1, SIRT3, and VEGF in the Substantia Nigra. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2018 Nov 10; 73(12):1594-601. doi: 10.1093/gerona/gly072.

- 18-Sertie RAL, Curi R, Oliveira AC, Andreotti S, Caminhotto RO, de Lima TM, Proença ARG, Reis GB, Lima FB. The mechanisms involved in the increased adiposity induced by interruption of regular physical exercise practice. Life Sci. 2019 Apr; 222:103-111. doi: 10.1016/j.lfs.2019.02.051

- 19-Workeneh BT, Mitch WE. Review of muscle wasting associated with chronic kidney disease. Am J Clin Nutr. 2010 Apr; 91(4): 1128–32. doi: 10.3945/ajcn.2010.28608B

- 20-Wang XH, Mitch WE. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease.

Nat Rev Nephrol. 2014 Sep;10(9): 504-16. doi: 10.1038/nrneph.2014.112.

- 21- Sakkas GK¹, Sargeant AJ, Mercer TH, Ball D, Koufaki P, Karatzaferi C, Naish PF. Changes in muscle morphology in dialysis patients after 6 months of aerobic exercise training. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Sep; 18(9): 1854–61. PMID: 12937235.
- 22-Iepsen UW, Munch GD, Rugbjerg M, Rinnov AR, Zacho M, Mortensen SP, Secher NH, Ringbaek T, Pedersen BK, Hellsten Y, Lange P, Thaning P. Effect of endurance versus resistance training on quadriceps muscle dysfunction in COPD: A pilot study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016 Oct 27; 11: 2659-2669. doi: 10.2147/COPD.S114351.
- 23-Konopka AR, Harber MP. Skeletal Muscle Hypertrophy after Aerobic Exercise Training. *Exerc Sport Sci Rev*. 2014 Apr; 42(2): 53–61. doi: 10.1249/JES.0000000000000007
- 24-Cardoso GH, Petry DM, Probst JJ, de Souza LF, Ganguilhet G, Bobinski F, Santos ARS, Martins DF, Bonorino KC, Dafre AL, Hizume Kunzler DC. High-Intensity Exercise Prevents Disturbances in Lung Inflammatory Cytokines and Antioxidant Defenses Induced by Lipopolysaccharide. *Inflammation*. 2018 Dec; 41(6): 2060-2067.doi: 10.1007/s10753-018-0849-9.
- 25-Miyagi MY, Seelaender M, Castoldi A, de Almeida DC, Bacurau V, Andrade-Oliveira V, Enju LM, Pisciotano M, Hayashida CY, Hiyane MI, Brum PC, Camara NO, Amano MT. Long-Term Aerobic Exercise Protects against Cisplatin- Induced Nephrotoxicity by Modulating the Expression of IL-6 and HO-1. *PLoS One*. 2014 Oct 1;9(10):e108543. doi: 10.1371/journal.pone.0108543.

26-Yoshida T, Kakizawa S, Totsuka Y, Sugimoto M, Miura S, Kumagai H. Effect of endurance training and branched-chain amino acids on the signaling for muscle protein synthesis in CKD model rats fed a low-protein diet. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 Sep 1; 313(3): F805-F814. doi: 10.1152/ajprenal.00592.2015

27-Organ JM, Allen MR, Myers-White A, Elkhatib W, O'Neill KD, Chen NX, Moe SM, Avin KG. Effects of treadmill running in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res*. 2018 Sep 14;16:19-23. doi: 10.1016/j.bbrep.2018.09.001.

Acknowledgments:

We are grateful to the veterinarians Larissa Schmidt Rosseti and Daniela Torres Cantadori, biochemist Fernanda Paschoal, and Professor Jeesser Almeida for their contribution to this study.

Correspondence:

Eliane Barbosa Togoe. Rua Santa Fé, 185, Dourados-MS Tel (67)99669-7934. eliane.togoe@gmail.com

Conflict of interest: none

Funding source: none

¹ This research was performed at the Laboratory of Experimental Surgery of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Universidade Federal do Mato Grosso-UFMS) and experimental pathology laboratory of the State University of Londrina (Universidade Estadual de Londrina-UEL).

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



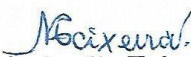
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do exercício físico sobre o estresse oxidativo, variáveis bioquímicas e morfológicas em um modelo animal de doença renal em ratos", registrada com o nº 735/2015, sob a responsabilidade de **landara Schettert Silva** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, em reunião de 21/03/2016.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2015 a 01/03/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	162
Peso/Idade	200g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central/CCBS/UFMS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 22 de março de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186