



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E
FUNCIONAL**



DÁFINY EMANUELE DA SILVA MARQUES

“EFEITO DO EXERCÍCIO AERÓBIO MODERADO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
E MORFOLÓGICOS CAUSADOS PELA NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATOS”

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biologia Estrutural e
Funcional da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte

Natal-RN

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

“EFEITO DO EXERCÍCIO AERÓBIO MODERADO EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
E MORFOLÓGICOS CAUSADOS PELA NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATOS”

ORIENTADORA

Naisandra Beserra da Silva

CO-ORIENTADOR

Bento João da Graça Azevedo Abreu

Natal-RN

2017

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Marques, Dáfiny Emanuele da Silva.

Efeito do exercício aeróbio moderado em parâmetros bioquímicos e morfológicos causados pela nefropatia diabética em ratos / Dáfiny Emanuele da Silva Marques. - Natal, 2017.

60 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Orientadora: Profa. Dra. Naisandra beserra da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Bento João da Graça Azevedo Abreu.

1. Rins - Dissertação. 2. Atividade Física - Dissertação. 3. Glomérulos - Dissertação. 4. Fibrose - Dissertação. 5. Hipertrofia renal - Dissertação. I. Silva, Naisandra beserra da. II. Abreu, Bento João da Graça Azevedo. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

TRABALHO APRESENTADO POR: Dáfiny Emanuele da Silva Marques

Em 31 de julho de 2017.

1º Examinador(a) - ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. Naisandra Beserra da Silva – UFRN

2º Examinador(a): Prof. Dr. Eudes Euler de Souza Lucena – UERN

3º Examinador(a): Prof^ª. Dr^ª. Adriana Augusto de Rezende– UFRN

DEDICATÓRIA

À Deus;

Aos meus pais biológicos, Manoel Marques de Lima (*in memorian*) e Josefa Bezerra da Silva por tudo que fizeram para a minha formação;

Aos meus irmãos, Rosa, Joelma, Magnus e Karine obrigada pelo apoio, sei que sempre estiveram torcendo por mim;

À minha família de coração, Rosângela Dias do Nascimento Alves, Pedro Alves Bezerra Filho e Mellissa Mayene Alve. Pessoas mais que especiais que Deus colocou em minha vida e eu sempre pude contar. Pessoas que são exemplo de família, seres humanos lindos e que me deixam honrada em fazer parte desse amor;

As minhas amigas, aquelas que fazem parte de minha vida a muito tempo, Robéria, Talita e as que entraram “recentemente” Amanda, Narjara, e Karlinha que tenho certeza que sempre estavam me dando apoio e me incentivando a seguir;

Ao meu ex companheiro Marcelo Carvalho da Silva.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha mãe acadêmica, orientadora e amiga Profa. Dra. Naisandra Beserra da Silva, muito obrigada por tudo e principalmente pela paciência dos últimos dias. Poucas pessoas tem a sorte de ter uma pessoa tão maravilhosa quanto a senhora, como orientadora, uma verdadeira mãe. Mas não qualquer uma, aquela que sabe chegar e falar em qualquer momento, seja para um elogio ou para um sermão. Meus sinceros agradecimentos pela confiança, incentivo, broncas, tudo, sempre serei grata por cada gesto. Obrigada por ser essa pessoa iluminada, que Deus a abençoe sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre e por tudo. Agradeço por toda força diante das tribulações, por colocar pessoas tão especiais em minha vida. Quando Deus está presente em nossas vidas e temos fé, ele nos ajuda a superar nossos medos e nos mostra que podemos ter determinação para superar qualquer obstáculo;

Aos professores da pós-graduação por cada ensinamento;

Aos professores João Paulo Matos Santos Lima, Bento João da Graça Azevedo Abreu e Gustavo da Cunha Lima Freire, professores que foram meus iniciadores, que me abriram as portas para uma vivência acadêmica incrível, muito obrigada.

Aos meus professores ainda da graduação, mas que me ensinaram conhecimentos que levarei para a vida e que de alguma forma se fizeram contribuintes deste trabalho e minha jornada, Marlécio Maknamara, Ivanice Rêgo, Rank Silva, Christina Camilo, Nazaré, Elizeu Antunes;

“ O principal objetivo da educação é criar pessoas capazes de fazer coisas novas e não simplesmente repetir o que as outras gerações fizeram ” Jean Piaget

Ao Raul pelas induções à diabetes, o chato, mas ele retrucava de um lado e eu do outro kkkk Obrigada por todas as suas contribuições;

As técnicas do laboratório de histologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Socorro, Melyna, Sara e Lourdinha. Em especial Melyna e Lourdinha que além de técnicas, me ajudaram com as suas amizades;

Ao instituto do cérebro por disponibilizar o laboratório de microscopia para que pudesse ser realizada as micrografias das lâminas;

Aos professores, componentes de banca, pela disponibilidade e todas as contribuições;

À minha trupe universitária conquistada lá no laboratório do professor João Paulo, amigos que irão muito além da UFRN, que me apoiaram, que fizeram surpresas que me deixaram desidratadas de tanto que eu chorei, muito obrigada a cada um de vocês. Meu amarelo Bob, Jotinha, Ivis, Tom Tom, Julinho, Juliana (de Júlio kkkk), Léo, Maby, Rodrigo e suas princesas, Rebeca (Suellen), Dibo (Diego), Ricardo, Raulrsirinho (Raulzito), Clara, Rômulo...caraca é muita gente, mas cada um com espaço especial em meu coração;

À minha segunda trupe universitária menor, mas não menos importante conquistada com o grupo Diabetes: Menino Robson, digo, Rapaz Robson, Flávio (antes mestre, hoje professor, mas sempre o mesmo ser humano incrível), Hesli, Nathália, Jonatas, Matheus (só tem tamanho), Lycianne vocês foram peças chaves para o desenvolvimento deste projeto, vocês trabalharam junto comigo, muito obrigada;

Quero agradecer em especial à Matheus pelos últimos dias em que me acompanhou, com certeza não vou esquecer do seu esforço em me ajudar, me encheu (kkkk) o saco, ok, me chamando de bocó, mas esteve ao meu lado e me incentivou a não desistir (“eita” nem era para vocês ficarem

sabendo), mas as rosas nem só de beleza vivem, existem espinhos, que podem ser removidos e não atrapalham a beleza da rosa;

As minhas amigas Amanda (Flor) e Narjara (Adrenalina), não importa o que aconteça seremos um trio, SIM!, obrigada pela amizade vocês, pela paciência em escutar meus desabafos e por todas as palavras;

Ao meu ex companheiro por toda a sua ajuda sem obrigação, apenas companheirismo, que teve em todos os finais de semanas comigo, que se propôs a aprender e me ajudar em cada atividade na qual me acompanhou e a sua família;

Aos novos e velhos amigos;

Espero não ter esquecido de ninguém, mas agradeço à todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para que este projeto fosse realizado. Vocês foram fundamentais.

À TODOS MUITO OBRIGADA!

Epígrafe

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

Sumário

RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Diabetes Mellitus e Nefropatia Diabética	9
1.2 Estresse oxidativo e a Relação com a Diabetes Mellitus	10
1.3. Papel do Exercício Físico no Controle da DM e do Estresse Oxidativo	12
1.4. Modelo Experimental.....	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Declaração de Ética.....	15
3.2. Cálculo amostral.....	15
3.3. Desenho experimental	15
3.4 Indução da Diabetes Mellitus	17
3.5. Programa de Treinamento Físico	18
3.6. Eutanásia dos animais e coletas das amostras	18
3.7. Técnicas histológicas.....	19
3.8 Análises bioquímicas.....	20
3.8.1 Extração enzimática	20
3.8.2 Quantificação de proteínas	20
3.8.3 Análise da atividade enzimática da CAT	21
3.8.4 Análise da atividade enzimática da SOD	21
4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Caracterização do modelo de estudo	23
5.1.1 Hiperglicemia.....	23
5.1.3 Percentual de ganho de peso	24
5.1.3 Polidipsia e Polifagia	24
5.2 Parâmetros Bioquímicos	26
5.2.1 Albumina.....	26

5.2.2 Creatinina	26
5.3 Parâmetros morfológicos	27
5.3.1 Peso renal	27
5.3.2 Contagem dos glomérulos	28
5.3.3 Tamanho dos glomérulos	30
5.3.4 Fibrose tubulointersticial	32
5.3.5 Fibrose glomerular	32
5.4 Enzimas Antioxidantes.....	33
5.4.1 Catalase	33
5.4.2 Superóxido Dismutase	34
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	41
ANEXO 1	47

RESUMO

Diabetes Mellitus (DM) é uma condição crônica que acontece quando o corpo não produz ou não consegue utilizar de forma eficiente a insulina e é marcada por anormalidades metabólicas e complicações crônicas. Atualmente a prática regular de exercício, aliada à dieta e insulino-terapia, tem sido considerada uma das principais abordagens no tratamento do DM, enquanto que o sedentarismo se apresenta como preditor de complicações e mortalidade. Estudos recentes têm relatado que o exercício físico é capaz de retardar a progressão da doença renal. Entretanto, a maior parte dos estudos verificaram alterações renais no DM somente em longo prazo. Além disso, o conhecimento sobre os efeitos do exercício físico na nefropatia diabética ainda é escasso. Este trabalho visa investigar o efeito do exercício aeróbio moderado sobre os aspectos morfofuncionais e bioquímicos do tecido renal de ratos diabéticos. Ratos da linhagem *Wistar*, machos, 30 dias de idade, foram divididos nos seguintes grupos (n=12/ grupo): controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS), diabético treinado (DT) e diabético treinado previamente (DTP). O DM foi induzido por estreptozotocina (40mg/kg, i.p.). Logo após a confirmação do diabetes, teve início o programa de exercício, que consistiu em seis semanas de natação (3dias/semana e 30min/dia) para os grupos CT e DT. O grupo DTP foi submetido a quatro semanas de exercício prévio em relação ao início do treinamento dos demais grupos treinados. Foi feita a coleta de sangue para análise bioquímica (glicemia, dosagem de creatinina e albumina). Os rins foram coletados para análise histopatológica da integridade do parênquima renal (Hematoxilina e Eosina), formação de tecido fibrótico (*Picrosirius* red). Os animais do grupo diabético tiveram índice glicêmico maior, quando comparados aos grupos controles ($p<0,001$). Houve uma redução significativa nos grupos diabéticos treinados ($p<0,01$). A creatinina foi aumentada em todos os grupos, quando comparados ao controle ($p<0,05$). A albumina, assim como o peso foram diminuídos nos grupos diabéticos, comparado com o grupo controle ($p<0,05$). O DM acarretou em uma hipertrofia renal nos grupos diabéticos, comparado com os grupos controle ($p<0,05$), porém houve diminuição significativa nos animais com grupos treinados ($p<0,01$). Foi observado uma menor diminuição na quantidade de glomérulos e aumento no tamanho destes, nos grupos diabéticos, quando comparado aos grupos controles ($p<0,05$). E o exercício mostrou-se eficiente na redução da fibrose glomerular e da fibrose tubular. Os resultados mostram que a aplicação do exercício físico aeróbio moderado, em animais de um modelo experimental diabetes tipo 1 foi capaz de prevenir e/ou tratar danos renais causados pela doença.

Palavras-chave: Rins; Atividade Física; Glomérulos; Fibrose, Hipertrofia renal.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic condition that occurs when the body does not or can not efficiently use insulin and is marked by metabolic abnormalities and chronic complications. Currently, regular exercise, combined with diet and insulin therapy, has been considered one of the main approaches in the treatment of DM, whereas sedentary lifestyle presents itself as a predictor of complications and mortality. Recent studies have reported that physical exercise is capable of slowing the progression of kidney disease. However, most of the studies verified renal changes in DM only in the long term. In addition, knowledge about the effects of physical exercise on diabetic nephropathy is still scarce. This work aims to investigate the effect of moderate aerobic exercise on the morphofunctional and biochemical aspects of renal tissue in diabetic rats. Male Wistar rats were divided into the following groups (n = 12 / group): sedentary control (CS), trained control (CT), sedentary diabetic (DS), diabetic trained (DT) and diabetic Previously trained (DTP). DM was induced by streptozotocin (40mg / kg, i.p.). Soon after the confirmation of diabetes, the exercise program consisted of six weeks of swimming (3 days / week and 30 minutes / day) for the CT and DT groups. The DTP group underwent four weeks of previous exercise in relation to the beginning of the training of the other trained groups. Blood samples were collected for biochemical analysis (blood glucose, creatinine and albumin). The kidneys were collected for the histopathological analysis of renal parenchymal integrity (Hematoxylin and Eosin), formation of fibrotic tissue (Picrosirius rer). The animals in the diabetic group had a higher glycemic index when compared to the control groups (p <0.001). There was a significant reduction in trained diabetic groups (p <0.01). Creatinine was increased in all groups when compared to control (p <0.05). Albumin, as well as weight, were decreased in the diabetic groups, compared to the control group (p <0.05). The DM had renal hypertrophy in the diabetic groups, compared to the control groups (p <0.05), but there was a significant decrease in the animals with trained groups (p <0.01). A smaller decrease in the number of glomeruli and In the diabetic groups, when compared to the control groups (p <0.05). And exercise was efficient in reducing glomerular fibrosis and tubular fibrosis. The results show that the application of moderate aerobic exercise in animals of an experimental model type 1 diabetes was able to prevent and / or treat kidney damage caused by the disease.

Keywords: Kidneys; Physical activity; Glomeruli; Fibrosis, Renal hypertrophy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- OH – Radical hidroxila
- AGEs – Produtos finais de glicação avançada (em inglês)
- AMP – Adenosina Monofosfato (em inglês)
- CAT – Catalase
- GSH - Px – Glutationa peroxidase na forma reduzida
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- DM – Diabetes mellitus
- ND – Nefropatia diabética
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (em inglês)
- EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- EO – Estresse oxidativo
- ROS – Espécies reativas de oxigênio (em inglês)
- HE – Coloração hematoxilina-eosina
- KCl – Cloreto de potássio
- KI – Iodeto de potássio
- MDA – Malondialdeído
- NADH/NAD⁺ - Formas reduzida e oxidada da Nicotinamida – adenina dinucleotídeo
- NBT – *Nitro blue tetrazolium*
- O₂^{·-} - Ânion Superóxido
- PRED – Coloração *picrosirius red*
- RAGEs – Receptores de AGEs
- SOD – Superóxido dismutase
- STZ – Estreptozotocina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A) Desenho experimental, direção do delineamento temporal, com os principais eventos: Nascimento, início dos procedimentos experimentais e eutanásia (Fim do protocolo e iniciação dos procedimentos cirúrgicos). B) Cronologia do treinamento físico, para todos os grupos treinados (GCT, GDT, GDTP). E destaque da semana de indução ao DM. Durante este período, o grupo DTP foi submetido ao treinamento físico para evitar o destreinamento;

Figura 2 – Indução ao DM, por via intravenosa – veia peniana;

Figura 3 – Desenho esquemático da divisão dos rins para cada metodologia. 1D e 3D – MEV (Microscopia eletrônica de varredura); 1E e 3E – HISTO (Histologia e Imunohistoquímica); 2D - ENZIMAS (atividade enzimática); 2E1 – BIOMOL (Biologia molecular) e 2E2 – TBARS (Peroxidação de lipídeos);

Figura 4 – Glicemia final dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP ao final dos experimentos;

Figura 5 – Percentual de ganho de peso ao longo do período experimental para os grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP;

Figura 6 – Acompanhamento de ingestão de água e ração dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP;

Figura 7 – Níveis séricos de albumina, no sangue, dos animais dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP;

Figura 8 – Níveis séricos de creatinina no sangue dos animais dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP;

Figura 9 – Peso em gramas (g) do órgão fresco dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP;

Figura 10 – Contagem de glomérulos por campo (5) para todos os grupos. A- GC; B – GD; C- GCT; D- GDT; E- GDTP;

Figura 11 – Tamanho dos glomérulos (10 por lâmina) para todos os grupos. A- GC; B – GD; C- GCT; D- GDT; E- GDTP;

Figura 12 – Quantificação de fibrose tubulointersticial (%);

Figura 13 – Quantificação de fibrose glomerular (%);

Figura 14 – Atividade da enzima Catalase;

Figura 15 – Atividade da enzima Superóxido Dismutase.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus e Nefropatia Diabética

A Diabetes Mellitus (DM) é uma condição crônica que acontece quando o corpo não produz ou não consegue utilizar de forma eficiente a insulina, hormônio produzido no pâncreas e necessário para captação de glicose da corrente sanguínea. A DM é uma doença que aumenta de forma epidêmica no mundo todo. Hoje um em cada onze adultos tem a doença, totalizando cerca de 415 milhões de pessoas. Estima-se, ainda, que até 2040, este número eleve-se para cerca de 642 milhões (IDF Diabetes Atlas 7th edition, 2015).

A DM é principalmente classificada em dois tipos, tipo 1 ou DM insulino-dependente e tipo 2 ou DM não insulino-dependente. A DM do tipo 2 representa pelo menos 90 % dos casos e é a forma predominante e adquirida da doença, representando uma combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta compensatória inadequada a secreção da mesma. (JONNALAGADDA et al., 2014). A causa da DM Tipo 1 (DM-1) é uma deficiência absoluta da secreção de insulina. Ambos os tipos têm a hiperglicemia como manifestação clássica associada frequentemente à poliúria, polidipsia e perda de peso ou polifagia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Pesquisas recentes mostram que a DM é a terceira doença crônica mais presente na infância e entre as doenças autoimunes é a mais prevalente (DABELEA et al., 2014). Pela primeira vez o número de crianças com a doença excedeu 500 mil, estima-se que cerca de 542 mil crianças tenham a doença (IDF Diabetes Atlas 7th edition, 2015).

Além disso, a DM está associada com várias complicações microvasculares (tais como a retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (como doenças coronárias, cerebrais e periféricas) (JONNALAGADDA et al., 2014, BORTOLIN et al., 2015).

A nefropatia diabética (ND) é uma das mais prevalentes e sérias complicações microvasculares induzida pela DM, e ocorrem devido ao aumento do fluxo de glicose nos rins através de mecanismos independentes de insulina (GAO et al., 2014, KANCHAN et al., 2016). Além disso, é também considerada como a principal causa de doença renal crônica terminal em ambos os tipos de DM (RAN et al., 2014). Várias alterações, tanto estruturais, quanto funcionais estão associadas com a DM, mais especificamente no glomérulo, túbulo-intersticial e vascularização. As anormalidades estruturais incluem desde hipertrofia,

espessamento da membrana basal glomerular, atrofia tubular até mesmo fibrose intersticial (HILLS; SQUIRES, 2011, BANKI et al., 2013, KANCHAN et al., 2016).

Histologicamente, a ND é caracterizada por um acúmulo de matriz extracelular (MEC) tanto no mesângio glomerular e interstício tubular, acarretando em esclerose glomerular e fibrose tubulointersticial, com uma excessiva cicatriz renal e um declínio na função excretora (HILLS; SQUIRES, 2011, BANKI et al., 2013, JUNG et al., 2016). Os principais constituintes do acúmulo de matriz mesangial em pacientes com longa história de diabetes são colágeno tipo IV, Fibronectina e, em estágios avançados, o Colágeno Tipo I (SHARMA; MCGOWAN, 2000). Várias citocinas e fatores de crescimento têm sido identificados. Especificamente, o Fator de Crescimento Transformante – beta1 (TGF – β 1) (MISSERI; MELDRUM, 2005), tem sido vinculado a achados como a hipertrofia renal, além do acúmulo de células mesangiais e componentes intersticiais na DM (ZIYADEH, 2008).

A quantificação de albumina na urina é a abordagem mais comumente aceita para triagem de proteinúria (KOH et al., 2011). Esta, por sua vez, é considerada um marco da ND, e tem sido geralmente considerada como o principal marcador de lesão glomerular e um aumento da permeabilidade glomerular a macromoléculas (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014).

De forma geral, a evolução das numerosas complicações em longo prazo da DM está correlacionada com a severidade e a duração da hiperglicemia, sendo esta considerada a principal causa dessas complicações (JAGTAP; PATIL, 2010). No entanto, ainda não se sabe os mecanismos pelos quais esse processo ocorre.

1.2 Estresse oxidativo e a Relação com a Diabetes Mellitus

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos prejudiciais de danos teciduais induzidos por hiperglicemia, incluindo a via dos polióis, a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), metabolismo de hexosamina, a ativação da proteína cinase C (PKC) e a angiotensina II (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014, KANCHAN et al., 2016). Estas vias proporcionam um aumento do estresse oxidativo, o qual sabidamente está associado a uma série de danos no tecido durante o estado diabético (KANCHAN et al., 2016).

O estresse oxidativo pode induzir a resistência à insulina e/ou deteriorar a DM por meio de múltiplos mecanismos. No processo de estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidos em excesso, principalmente, pelas mitocôndrias. ROS incluem ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), radicais de hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Podem inclusive, causar danos e apoptose de células β das ilhotas pancreáticas com uma consequente redução da secreção de insulina (LI et al., 2014). Ainda, existe evidência de que ROS e a exposição a altas quantidades de glicose contribuem para a apoptose de podócitos na DM experimental (ISHIKAWA et al., 2012). Na verdade, o estresse oxidativo tem sido considerado como um dos principais mecanismos de progressão da patogenicidade na DM, e pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de muitas complicações renais tardias (PALMA et al., 2014).

Organismos aeróbicos se defendem contra ROS por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação (KALYANARAMAN, 2013). Dentre os mecanismos para prevenir o dano oxidativo, a célula contém enzimas que desintoxicam ROS, como superóxido dismutase (SOD), que converte o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) além da catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH -Px), enzimas que atuam na sequência convertendo H_2O_2 em água. No entanto, em condições patológicas como na DM, onde existe um excesso produção de ROS, estas podem contribuir para o aumento da peroxidação de lipídios de membranas celulares de oxidação de proteínas (PALMA et al., 2014).

A peroxidação lipídica é um personagem característico da diabetes crônica, que prejudica a fluidez de membrana celular e altera a atividade de enzimas ligadas tanto a membrana quanto a receptores, e resulta em um mau funcionamento das mesmas. O produto secundário da peroxidação lipídica é o Malonaldeído (MDA), que é utilizado como um indicador de danos no tecido (ANNADURAI et al., 2014).

Várias linhas de evidência suportam uma associação próxima entre o estresse oxidativo e a evolução da diabetes, revelando que o estresse oxidativo secundário à hiperglicemia ocorre antes do surgimento das manifestações clínicas das complicações avançadas da DM, demonstrando que este distúrbio possui um papel chave no estabelecimento da patogênese da doença (TEIXEIRA-LEMOS et al., 2011).

1.3. Papel do Exercício Físico no Controle da DM e do Estresse Oxidativo

O exercício físico regular é um componente indiscutível para um estilo de vida saudável, sendo considerado agente profilático de uma série de condições patológicas crônicas (SMITH et al., 2012). Assim, a inatividade física pode ser um determinante importante de morbidade e mortalidade entre indivíduos acometidos pela DM (BARCELLOS et al., 2012). Sabe-se que o exercício físico está associado a uma formação aumentada de ROS, principalmente devido ao aumento do consumo de O₂ pelos tecidos ativos. Diversos estudos demonstraram que a quantidade de radicais livres nos tecidos biológicos aumenta após o exercício agudo/crônico, o que coincide com o surgimento de danos à estrutura tecidual (JACKSON, 2008; LONGO et al., 2008).

A maior parte do O₂ consumido é utilizada na mitocôndria para a fosforilação oxidativa. No entanto, cerca de 2-5% do oxigênio utilizado neste processo são convertidos em radicais livres (SCANDALIOS, 1997; JENKINS, 2000; TEIXEIRA-LEMOS *et al.*, 2011). O exercício crônico de intensidade moderada altera positivamente a homeostase oxidativa das células e dos tecidos, diminuindo os níveis basais de danos oxidativos e aumentando a resistência ao estresse oxidativo (BELOTTO *et al.*, 2010). De fato, exercício regular causa adaptações na capacidade antioxidante, protegendo as células contra os efeitos devastadores do estresse oxidativo, prevenindo assim os danos celulares (TEIXEIRA-LEMOS *et al.*, 2011). Porém, devido aos riscos associados com hipoglicemia induzida pelo exercício, estudos que examinam as concentrações de glicose no sangue em humanos em resposta a um exercício são apenas de curta duração (uma única sessão de exercício por dia) (MCDONALD et al., 2014)

Trabalhos recentes sugerem que o processo inflamatório crônico e o estresse oxidativo promovem a progressão da ND (ISHIKAWA et al., 2012). O estresse oxidativo têm sido frequentemente associado à patogênese de doenças micro e macro vasculares observadas em indivíduos diabéticos. Alguns dados fornecem um forte suporte ao papel do exercício regular na redução da peroxidação lipídica (JACKSON, 2008). De fato, se o exercício regular pode mostrar um efeito protetor contra o estresse oxidativo em indivíduos com DM, a sua utilização como uma medida terapêutica não farmacológica é extremamente atrativa. As adaptações observadas durante a prática de exercícios físicos regulares são pelo menos parcialmente mediadas por uma supra regulação da produção basal do óxido nítrico. Este

aumento observado durante o exercício físico é capaz de induzir adaptações protetoras por interações com vários fatores de transcrição e, portanto, capaz de influenciar a expressão gênica das enzimas antioxidantes (TEIXEIRA LEMOS *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrado em um estudo experimental que uma linhagem de ratos diabéticos teve um aumento na expressão de enzimas antioxidantes, com um declínio nos danos oxidativo. Os dados foram exibidos pelo aumento na expressão de isoformas de SOD. Em paralelo às melhorias do dano oxidativo, foi demonstrado ainda que o treinamento físico ajudou na diminuição da excreção de albumina pela urina, na manutenção na densidade de podócitos e na diminuição da inflamação crônica. Logo, tais resultados podem ser relacionados com os efeitos benéficos do exercício na ND (ISHIKAWA *et al.*, 2012).

O exercício é um forte componente do manejo de pacientes com DM tipo 1, pois ele pode ter efeitos positivos sobre o controle glicêmico (JERUMS; MACISAAC, 2015).

1.4. Modelo Experimental

Para o estudo da caracterização do estresse oxidativo no tecido renal e sua relação com a DM e o exercício físico, utilizou-se o modelo experimental de ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) com DM induzida a partir da aplicação de estreptozotocina (STZ). A STZ é utilizada para o tratamento de tumores de células da ilhota pancreática e alguns tumores neuroendócrinos e possui citotoxicidade seletiva para células β pancreáticas (DE LA GARZA-RODEA *et al.*, 2010). Dessa maneira, a STZ causa fragmentação do DNA nas células β -pancreáticas e depleção de NAD^+ e NADH^+ celular para níveis não fisiológicos, o que resulta, por sua vez, em morte celular (YANG; WRIGHR Jr, 2002).

Poucos dias após administração da STZ, os animais apresentam sinais clínicos da DM como polidipsia, poliúria e debilitação do quadro motor geral. Achados de nosso grupo evidenciam que dentro de quatro semanas após indução, após a indução da DM, já se pode observar efeitos negativos da doença em diversos órgãos, tais como coração (DA SILVA *et al.*, em preparação).

Portanto, no presente projeto, visamos investigar se o exercício físico pode potencializar a resposta antioxidante enzimática do tecido renal em um modelo experimental

de ratos diabéticos, estabelecendo uma relação entre efeitos benéficos da atividade física na manutenção da estrutura ou recuperação do tecido mediante os danos provocando pela DM.

Os resultados dessa pesquisa possuem relevância clínica, pois podem fornecer pistas sobre os mecanismos relacionados ao estresse oxidativo na DM e, propiciar subsídios necessários para o embasamento de estudos posteriores envolvendo a atividade física em humanos portadores da DM.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar a influência do exercício físico aeróbio como um agente de prevenção nas alterações teciduais renais proporcionadas pela Diabetes Mellitus num modelo experimental de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito do exercício aeróbio sobre o controle glicêmico nos animais dos grupos experimentais;
- Verificar o efeito do exercício aeróbio sobre o controle nas alterações clínicas dos grupos experimentais, tais como:
- Peso corporal, Polidipsia, Polifagia e Poliúria;
- Verificar alterações morfológicas, tais como:
- Peso renal, Densidade glomerular, Tamanho dos glomérulos, Fibrose glomerular e Fibrose tubulointersticial;
- Mensurar atividade renal através da quantificação de Creatinina e Albumina no sangue e urina, respectivamente;
- Analisar se o treinamento aeróbio é capaz de prevenir e/ou tratar os possíveis danos causados na nefropatia diabética.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Declaração de Ética

Todos os procedimentos foram realizados seguindo as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEUA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), sob Protocolo de número 014/2015 (ANEXO 1).

3.2. Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi calculado por meio do programa G*power (versão 3.1.6) (FAUL et al., 2007) com base no modelo de análise de variância (ANOVA) unifatorial, considerando-se o nível glicêmico como desfecho primário. Um total de 60 animais foi estimado como necessário para detectar um tamanho do efeito mínimo de 0.6 (COHEN, 1988), com 80% de poder estatístico e nível alfa em 5%. Em estudo piloto prévio, nosso grupo observou uma taxa de mortalidade de 40% nos animais estudados. Desse modo, o número requerido de animais foi ajustado para 70 a fim de compensar pela possível perda de dados (CHARAN AND KANTHARIA, 2013). Foram realizados esforços para minimizar o número de animais utilizados na pesquisa e seu sofrimento durante os experimentos.

3.3. Desenho experimental

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar*, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais foram separados em cinco grupos (outros detalhes são demonstrados na Figura 1):

C (animais controles não treinados), com 10 animais;

CT (animais controles treinados), n = 15;

D (animais diabéticos não treinados), n = 15;

DT (animais diabéticos treinados), n = 15;

DTP (animais treinados previamente à indução do diabetes), n = 15.

A discrepância em relação ao número de animais entre os grupos se deve ao alto índice de mortalidade do grupo de animais diabéticos e animais diabéticos treinados (que pode chegar a 40% em nossas observações prévias). Assim, presumiu-se que teríamos ao término dos experimentos cerca de dez animais por grupo.

Os animais permaneceram alojados em caixas de propileno providas de bebedouro e comedouro durante período de ambientação de uma semana. Em seguida, foram alocados 4 animais por caixa, mantidas em condições controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e receberam ração e água *ad libitum*.

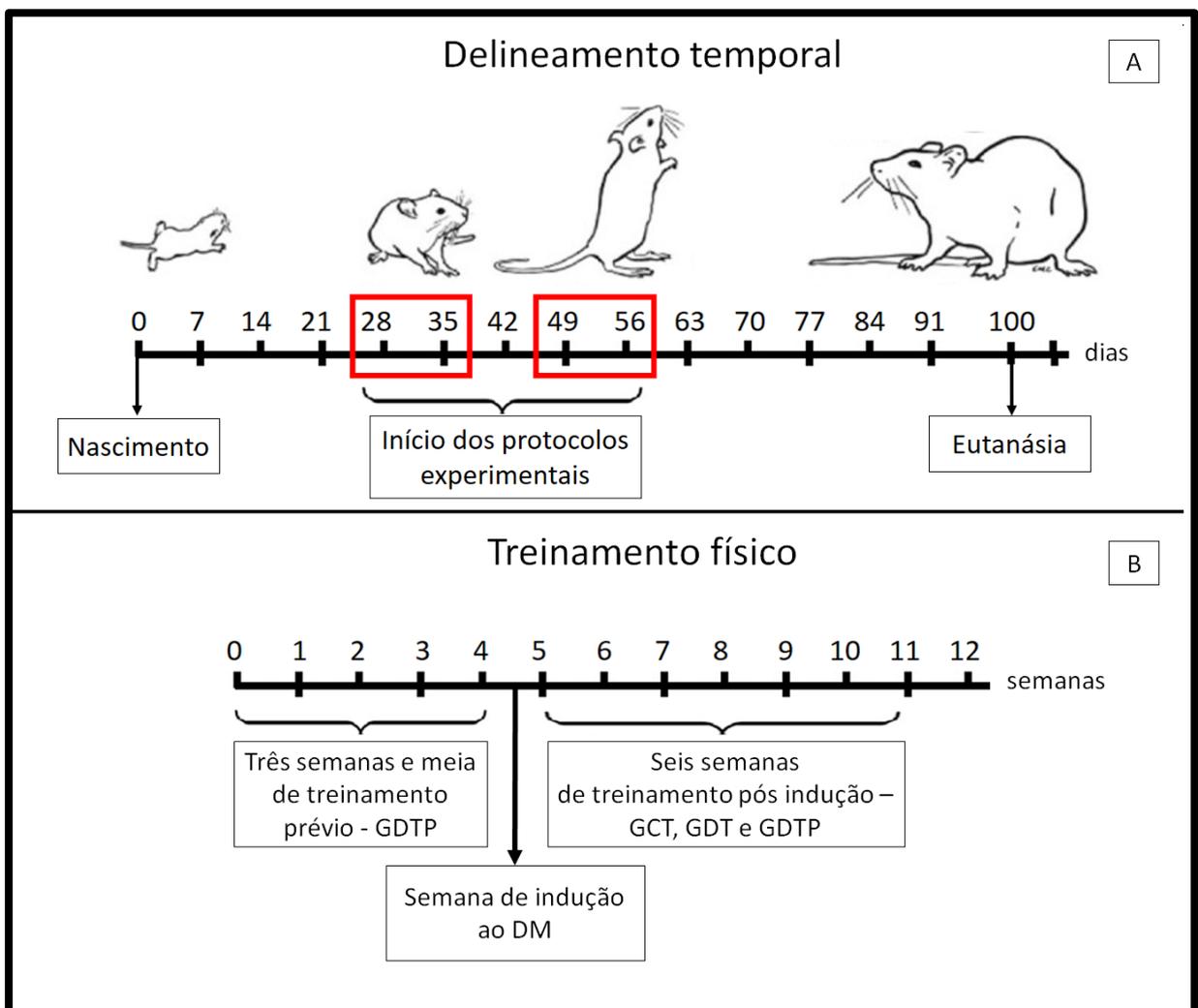


Figura 1 – A) Desenho experimental, direção do delineamento temporal, com os principais eventos: Nascimento, início dos procedimentos experimentais e eutanásia (Fim do protocolo e iniciação dos procedimentos cirúrgicos). B) Cronologia do treinamento físico, para todos os grupos treinados (GCT, GDT, GDTP). E destaque da semana de indução ao DM. Durante este período, o grupo DTP foi submetido ao treinamento físico para evitar o destreinamento;

3.4 Indução da Diabetes Mellitus

Após jejum prévio de 12hs, os animais dos grupos DS, DT e DT foram induzidos a DM-1 induzida por injeção de STZ (Cayman Chemical), dissolvida em solução tampão de citrato 0,1 M (0,1 M , pH 4,5), via intravenosa (veia peniana – Figura 2), a uma dose de 40 mg/kg de peso corporal. Água e comida foram disponibilizados duas horas após a administração (SILVA et al., 2013). Devido à instabilidade da droga em solução, a estreptozotocina foi administrada dentro de 10 minutos após a dissolução (DE LA GARZA-RODEA et al., 2010). Os animais dos grupos CS e CT receberam a mesma dosagem de veículo (tampão citrato 0,1 M, pH 4,5) sem a dose de estreptozotocina.

Após 48h da indução, a glicemia foi mensurada por meio de amostra sanguínea retirada da veia caudal com glicosímetro portátil (Accu-chek Roche®). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram níveis glicêmicos superiores a 250mg/dl. A dosagem da glicemia também foi verificada ao final do experimento para posteriores comparações.



Figura 2 – Indução ao DM, por via intravenosa – veia peniana.

3.5. Programa de Treinamento Físico

Foi realizado um protocolo de exercício físico aeróbio moderado (adaptado de DA SILVA et al, 2012), realizado em uma caixa d'água de polietileno, 310 L com 103 cm de largura em seu maior diâmetro, 81,3 cm no menor diâmetro e 53,4 cm de altura (Tigre, São Paulo/ Brasil) e com coluna d'água de 40cm. Os grupos foram separados de forma homogênea de acordo com a idade. Iniciado o treinamento, este foi realizado três vezes por semana (30min/dia), por um período de seis semanas para os grupos CT e DT e por 10 semanas para o grupo DTP. Os animais não-treinados foram mantidos nas suas respectivas caixas. Os grupos CT e DT iniciaram o treinamento aos 58 dias de idade, enquanto que o grupo DTP iniciou aos 30 dias. O início antecipado, para o grupo DTP, corresponde ao período de três semanas e meia, em que foi realizado o treinamento prévio (como descrito anteriormente). Para cada sessão de treinamento eram colocados oito animais por vez, correspondente a duas caixas. Em seguida os animais eram retirados, secos com toalha e realocados em suas respectivas caixas.

3.6. Eutanásia dos animais e coletas das amostras

Os animais passaram por jejum de 8-12 horas antes da eutanásia. Todos os grupos foram eutanasiados com dose letal de tiopental intraperitoneal (>90mg/kg de peso) associado à lidocaína (2%), seguida de toracotomia para a retirada bilateral dos rins. Os órgãos foram pesados em balança analítica para avaliação de hipertrofia do órgão. O sangue foi coletado pela veia porta para análises bioquímicas. As concentrações plasmáticas de glicose e as concentrações séricas de creatinina e albumina foram determinadas utilizando kits LABTEST (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante, utilizando o analisador bioquímico LABMAX PLENNO (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). O sangue total periférico foi estabilizado em fluoreto de sódio. Para as demais dosagens, foi utilizado sangue total para obtenção do soro. As dosagens destes parâmetros foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica DACT-UFRN.

O rim foi seccionado (Figura 3) e os fragmentos foram armazenados de acordo com a análise a ser realizada. Os fragmentos destinados à análise histopatológica e imunohistoquímica foram armazenados em recipientes com fixador paraformaldeído tamponado 4%. As amostras destinadas a quantificação de atividade enzimática, foram

congeladas em nitrogênio líquido até o final da eutanásia e posteriormente armazenadas a temperatura -80 °C. Por fim, as amostras que serão utilizadas para análise de biologia molecular foram imersas em RNA later (STZ , Sigma-Aldrich , St. Louis , MO) e posteriormente congelados a -80 °C.

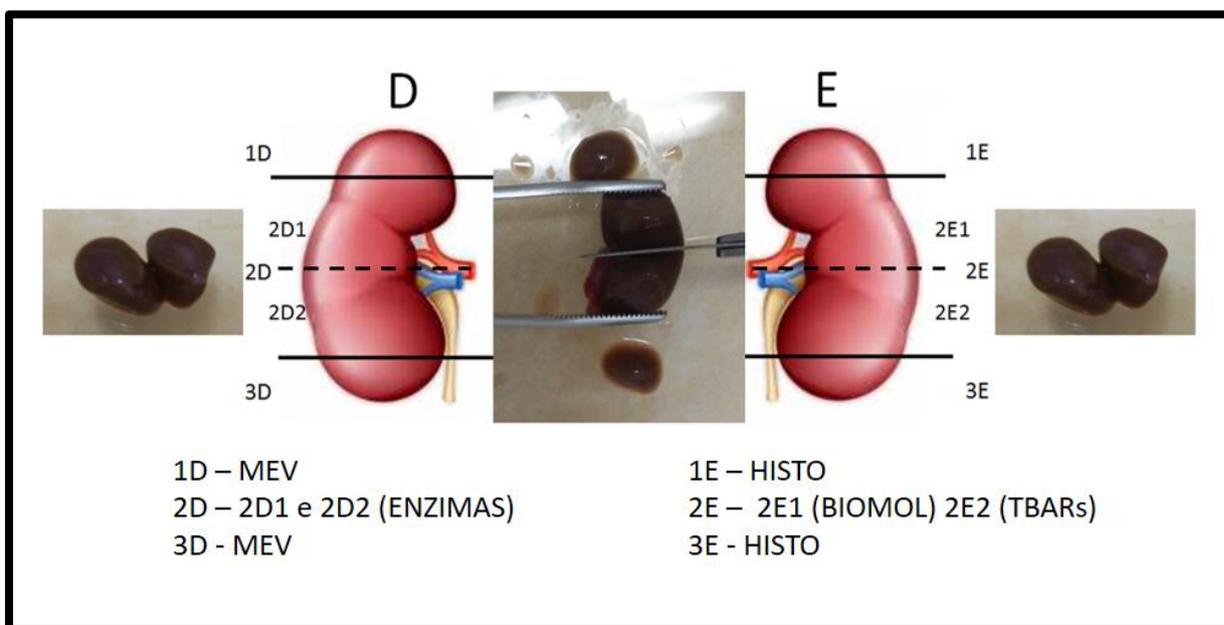


Figura 3 – Desenho esquemático da divisão dos rins para cada metodologia. 1D e 3D – MEV (Microscopia eletrônica de varredura); 1E e 3E – HISTO (Histologia e Imunohistoquímica); 2D - ENZIMAS (atividade enzimática); 2E1 – BIOMOL (Biologia molecular) e 2E2 – TBARS (Peroxidação de lipídeos).

3.7. Técnicas histológicas

Para realização das análises histológicas foram utilizados todos os animais de cada grupo. Os tecidos renais, devidamente fixados, foram submetidos a técnica histológica de rotina (desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina). Em seguida, os blocos foram cortados em secções consecutivas de 5 µm para confecção de lâminas histológicas coradas em Hematoxilina-Eosina (HE); Picrosirius Red; Ácido Periódico-Schiff (PAS) e Azul de toluidina, utilizando-se protocolos padrão de coloração. A coloração em HE visa avaliar o parênquima renal, observando a presença de glomérulos renais na região cortical do rim, bem como o aspecto glomerular e tubular, além de outros achados como degeneração celular e algum tipo de infiltrado inflamatório. A coloração em Picrosirius Red

foi utilizada para contagem geral dos glomérulos, tamanho destes, fibrose glomerular e fibrose tubulointersticial. (LUIZ et al., 2013).

A avaliação morfométrica, inclui contagem dos glomérulos e tamanho glomerular foi realizada por examinador capacitado e cego utilizando-se do software Image J, versão 1.48v (National Institutes of Health, Maryland, EUA; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). As fotos das lâminas foram retiradas utilizando-se um microscópio óptico AxioImager M2 (Zeiss) de campo claro, equipado com câmera de vídeo digital AxioCam Mrc (Zeiss). A contagem dos glomérulos foi realizada utilizando imagens fotografadas em campo claro, em um aumento 100 vezes, e cinco campos aleatórios. As medidas de tamanho foram tomadas utilizando a medida do maior diâmetro do glomérulo, em 10 glomérulos por lâminas e em um aumento de 400 vezes.

3.8 Análises bioquímicas

3.8.1 Extração enzimática

O córtex renal (100 mg) de sete a oito animais de cada grupo (n=5, para cada grupo) foi homogeneizado em tampão fosfato de extração enzimática (KCl 140 mM + fosfato 20 mM + EDTA 0,1 mM; pH 7,4) a uma relação de massa/volume de 1:10, após trituração na presença de nitrogênio líquido utilizando pistilo e almofariz. O homogenato foi armazenado em microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 13000 x g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C em centrífuga MIKRO 200R (Hettich - Tuttlingen/Alemanha). Após essa etapa, o sobrenadante (fase proteica) foi colhido e armazenado a -20°C para realização das demais etapas da análise bioquímica (adaptado de SAMARGHANDIAN; AFSHARI; SADATI, 2014).

3.8.2 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas por meio do ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando um corante à base de *Comassie Brilliant Blue* (reagente de Bradford). As

amostras foram diluídas a 1:40 e colocadas em microplaca junto ao reagente de Bradford (10 µL da diluição de cada amostra + 200 µL do reagente) . Após 10 minutos no escuro, a microplaca foi lida contra o branco de referência no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Femto 700 plus (São Paulo, SP/Brasil) localizado no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (Biopol) (Departamento de Bioquímica/UFRN).

3.8.3 Análise da atividade enzimática da CAT

Após serem homogeneizadas no tampão de extração enzimática, as amostras pulmonares foram submetidas à avaliação da atividade da CAT. Para tanto, 50 µL do extrato bruto das amostras foram misturados a 2,95 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,0) e H₂O₂ a 20 mM em tubos de hemólise. A atividade da CAT foi medida por meio da quantificação da oxidação do H₂O₂ em comprimento de onda de 240 nm (HAVIR; McHALE, 1987) durante 300 segundos com leituras a cada 30 segundos, em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences – Cambridge/Inglaterra) localizado no Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB) (Departamento de Bioquímica/UFRN). Os resultados foram expressos em nmolH₂O₂/min/mgPROT.

3.8.4 Análise da atividade enzimática da SOD

Para quantificar a atividade da enzima SOD, os extratos enzimáticos pulmonares foram diluídos em tampão de extração a uma razão de um 1:2 e 10 µL dessa diluição foram misturados em 166 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,8), 20 µL de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) a 750 µM e 4 µL de riboflavina a 1 mM. As amostras e os demais reagentes foram colocados em microplacas e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 560 nm (MISRA; FRIDOVICH, 1972) em espectrofotômetro Femto 700 plus (São Paulo, SP/Brasil) localizado no Biopol (Departamento de Bioquímica/UFRN). Os resultados foram expressos em UA/gMF/min.

4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os cálculos estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism© versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Após verificação de que as variáveis contínuas não apresentavam distribuição normal, com o teste Shapiro-Wilk, diferenças estatísticas para as medidas únicas o Kruskal Wallis, seguidas do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. Para as análises de medidas repetidas foram feitas por meio da ANOVA two-way seguidas do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. P valores ≤ 0.05 foram considerados como estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo de estudo

5.1.1 Hiperglicemia

A caracterização clínica da doença é realizada, principalmente com a observação e análise da Hiperglicemia, Polidipsia, Polifagia e Poliúria. Apenas a poliúria não foi quantificada, sendo apenas contatada por observação. Todos os animais tiveram as glicemias iniciais verificadas antes da introdução destes em seus respectivos grupos, confirmando que os animais eram normoglicêmicos dentro dos valores de referência indicados para ratos Wistar (DANTAS et al., 2006). A glicemia sérica realizada ao final dos experimentos (Figura 3) revelou que o exercício físico exerceu um papel de controle nos níveis glicêmicos dos os animais dos grupos diabéticos (GD, GDT e GDTP). Os animais se mantiveram hiperglicêmicos, mas apresentaram redução significativa quando comparados aos grupos GC e GCT. ***P < 0.001 vs. GC; **P < 0.01 vs. GC; *P < 0.05 vs. GC; ###P < 0.001 vs. GCT; †P < 0.05 vs. GCT. (Figura 4).

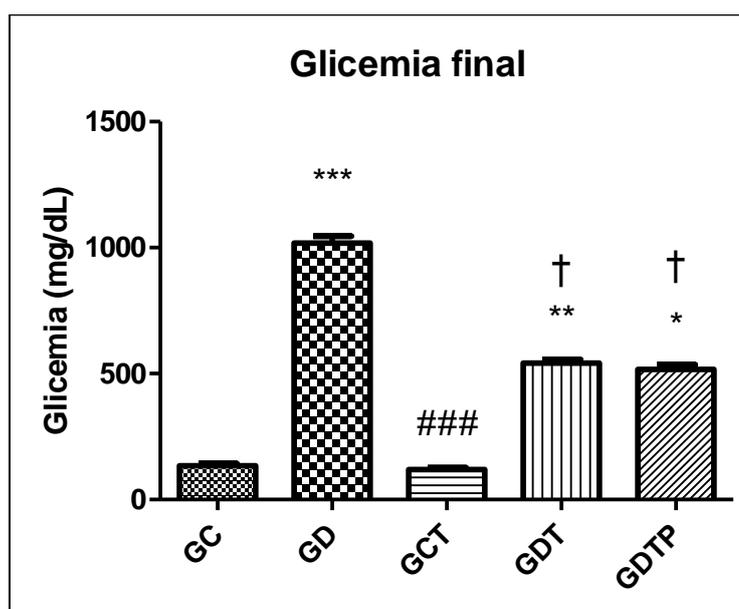


Figura 4 – Glicemia final dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP ao final dos experimentos. Os resultados são mostrados em média ± erro padrão. ***P < 0,001 vs. GC; **P < 0,01 vs. GC; *P < 0,05 vs. GC; ###P < 0,001 vs. GD; †P < 0,05 vs. GCT.

5.1.3 Percentual de ganho de peso

Todos os animais foram pesados no início, quinzenalmente e ao final do período experimental (Figura 4). Inicialmente todos os grupos apresentaram valores similares entre si, no dia zero, não apresentando diferenças significativas. Ao longo do experimento foi acompanhado o percentual de ganho de peso e observou-se que os animais dos grupos diabéticos GD, GDT e GDTP obtiveram um ganho de peso menor que os animais dos grupos GC e GCT. Sendo GD e GDT $***P$ e $###P < 0,001$ vs. GC e GCT, respectivamente. O grupo GDTP apresentou resultado significativo $†††P < 0,001$ vs. GCT. (Figura 5)

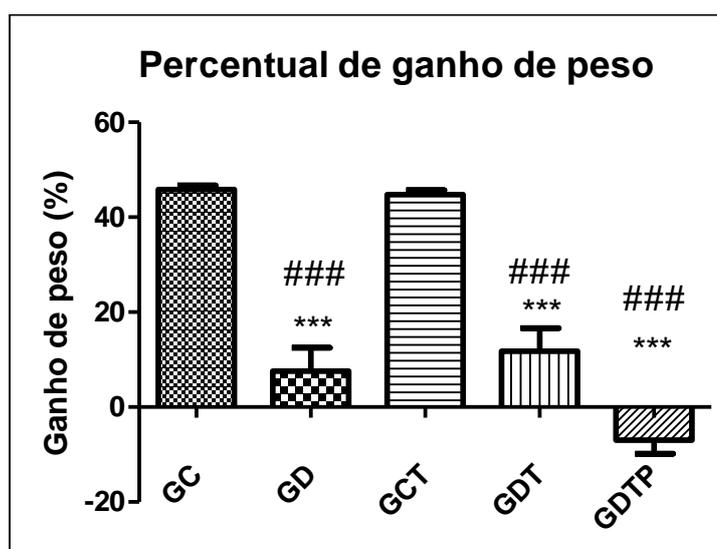


Figura 5 – Percentual de ganho de peso ao longo do período experimental para os grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP. Os resultados são exibidos em média \pm erro padrão. $***P < 0,001$ vs. GC; $###P < 0,001$ vs. GCT.

5.1.3 Polidipsia e Polifagia

Foi realizado o acompanhamento de ingestão hídrica e consumo de ração para todos os grupos, durante todo o período experimental, diariamente. O acompanhamento confirmou dados clínicos do aumento de ingestão de hídrica (Figura 5A), e consumo de ração (Figura 5B) para animais dos grupos diabéticos (GD, GDT e GDTP), caracterizando a polidipsia e polifagia presentes na DM. O treinamento, porém, foi capaz de diminuir a ingestão hídrica e o consumo de ração nos animais dos grupos GDT e GDTP, mesmo que não significativamente. O consumo de ração, inclusive, teve uma redução ainda maior no grupo GDTP quando comparado ao grupo GD.(Figura 6).

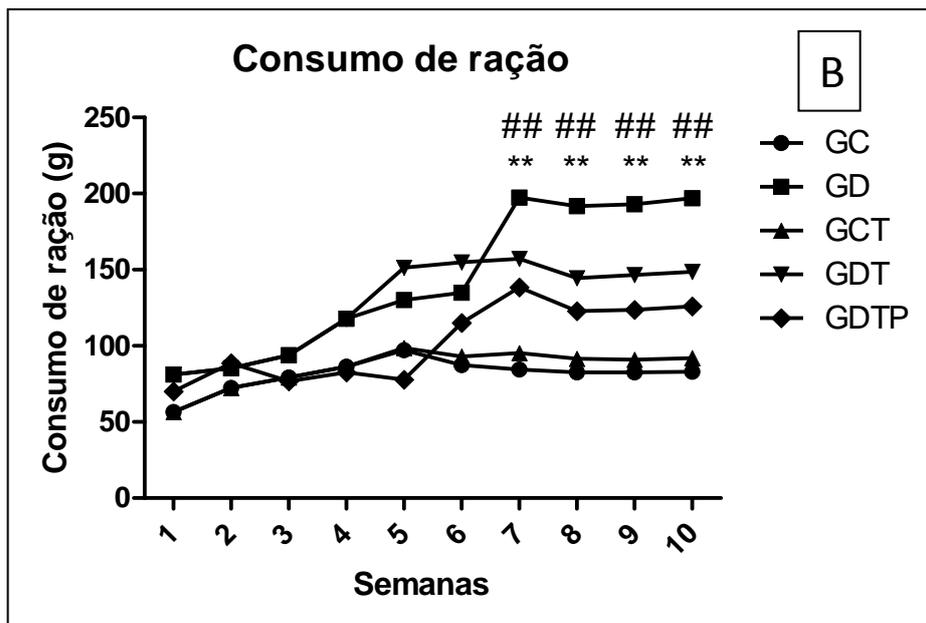
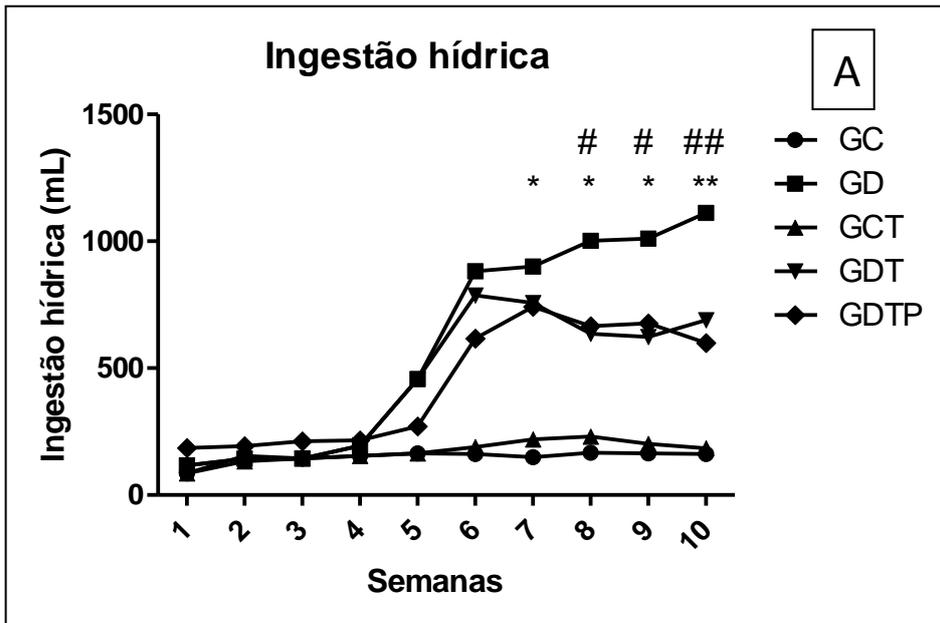


Figura 6 – Acompanhamento de ingestão de água e ração dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP. Os resultados são exibidos através da média e erro padrão. Figura 6A representa o valores para a ingestão hídrica: *P < 0,05 vs. GC nas semanas 7, 8 e 9; **P < 0,01 vs. GC nas semana 10; ###P < 0,05 vs. GCT nas semanas 8 e 9; ####P < 0,01 vs. GCT na semana 10.

Figura 6B representa o valores para o consumo de ração: $**P < 0,01$ vs. GC nas semanas 7, 8, 9 e 10; e $**P < 0,01$ vs. GCT nas semanas 7, 8, 9 e 10.

5.2 Parâmetros Bioquímicos

5.2.1 Albumina

O nível de albumina sérica apresentou-se diminuído, no sangue dos animais dos grupos diabéticos (GD, GDT e GDTP), quando comparados aos grupos controles (GC e GCT) ($p < 0,01$). O que sugere uma albuminúria, decorrente de lesão renal. O exercício se mostrou eficiente, nos grupos diabéticos treinados $***P < 0,001$ (GDT e GDTP), aumentando o nível de albumina de forma significativa $†P < 0,05$ (Figura 7).

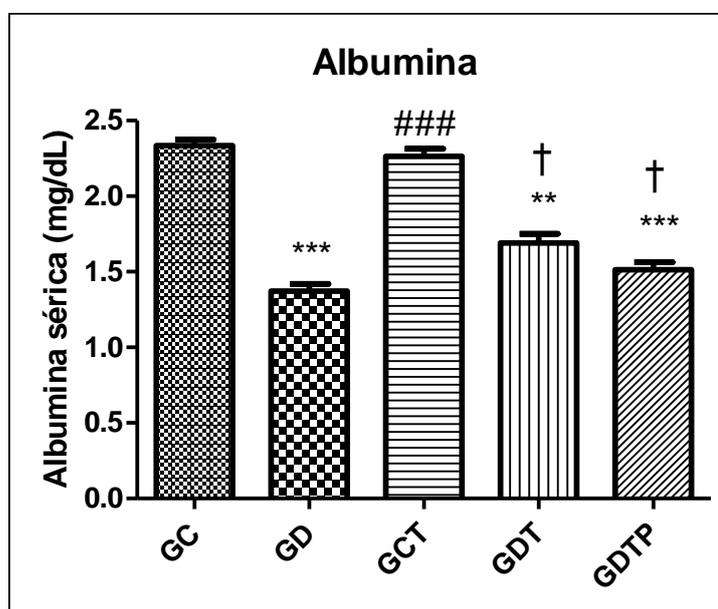


Figura 7 – Níveis séricos de albumina, no sangue, dos animais dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP. O resultado é mostrado em média \pm erro padrão. $***P < 0,001$ vs. C; $**P < 0,01$ vs. C; $*P < 0,05$ vs. C; $###P < 0,001$ vs. D; $†P < 0,05$ vs. CT.

5.2.2 Creatinina

Observou-se um aumento de creatinina sérica na urina dos animais dos grupos diabéticos (GD, GDT e GDTP), inclusive do grupo GCT, quando comparados ao grupo GC $*P < 0,05$ vs. C (Figura 8). O que pode corroborar com dados de lesão renal.

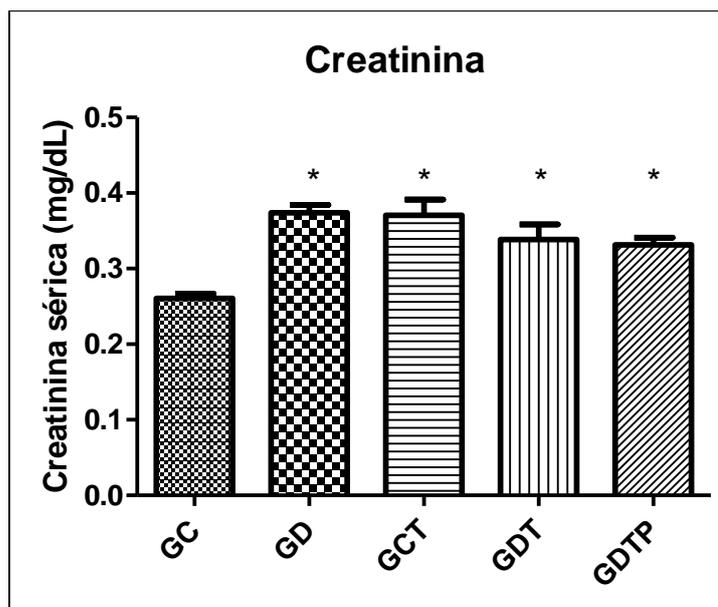


Figura 8 – Níveis séricos de creatinina no sangue dos animais dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP. O resultado é mostrado em média \pm erro padrão. *P < 0,05 vs. C.

5.3 Parâmetros morfométricos

5.3.1 Peso renal

A hipertrofia renal é um achado patológico importante, e que pode comprovar a lesão induzida pela diabetes. O grupo GD apresentou hipertrofia renal acentuada quando comparada ao grupo GC ($p < 0,05$). O grupo GD também tem hipertrofia acentuada quando comparado aos grupos GCT e GDTP ($p < 0,001$). Por outro lado, estes grupos apresentaram peso renal semelhantes ao grupo GC, resultados positivos, que mostram que não ocorreu hipertrofia renal. Pode-se observar, ainda, que o GDT ainda teve diferença significativa quando comparado ao grupo GCT ($p < 0,05$), mostrando que mesmo o exercício físico realizado apenas após a indução, foi capaz de minimizar a hipertrofia renal. Destaca-se que houve um efeito positivo ainda maior no grupo GDTP ($p < 0,001$), sugerindo assim, que o treinamento anterior à indução teve um efeito maior que o exercício aplicado, apenas após a indução (Figura 9).

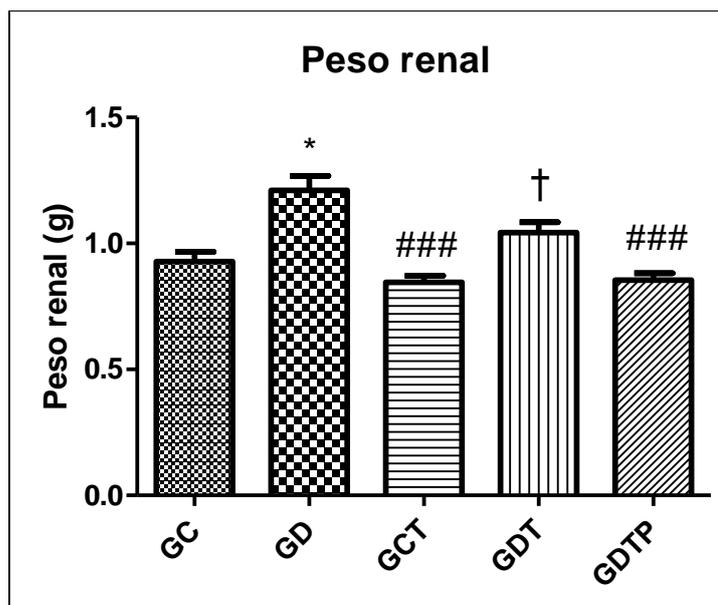


Figura 9 – Peso em gramas (g) do órgão fresco dos grupos GC, GD, GCT, GDT e GDTP. O resultado é mostrado em média \pm erro padrão. * $P < 0,05$ vs. GC; ### $P < 0,001$ vs. GD; † $P < 0,05$ vs. GCT.

5.3.2 Contagem dos glomérulos

Não houve diferença na contagem de glomérulos entre o grupo GC e o grupo GD. Entretanto, houve um aumento no número de glomérulos renais, nos grupos treinados GCT, GDT e GDTP, quando comparados ao grupo GC e ao grupo GD (Figura 10).

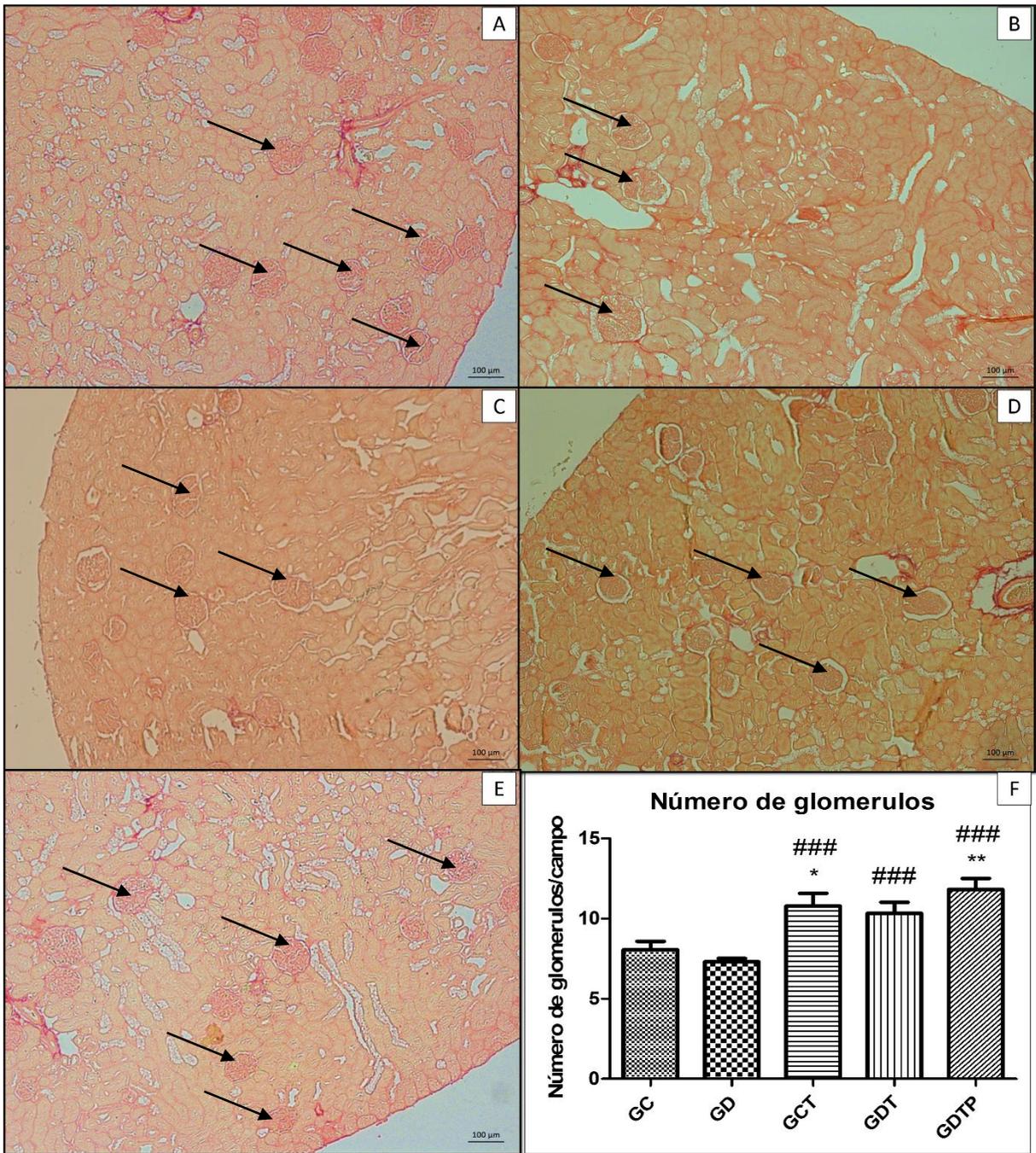


Figura 10 – Contagem de glomérulos por campo (5) para todos os grupos. A- GC; B – GD; C- GCT; D- GDT; E- GDTP; Seta apontam glomérulos renais. F – Comparação entre os grupos, resultado expresso em média ± erro padrão. Técnica de coloração: *Picrosirius red*; Barra de escala: 100 µm. *P < 0,05 e **P < 0,01 vs. GC; ###P < 0,0001 vs. GD.

5.3.3 Tamanho dos glomérulos

O grupo GD mostrou um aumento no tamanho dos glomérulos quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Já os grupos treinados GCT, GDT e GDTP não apresentaram diferença com o grupo GC, apenas com o grupo GD ($^{\#}P < 0,05$; $^{\#\#\#}P < 0,001$ vs GD). O grupo GDTP apresentou diminuição comparando-se, ainda com o grupo GCT. Sendo estes resultados positivos e que reforçam a aplicação do treinamento físico como uma forma de prevenção da hipertrofia renal. (Figura 11).

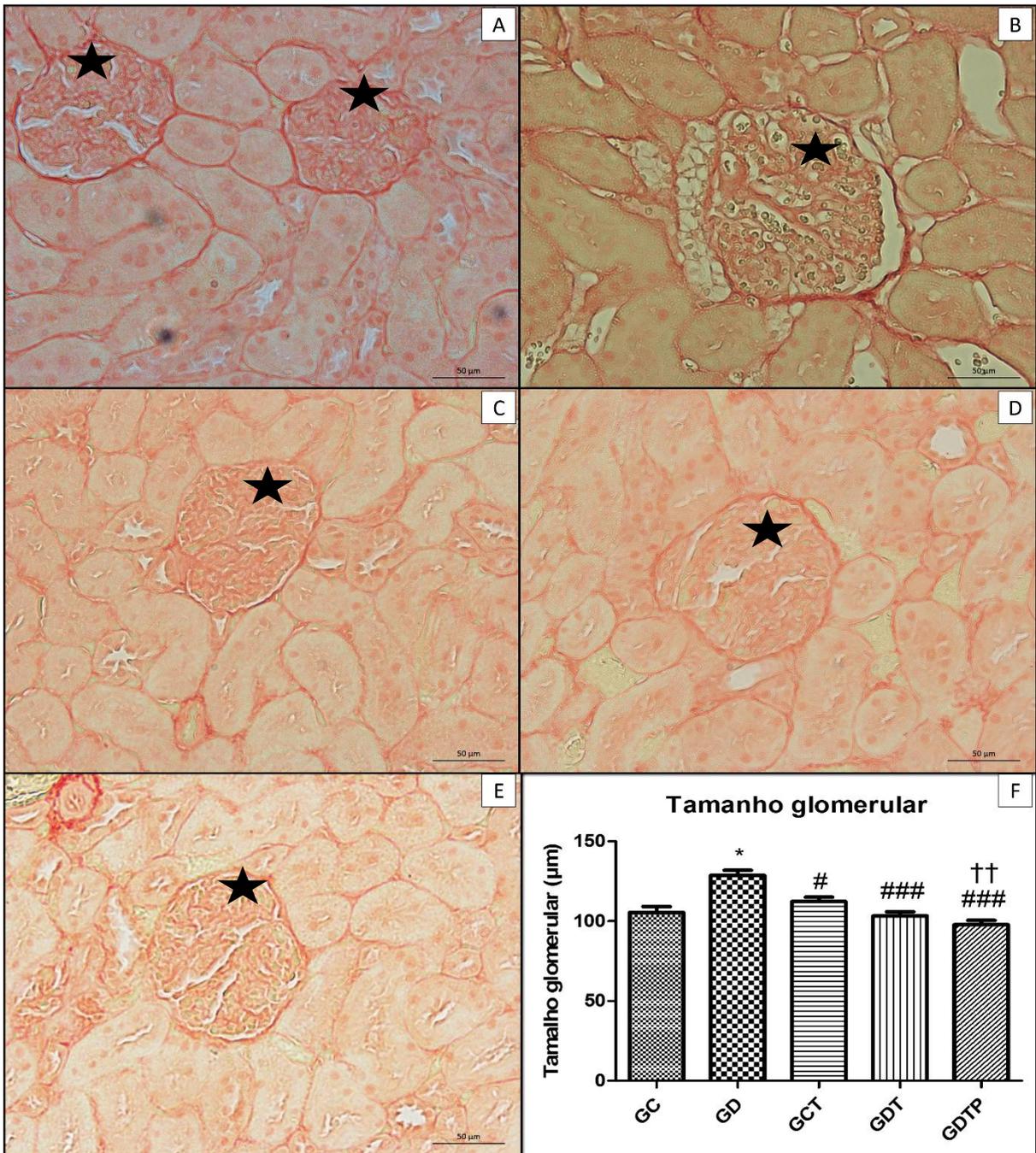


Figura 11 – Tamanho dos glomérulos (10 por lâmina) para todos os grupos. A- GC; B – GD; C- GCT; D- GDT; E- GDTP; Estrelas marcam os glomérulos. F – Comparação entre os grupos, resultado expresso em média \pm erro padrão. Técnica de coloração: *Picrossirius red*;

Barra de escala: 50 μ m. *P < 0,01 vs. GC; #P < 0,05; ###P < 0,01; ###P < 0,001 vs GD e ††P < 0,01 vs. GCT.

5.3.4 Fibrose tubulointersticial

A fibrose é uma característica de doenças renais progressivas como é o caso da ND. O grupo GD mostrou um aumento na fibrose dos glomérulos quando comparados com o grupo controle (p<0,05). O grupo GCT apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo GD (P<0,001), porém se compararmos ao grupo GC, não houve aumento. E os grupos diabéticos treinados GDT e GDTP apresentaram uma diminuição tanto quando comparado ao grupo GD (P<0,001), quanto comparado ao grupo GDTP (P<0,001) (Figura 12).

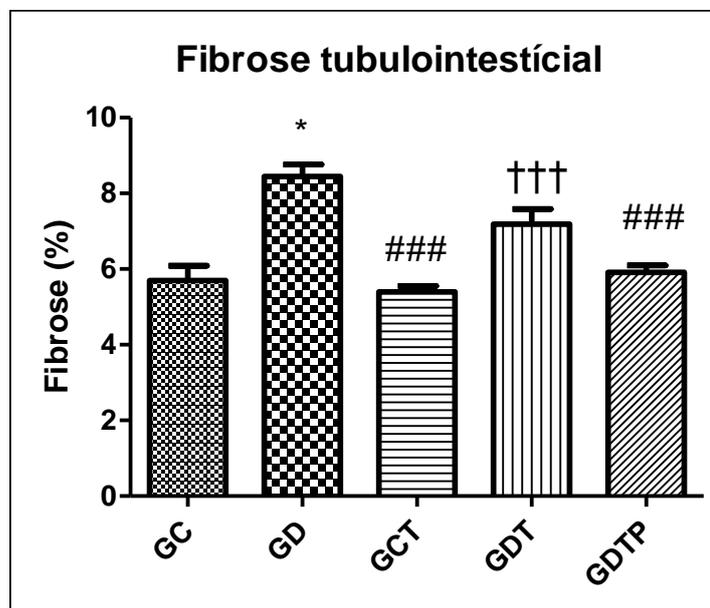


Figura 12 – Quantificação de fibrose tubulointersticial (%). *P < 0,05 vs GC; ###P < 0,001 vs GD e †††P < 0,001 vs GCT.

5.3.5 Fibrose glomerular

O grupo GD mostrou um aumento na fibrose dos glomérulos quando comparados com o grupo controle (p<0,001). E uma redução desta fibrose nos grupos diabéticos treinados GDT e GDTP (P < 0,001). O grupo GCT apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo GD (P<0,001), porém se compararmos ao grupo GC, não houve aumento. (Figura 13).

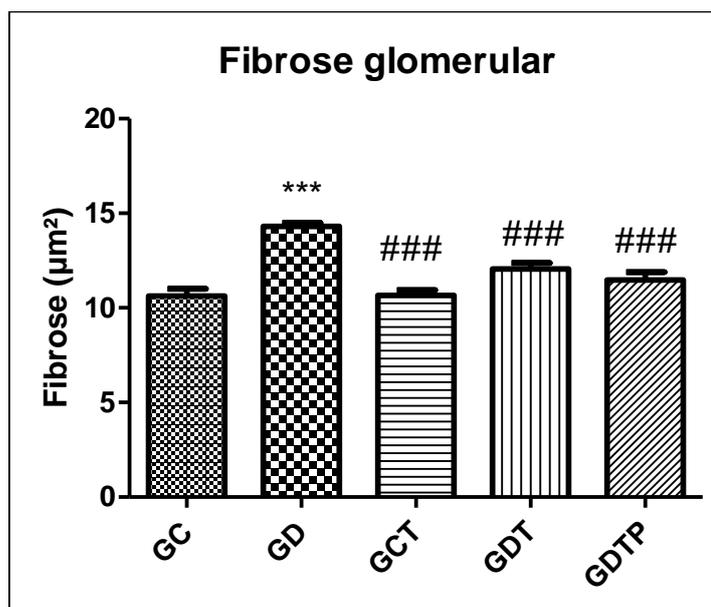


Figura 13 – Quantificação de fibrose glomerular (%). ***P < 0,001 vs GC; ###P < 0,001 vs GD.

5.4 Enzimas Antioxidantes

5.4.1 Catalase

O grupo GD mostrou uma tendência no aumento na atividade da enzima catalase, quando comparado ao grupo controle (GC). E os grupos submetidos à intervenção (GCT, GDT e GDTP) tiveram níveis da atividade mais semelhantes ao grupo GC.(Figura 14).

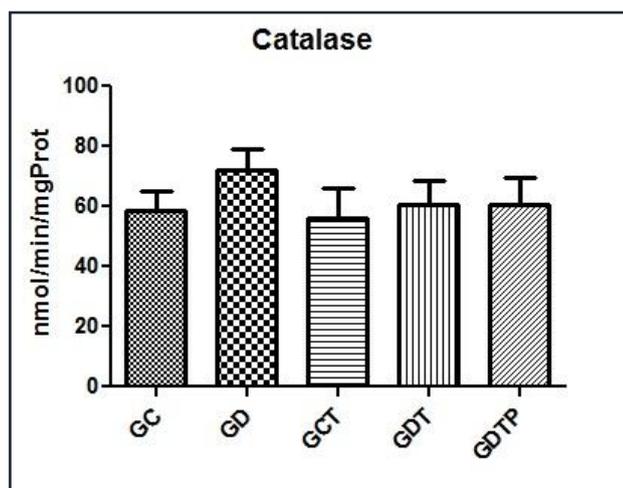


Figura 14 – Atividade da enzima Catalase.

5.4.2 Superóxido Dismutase

O grupo GD mostrou uma tendência no aumento na atividade da enzima superóxido dismutase, quando comparado ao grupo controle (GC). E os grupos submetidos à intervenção (GCT, GDT e GDTP) tiveram níveis da atividade mais semelhantes ao grupo GC.(Figura 15).

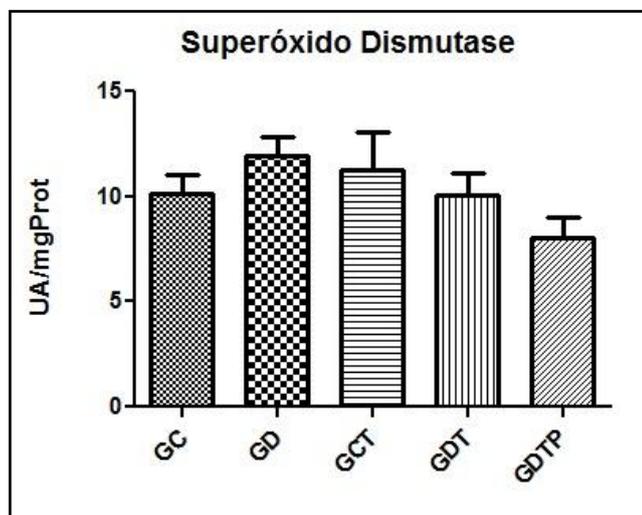


Figura 15 – Atividade da enzima Superóxido Dismutase.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou que o exercício aeróbio moderado pode prevenir e/ou tratar alterações clínicas, bioquímicas e histopatológicas decorrentes da nefropatia diabética, em um modelo experimental de DM tipo 1.

Semelhante ao que está descrito na literatura, os animais dos grupos diabéticos apresentaram a sintomatologia clássica da DM tipo 1 tais como: hiperglicemia, perda ponderal, polidipsia, polifagia e poliúria durante todo o experimento (Delfino et al, 2002; Lerco et al, 2003; Oliveira et al, 2012).

A glicose é um carboidrato utilizado como principal substrato energético para os diversos tecidos do organismo, existindo uma dependência ainda maior para algumas células ou sistema como as hemácias e o sistema nervoso central. Uma das principais regulações dos níveis de glicose no sangue ocorre com o auxílio da produção de hormônios produzidos pelo pâncreas. A captação da glicose é estimulada através da ação da insulina secretada pelas células beta pancreática. Este hormônio ao ligar-se com seu receptor, no tecido muscular gera uma cascata de reações que culminam no aumento da expressão de um tipo de transportador de glicose, o GLUT4 (Baynes John, 2015; W; CASTELLAR et al., 2011).

O exercício aeróbio moderado reduziu a glicemia dos animais diabéticos (GDT e GDTP) submetidos a esta intervenção. Possivelmente através de um aumento na expressão de GLUT4 e/ou redistribuição deste transportador para a membrana sarcolemal, visto que no presente modelo experimental, não ocorre a produção de insulina, pois as células beta pancreática são destruídas pela estreptozotocina (CASTELLAR et al., 2011; HAYASHI; WOJTASZEWSKI; GOODYEAR, 1997; JERUMS; MACISAAC, 2015; LUIZ et al., 2013; SILVA et al., 2012).

A redução de peso na DM caracteriza-se pelas alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e aumento do catabolismo proteico (RAJAEI *et al.*, 2015). Como previsto, os animais diabéticos apresentaram diminuição do ganho de peso corporal. No caso deste estudo, o exercício não foi capaz de permitir o ganho normal de peso nos grupos com

intervenção e o grupo GDTP apresentou perda de peso. É provável que a submissão ao exercício físico desde o início do período experimental possa ter contribuído para esta diferença. Tendo o exercício atuado como um controlador de ganho de peso. Não corroborando com os achados evidenciados por Silva et al (2012).

Ainda associado ao quadro clínico da DM, ocorre um aumento na ingestão de hídrica e consumo de ração. O acompanhamento mostrou que os animais dos grupos diabéticos (GD, GDT e GDTP) aumentaram o consumo de ração e ingestão hídrica confirmando a polidipsia e polifagia (MELO et al., 2012), porém o exercício não foi capaz de reverter o quadro. A poliúria não foi quantificada, sendo esta confirmada para todos os grupos diabéticos (GD, GDT e GDTP) apenas de forma qualitativa. A poliúria é uma das características clínicas da DM que ocorre devido a um aumento da concentração de glicose no filtrado glomerular. As células tubulares ficam sobrecarregadas e não conseguem reabsorver a glicose, dando origem à diurese osmótica. Produzindo assim um grande volume de urina. A polidipsia presente nos animais diabéticos deve-se à desidratação celular. Isso ocorre, em parte, porque a glicose não se difunde facilmente pelos poros das membranas celulares e o aumento da pressão osmóticas dos líquidos extracelulares, causando de água do meio intracelular para o extracelular, a fim de manter o equilíbrio osmótico (GUYTON, 2006).

Uma das primeiras mudanças características que causam a ND é a eliminação de albumina na urina. A albumina tornou-se a modalidade de seleção de proteína recomendada, devido à sua manifestação na maioria dos casos de doença renal crônica (DRC) (KOWALSKI; KRIKORIAN; LERMA, 2014). Devido a limitações do estudo não foi possível quantificar os níveis de albumina na urina. Porém foi possível observar, através da quantificação de albumina no sangue, que os animais dos grupos diabéticos apresentaram uma diminuição desta proteína, sugerindo um possível aumento de sua excreção e o que sugere, também indicação de lesão do parênquima renal. Neste caso, o exercício não foi capaz de amenizar as alterações causadas pela doença.

Foi observado em nosso estudo o exercício físico culminou em uma maior excreção de creatinina na urina dos animais dos grupos treinados (GCT, GDT e GDTP), bem como do GD, quando comparados ao grupo GC. A creatinina excretada na urina é resultado do metabolismo de proteínas, bem como da conversão não enzimática de creatina e de

fosfocreatina. A creatina é um tipo de aminoácido que pode ser proveniente da biossíntese endógena ou fontes dietéticas e é transportada para tecidos com requisitos de alta energia, como músculo esquelético durante o exercício (PETERS et al., 2014). Logo, explica-se os valores aumentados de creatinina nos grupos submetidos a intervenção. Já para os animais diabéticos é explicado pela grande perda de massa corporal característico da doença.

Em nosso estudo o grupo GD apresentou hipertrofia renal acentuada quando comparada ao grupo GC ($p < 0,05$). O que já era esperado os estágios iniciais da diabetes já são caracterizados com hipertrofia renal. A hipertrofia é um achado patológico importante, e que pode comprovar a lesão induzida pela diabetes (AMARAL et al., 2016) O grupo GD teve hipertrofia acentuada e significativa quando comparada aos demais grupos. Por outro lado, os grupos que foram submetidos ao exercício (GCT, GDT e GDTP) não tiveram hipertrofia renal. O grupo GCT mostra que o exercício aplicado não é capaz de causar algum dano renal, visto que seus resultados foram semelhantes ao grupo GC. Porém aos grupos diabéticos treinados GD e GDTP observamos o benefício do exercício, sobre a hipertrofia, tendo um efeito benéfico ainda maior no grupo diabético treinado previamente. Em geral, o treinamento de exercícios melhora função renal através da melhoria dos fatores metabólicos, principalmente através do controle da glicemia (ISHIKAWA et al., 2012).

Histologicamente, o número de glomérulos e de túbulos proximais diminui se comparado com a massa renal total. Essa diminuição é mais expressiva na região cortical. (ANTÔNIA; PAULA; TEIXEIRA, 2008). Não houve diferença na contagem de glomérulos entre o grupo GC e o grupo GD. Entretanto, existe um aumento no número de glomérulos renais, dos grupos treinados GCT, GDT e GDTP, quando comparados ao grupo GC e ao grupo GD. O número de glomérulos está relacionado com o número de nefrons e a nefrogênese (formação dos nefrons) termina após as 36 semanas de gestação. O número de glomérulos renais é algo que diminui à medida que a idade avança (ANTÔNIA; PAULA; TEIXEIRA, 2008; BERTRAM, 2013). Em nosso trabalho foi observado que os animais dos grupos treinados não tiveram essa diminuição, sugerindo que o treinamento pode retardar a diminuição do número de glomérulos renais com o tempo.

O exercício aumenta a permeabilidade glomerular influenciando hemodinâmica renal (KURDAK et al., 2010) Porém não significa que ocorre uma hipertrofia glomerular (aumento

do tamanho dos glomérulos). O que pode ocorrer é um aumento do número de células (residentes e infiltradas) dentro de um glomérulo e/ou aumento do tamanho de células individuais e/ou acumulação de matriz extracelular. A hipertrofia glomerular é observada em vários estados patológicos como a DM (ZIMANYI et al., 2009). O nosso estudo mostra que grupo GD evidenciou um aumento no tamanho dos glomérulos quando comparados com o grupo controle. Já os grupos treinados GCT, GDT e GDTP não apresentaram diferença com o grupo GC, apenas com o grupo GD O grupo GDTP apresentou diminuição comparando-se, ainda com o grupo GCT. Sendo estes resultados positivos e que reforçam a aplicação do treinamento físico como uma forma de prevenção da hipertrofia glomerular.

Estudos mostram que o exercício regular diminui a expansão mesangial e que a proteção renal como resultado do exercício físico pode ser confirmado por estudo morfológico glomerular (BOOR et al., 2009; LUIZ et al., 2013)). Na ND a produção de matriz extracelular, da qual se compõe o tecido mesangial e a síntese da membrana basal glomerular, supera a degradação, ocorrendo um acúmulo dessa matriz tanto no mesangium glomerular, quanto intersticial tubular, culminando em cicatrização renal excessiva e a característica fibrose (KAIMORI et al., 2017). E fibrose é a chave Patologia subjacente que representa a via comum final para doença renal em estágio final (ESRD) (HILLS; SQUIRES, 2011). E Embora a ND fosse tradicionalmente considerado uma doença principalmente glomerular, atualmente e amplamente aceita que a função renal também está correlacionada com o grau de fibrose tubulointersticial renal (KAIMORI et al., 2017; PRABHAKAR et al., 2007). Em nosso estudo o grupo GD mostrou um aumento na fibrose dos glomérulos quando comparados com o grupo GC e o GCT. O exercício aeróbio demonstrou ter diminuído os índices de fibrose nos grupos diabéticos treinados GDT e GDTP, apresentando uma diminuição quando comparados ao grupo diabético que não sofreu intervenção. Resultados semelhantes foram encontrados para os achados de fibrose tubulointersticial, mostrando que o exercício foi capaz de prevenir a formação de tecido fibrótico nos glomérulos e túbulos. Possivelmente pelo controle nos níveis glicêmicos anteriormente mostrados.

Os nossos resultados apontam uma tendência no aumento da atividade enzimática da CAT no tecido renal frente à DM tipo 1, bem como na atividade enzimática da SOD, porém sem diferença significativa. E uma tendência na diminuição da atividade destas enzimas frente ao exercício físico. A maioria dos estudos consultados para elaboração deste trabalho aponta

que a diabetes provoca redução na atividade enzimática da SOD (HURDAG et al., 2006; FORGIARINI JUNIOR et al., 2009; GAO et al., 2014). Em relação à atividade enzimática da CAT, alguns estudos mostram que a DM promove sua redução (SAMARGHANDIAN; AFSHARI; SADATI, 2014), enquanto outros trabalhos reportam o oposto (GUMIENICZEK et al., 2002).

A diminuição da atividade enzimática da CAT apresentada pelos animais diabéticos leva ao acúmulo do seu substrato, o H_2O_2 . Essa explicação ganha mais evidência pelo fato da SOD ter sofrido alteração pela DM tipo 1. (KAUL et al., 1996).

O exercício físico agudo (uma sessão) pode induzir danos oxidativos. No entanto, quando praticado de forma regular, ele parece melhorar os sistemas de defesa antioxidante, baseando-se em alguns estudos com animais. O que fortalece a ideia de que o exercício físico atue como protetor contra as espécies reativas de oxigênio (ATALAY; LAAKSONEN, 2002).

A modesta atuação do exercício físico sobre os nossos resultados pode ser devido ao tempo de treinamento dos animais, que foi de três semanas.

7. CONCLUSÃO

- A diabetes desencadeou um quadro de nefropatia diabética, o qual foi evidenciado pelas características clínicas pré-estabelecidas na literatura. Como a Polidipsia, poliúria e Polifagia. Assim como o aumento da creatinina na urina e diminuição da albumina sérica no sangue associado ao quadro de hipertrofia renal;
- A nefropatia diabética foi também observada através de alterações na arquitetura renal, como tamanho e densidade glomerular, fibrose glomerular e fibrose tubulointersticial;
- O exercício físico mostrou-se eficiente na maioria das variáveis avaliadas. Mostrando significativo em alguns parâmetros importantes para a prevenção e ou tratamento aos danos renais causados pela DM. Como o controle glicêmico, responsável por desencadear a maioria dos demais processos patológicos. A atividade física possivelmente é uma proteção contra o desenvolvimento da nefropatia, evidenciada pela manutenção do peso renal dos grupos diabético treinado similar ao grupo controle;
- Apesar de não ter sido obtido resultados significativos, frente à análise das enzimas antioxidantes, é possível sugerir que um tratamento mais prolongado possa vir a se tornar mais uma forma de tratamento coadjuvante da DM tipo 1;
- Estudos avaliando um perfil crônico da diabetes e com outras modalidades de exercício terapêutico são necessários para se avaliar mais detalhadamente as modificações morfofuncionais do rim que ocorrem frente a essa patologia de impacto mundial na saúde da população.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. **Image processing with ImageJ Biophotonics international**<http://www.photonics.com/>, 2004. Disponível em: <<http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/204900>>. Acesso em: 2 jun. 2014
- ACLAND, A. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. November 2009, p. 5–16, 2014.
- AMARAL, L. S. DE B. et al. Beneficial effects of previous exercise training on renal changes in streptozotocin-induced diabetic female rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 4, p. 437–445, 2016.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 37 Suppl 1, n. Supplement_1, p. S81–90, 1 jan. 2014.
- ANNADURAI, T. et al. Variations in erythrocyte antioxidant levels and lipid peroxidation status and in serum lipid profile parameters in relation to blood haemoglobin A1c values in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes research and clinical practice**, 28 maio 2014.
- ANTÔNIA, M.; PAULA, V. DE; TEIXEIRA, A. O Envelhecimento Como Fator Determinante Nas the Ageing Determinated Factor on the Kidney Architecture Changes. p. 41–51, 2008.
- ARMENDA, J. Differential gene expression of cytokines in acute and chronic liver injury. **Hepatology Research**, v. 16, p. 181–194, 2000.
- BANKI, E. et al. Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. **Peptides**, v. 42, p. 125–30, abr. 2013.
- BARCELLOS, F. C. et al. Effects of exercise on kidney function among non-diabetic patients with hypertension and renal disease: randomized controlled trial. **BMC nephrology**, v. 13, p. 90, jan. 2012.
- BAYNES, John W. *Bioquímica médica / John W. Baynes, Marek H. Dominiczak. - 4. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2015*
- BELOTTO, M. F. et al. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. **Clinical and experimental immunology**, v. 162, n. 2, p. 237–43, nov. 2010.
- BERTRAM, J. F. Estimating glomerular number: Why we do it and how. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 11, p. 785–788, 2013.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.72: 248-254, 1976.

BORTOLIN, R. H. et al. Protection against T1DM-Induced Bone Loss by Zinc Supplementation: Biomechanical, Histomorphometric, and Molecular Analyses in STZ-Induced Diabetic Rats. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0125349, 2015.

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

BONDY PK. Distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono. In: Beeson PB, McDermott W, editors. *Tratado de medicina*. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1973. v.2, p.1627-43

CASTELLAR, A. et al. Collagen and reticular fibers in left ventricular muscle in diabetic rats: Physical exercise prevents its changes? **Tissue and Cell**, v. 43, n. 1, p. 24–28, fev. 2011.

Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? **J Pharmacol Pharmacother**. 2013;4(4):303-6.

Cohen, J. *Statistical power analysis for the behavioural sciences*. 2nd ed. 1988, pp. 280-7.

DABELEA, D. et al. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA*, v. 311, n. 17, p. 1778–86, 7 maio 2014.

DE LA GARZA-RODEA, A. S. et al. Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 49, n. 1, p. 40–4, jan. 2010.

DANTAS JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci Heal Sci*. 2006; 28: 165–170

DE OLIVEIRA, R. R. et al. Aerobic physical training restores biomechanical properties of Achilles tendon in rats chemically induced to diabetes mellitus. **Journal of diabetes and its complications**, v. 26, n. 3, p. 163–8, 2012.

Faul F, Erdfelder E, Lang AG, et al. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behav Res Methods**. 2007;39(2):175-91.

GAO, C. et al. MG132 ameliorates kidney lesions by inhibiting the degradation of Smad7 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Journal of diabetes research**, v. 2014, p. 918396, jan. 2014.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J. F. P.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 273, n. 6, p. E1039-1051, 1 dez. 1997.

HILLS, C. E.; SQUIRES, P. E. The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 131–139, 2011.

HUANG, H.-H. et al. Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. **Experimental diabetes research**, v. 2011, p. 481427, jan. 2011.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes, 7 ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 01/02/16.

ISHIKAWA, Y. 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. 702948, jan. 2012.

JACKSON, M. J. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? **Free radical biology & medicine**, v. 44, n. 2, p. 132–41, 15 jan. 2008.

JAGTAP, A. G.; PATIL, P. B. Antihyperglycemic activity and inhibition of advanced glycation end product formation by Cuminum cyminum in streptozotocin induced diabetic rats. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48, n. 8-9, p. 2030–6, [s.d.].

JHA, J. C.; JANDELEIT-DAHM, K. A M.; COOPER, M. E. New Insights Into the Use of Biomarkers of Diabetic Nephropathy. **Advances in chronic kidney disease**, v. 21, n. 3, p. 318–326, maio 2014.

JONNALAGADDA, V. G. et al. The Prelude on Novel Receptor and Ligand Targets Involved in the Treatment of Diabetes Mellitus. v. 4, n. 3, p. 209–217, 2014.

JUNG, G. S. et al. Renoprotective Effect of Gemigliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Mice. **Diabetes & metabolism journal**, 21 abr. 2016.

JERUMS, G.; MACISAAC, R. J. Diabetic nephropathy: How does exercise affect kidney disease in T1DM? **Nature reviews. Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 324–5, jun. 2015.

KAIMORI, J.-Y. et al. Visualization of kidney fibrosis in diabetic nephropathy by long diffusion tensor imaging MRI with spin-echo sequence. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5731, 18 dez. 2017.

KATSAROU, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Publishing Group**, v. 3, p. 1–18, 2017.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 244–257, jan. 2013.

KANCHAN, D. M. et al. Renoprotective effect of diosgenin in streptozotocin induced diabetic rats. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 2, p. 370–377, 2016.

KOH, K.-H. et al. Effect of exercise on albuminuria in people with diabetes. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 16, n. 8, p. 704–9, nov. 2011.

KOWALSKI, A.; KRIKORIAN, A.; LERMA, E. V. Diabetic nephropathy for the primary care provider: new understandings on early detection and treatment. **The Ochsner Journal**, v. 14, n. 3, p. 369–379, 2014.

KURDAK, H. et al. **The effects of regular aerobic exercise on renal functions in streptozotocin induced diabetic rats.** **Journal of sports science & medicine**, 2010.

LI, Z. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2014, p. 289264, jan. 2014.

LONGO, U. G. et al. Oxygen species and overuse tendinopathy in athletes. **Disability and rehabilitation**, v. 30, n. 20-22, p. 1563–71, jan. 2008.

LUIZ, R. D. S. et al. Exercise attenuates renal dysfunction with preservation of myocardial function in chronic kidney disease. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55363, jan. 2013.

- LI, Z. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2014, p. 289264, jan. 2014.
- LONGO, U. G. et al. Oxygen species and overuse tendinopathy in athletes. **Disability and rehabilitation**, v. 30, n. 20-22, p. 1563–71, jan. 2008.
- MELO, M. G. D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 8, n. 4, p. 1–6, 2012.
- MESTRY, S. N. et al. Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by *Punica granatum* Linn. leaves extract. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 4–11, 2016.
- MISSERI, R.; MELDRUM, K. K. Mediators of fibrosis and apoptosis in obstructive uropathies. **Current urology reports**, v. 6, n. 2, p. 140–5, mar. 2005.
- OLIVEIRA, I. et al. Isolated total RNA and protein are preserved after thawing for more than twenty-four hours. **Clinics**, v. 67, n. 3, p. 255–259, 2012.
- PALMA, H. E. et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 386, n. 1-2, p. 199–210, jan. 2014.
- PETERS, B. A. et al. Creatinine, arsenic metabolism, and renal function in an arsenic-exposed population in Bangladesh. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014.
- PRABHAKAR, S. et al. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 18, n. 11, p. 2945–52, nov. 2007.
- RAN, J. et al. Low protein diet inhibits uric acid synthesis and attenuates renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of diabetes research**, v. 2014, p. 287536, jan. 2014.
- SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition**. 3rd. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 2344
- SHARMA, K.; MCGOWAN, T. A. TGF-beta in diabetic kidney disease: role of novel signaling pathways. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 11, n. 1-2, p. 115–23, 2000.

- SILVA, E. et al. Ventricular remodeling in growing rats with experimental diabetes: The impact of swimming training. **Pathology, research and practice**, v. 209, n. 10, p. 618–26, out. 2013.
- SILVA, K. A. D. S. et al. Previous Exercise Training Has a Beneficial Effect on Renal and Cardiovascular Function in a Model of Diabetes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–10, 2012.
- SIU, B. et al. Reduction in yte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: prevention by lipoic acid treatment. **BMC nephrology**, v. 7, p. 6, jan. 2006.
- SMITH, A. C. et al. EXERCISE IN KIDNEY DISEASE AND DIABETES : p. 52–58, 2012.
- TEIXEIRA-LEMOS, E. et al. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. **Cardiovascular diabetology**, v. 10, p. 12, jan. 2011.
- YANG, S. et al. Probucol ameliorates renal injury in diabetic nephropathy by inhibiting the expression of the redox enzyme p66Shc. **Redox Biology**, v. 13, n. December 2016, p. 482–497, 2017.
- ZIMANYI, M. A. et al. Nephron number and individual glomerular volumes in male Caucasian and African American subjects. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 8, p. 2428–2433, 2009.

ANEXO 1



PROTOCOLO N.º 014/2015

Professor/Pesquisador: *BENTO JOÃO DA GRAÇA AZEVEDO ABREU*

Natal (RN), 06 de maio 2015.

Certificamos que o projeto intitulado “**Influência do exercício aeróbio moderado em alterações de estresse oxidativo causadas pela nefropatia diabética em ratos**”, protocolo 014/2015, sob a responsabilidade de BENTO JOÃO DA GRAÇA AZEVEDO ABREU, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN, em reunião de **24 de abril de 2015**.

Vigência do Projeto	OUTUBRO 2016
Número de Animais	67
Espécie/Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Peso/Idade	200-250g / 55 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Centro de Ciências da Saúde UFRN

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa for concluída.


Josy Carolina Covan Pontes
Coordenadora da CEUA



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

1) PROTOCOLO Nº : 014/2015

2) TÍTULO DO PROJETO:

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO AERÓBIO MODERADO EM ALTERAÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADAS PELA NEFROPATIA DIABÉTICA EM RATOS

3) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Bento João da Graça Azevedo Abreu

4) DATA DO PARECER:

08/04/2015

5) SUMÁRIO DO PROJETO:

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Verificar a influência do exercício físico aeróbio nas alterações do estresse oxidativo proporcionadas pela Diabetes Mellitus num modelo experimental de ratos.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:

Título

Adequado

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Introdução e Justificativa

Adequadas

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

Adequado

Comentários

Orçamento e fonte financiadora

Adequados

Comentários

Referências Bibliográficas

Adequadas

Comentários

9) O PROJETO DESTA PESQUISA ESTA ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Adequado

Comentários

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de severidade:

Brando

Médio

Elevado

Justifique:

Alguns animais serão induzidos à diabete através de injeção intraperitoneal de estreptozitocina a uma dose de 60 mg/kg de peso corporal, podendo ocorrer choque hipovolêmico.

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral:

Sim

Não

Substituição de Metodologia:

Sim

Não

Aprimoramento da Metodologia:

Sim

Não

Acomodação e manutenção dos animais:

Adequado

Inadequado

Manipulação dos animais:

Adequado

Inadequado

Analgesia dos animais (se aplicável):

Adequado

Inadequado



Universidade Federal do Rio Grande do Norte COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Anestesia dos animais (se aplicável):

Adequado

Inadequado

Eutanásia dos animais (se aplicável):

Adequado

Inadequado

11) RECOMENDAÇÃO:

Aprovado

Recomendações

Com Pendência

Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

O projeto apresenta adequação aos princípios éticos da CEUA-UFRN e da Legislação brasileira.

- Serão utilizados 67 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com 55 dias de idade, pesando entre 200-250 g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Os animais permanecerão alojados em caixas de propileno providas de bebedouro e comedouro durante período de ambientação de uma semana. Em seguida, serão alocados individualmente em gaiolas metabólicas, mantidas em condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e receberão ração e água *ad libitum*.
- Após jejum prévio de 24hs, os animais dos grupos DS e DT terão a DM-1 induzida por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolvida em solução tampão de citrato 0,1 M (0,1 M, pH 4,5) a uma dose de 60 mg/kg de peso corporal.
- O treinamento físico aeróbio será realizado por meio de esteira motorizada Insight® Ltda (São Paulo/Brasil).
- Os animais passarão por um protocolo de ambientação à esteira durante duas semanas antes do início dos experimentos. Após esse período, os grupos serão separados de forma homogênea e somente os animais que possuem a habilidade de correr no aparelho serão mantidos nos experimentos.
- O protocolo será estabelecido da seguinte forma: na primeira semana (semana de adaptação) a velocidade será de no máximo de 5 m/min durante 10 min/dia. Nas sete semanas seguintes, será adicionado maiores duração e intensidade, até que seja atingida a velocidade máxima de 13 m/min e a duração máxima de 60 min. Durante cada sessão de treinamento, a partir da segunda semana, serão divididos quatro estágios progressivos: (a) período de aquecimento (3 a 5 min); (b) zona intermédia (14 a 20 min), (c) da zona de formação (10 a 30 min), e (d) período de resfriamento (3 a 5 min).
- Após o período de treino, os animais serão alocados entre 2-5 dias em gaiolas metabólicas situadas no Biotério do CCS/UFRN para coleta de urina. Os animais de todos os grupos serão eutanasiados com dose letal de tiopental intraperitoneal ($>90\text{mg/kg}$ de peso) associado à lidocaína (2%), seguida de toracotomia para a retirada bilateral dos rins.
- Descrição de todas as análises que serão realizadas.