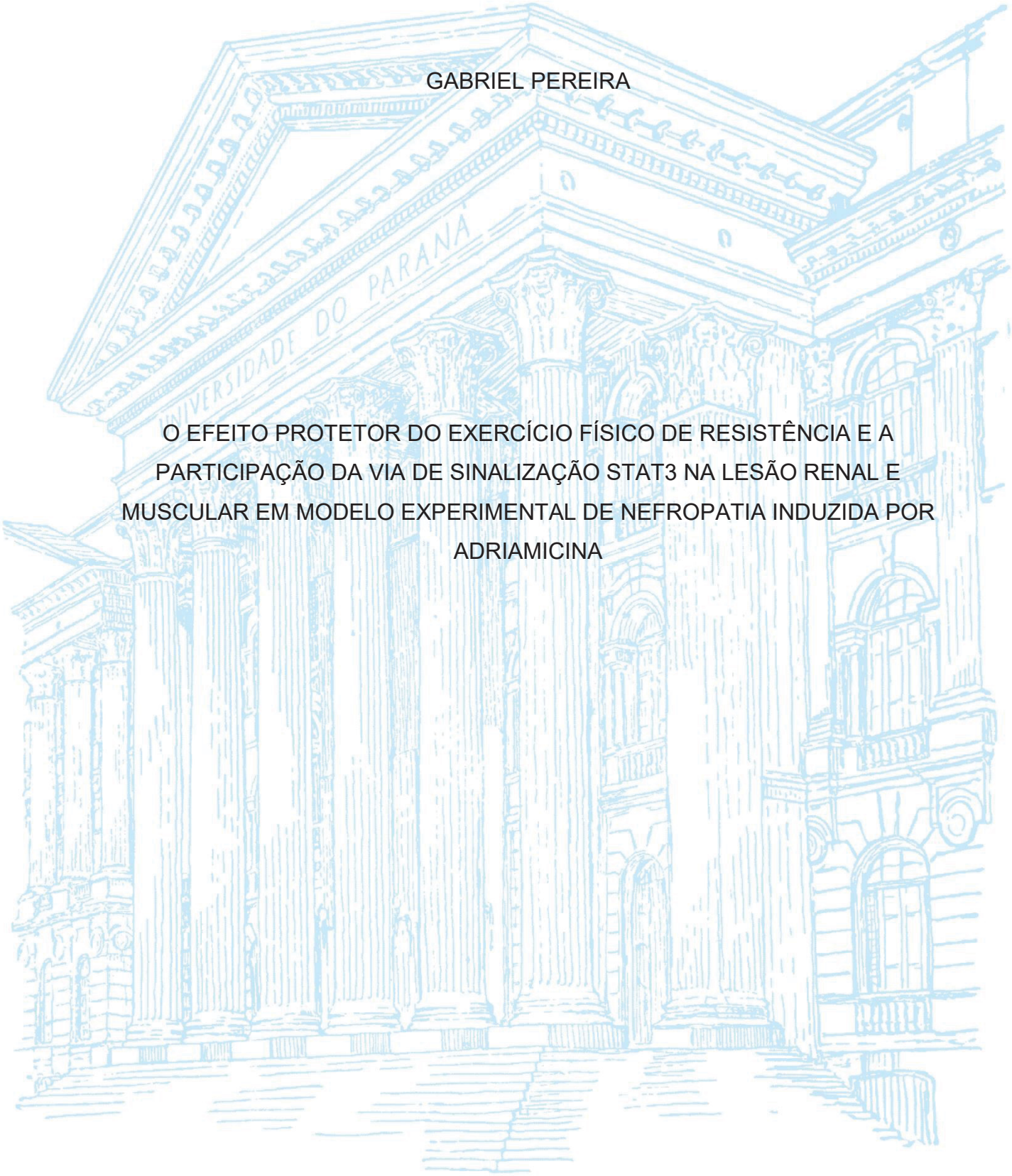
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL PEREIRA



O EFEITO PROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA E A PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 NA LESÃO RENAL E MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA

CURITIBA

2021

GABRIEL PEREIRA

O EFEITO PROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA E A PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 NA LESÃO RENAL E MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Pereira, Gabriel
O efeito protetor do exercício físico de resistência e a participação da via de sinalização STAT3 na lesão renal e muscular em modelo experimental de nefropatia induzida por adriamicina. / Gabriel Pereira. – Curitiba, 2021.
88 p.: il.

Orientador: Rafael Luiz Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Glomerulonefrite. 2. Exercício físico. 3. Fator de transcrição STAT3. 4. Doxorrubicina. I. Título. II. Pereira, Rafael Luiz. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (22. ed.) 616.612

ATA Nº46

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FISIOLOGIA

No dia dezenove de novembro de dois mil e vinte e um às 09:30 horas, na sala (defesa apresentada virtualmente), Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Fisiologia , foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **GABRIEL PEREIRA**, intitulada**: "O EFEITO PROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA E A PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 NA LESÃO RENAL E MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA."**, sob orientação do Prof. Dr. RAFAEL LUIZ PEREIRA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISIOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: RAFAEL LUIZ PEREIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), DANILO CANDIDO DE ALMEIDA (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO), DÉBORA TAVARES DE RESENDE E SILVA (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, RAFAEL LUIZ PEREIRA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 19 de Novembro de 2021.

Assinatura Eletrônica
17/01/2022 15:03:43.0
RAFAEL LUIZ PEREIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
17/01/2022 16:25:51.0
DANILO CANDIDO DE ALMEIDA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica
24/01/2022 09:47:41.0
DÉBORA TAVARES DE RESENDE E SILVA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 143099
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 143099

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISIOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **GABRIEL PEREIRA** intitulada: **"O EFEITO PROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA E A PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 NA LESÃO RENAL E MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA."**, sob orientação do Prof. Dr. RAFAEL LUIZ PEREIRA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Novembro de 2021.

Assinatura Eletrônica
17/01/2022 15:03:43.0
RAFAEL LUIZ PEREIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
17/01/2022 16:25:51.0
DANILO CANDIDO DE ALMEIDA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica
24/01/2022 09:47:41.0
DÉBORA TAVARES DE RESENDE E SILVA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 143099
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 143099

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão, que sempre demonstraram apoio sobre as decisões tomadas até aqui.

A todos os membros da minha família que sempre perguntam *“Como andam as coisas em Curitiba?”.*

A Sofía, por estar presente, permitir e ocasionar os melhores momentos de toda esta história.

Aos colegas de laboratório, pela excelente convivência que temos. A Thabata, por ter ensinado os primeiros protocolos experimentais quando fui aceito como aluno do laboratório e estar presente desde então. Aos colegas da iniciação científica, que entre outras contribuições realizaram o protocolo de exercício e permitiram a realização deste trabalho.

A todos os colegas que fizeram parte da trajetória de amadurecimento científico até o momento.

A todos os colegas de departamento, alunos e professores, que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos laboratórios de Neurofisiologia, Metabolismo Celular e Plasticidade Morfofuncional que forneceram apoio teórico e prático para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira, por todos os ensinamentos teóricos e práticos, da escrita a bancada, durante esses anos todos.

Ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

A CAPES e CNPq pelo apoio ao desenvolvimento científico.

A Universidade Federal do Paraná e todos seus membros que resistem dia após dia.

RESUMO

Doenças glomerulares representam grande parcela das lesões primárias capaze de evoluir para um quadro de doença renal crônica. Dentre as doenças glomerulares, se destaca a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) por sua prevalência e capacidade de progressão para o tratamento dialítico em mais de 50% dos casos em um período de 10 anos. Além da lesão renal, pacientes renais apresentam disfunções musculares, como atrofia de fibras, havendo o aumento da taxa de mortalidade em DRC quando associada a redução da massa muscular. Atuando tanto na progressão da lesão renal como na resposta muscular ao exercício, a via de sinalização STAT3 se encontra altamente ativada no tecido renal fibrótico, favorecendo mecanismos de progressão da lesão renal, e no tecido muscular em quadros de caquexia, ocasionando atrofia de fibras musculares. Em contrapartida à redução da massa muscular presente em pacientes renais crônicos, a pratica de exercício físico de resistência (EFR) é capaz de promover ganho da massa muscular, além de levar a modulações inflamatórias importantes no quadro de lesão do tecido renal. Marcadores de lesão renal e musculares foram analisados para verificar os efeitos da inibição de STAT3 e da ação do EFR sobre o modelo experimental de nefropatia por adriamicina. A lesão induzida por Adriamicina ocasionou redução do peso corporal dos grupos experimentais, sem haver alterações em relação ao EFR ou a inibição da via STAT3. Os níveis urinários de albumina/creatinina causados por adriamicina apresentaram um deslocamento do pico observado nos animais sedentários do período de 7 dias (2,44 (9,46); $p<0,05$), para o período de 14 dias devido a inibição da via STAT3 (3,10 (2,61); $p<0,05$), ou pela prática de EFR (1,79 (2,92); $p<0,05$). A inibição da via STAT3 impediu a detecção de albuminúria nos períodos de 7 e 14 dias dos animais de exercício físico ($p>0,05$). Análises histomorfométricas musculares revelaram aumento da deposição lipídica intramuscular causadas pela Adriamicina no protocolo sedentário, sendo que o EFR prévio é capaz de atenuar esta resposta (3,4±0,12 *vs* 2,9±0,19; $p<0,05$). Alterações na área média das fibras musculares e variações na distribuição ou composição muscular de fibras do tipo I, IIa e IIb não foram observadas. A área de fibras do tipo IIb se encontrou reduzida em resposta a Adriamicina, sendo que a inibição da via STAT3 em conjunto com o EFR prévio atenuaram a atrofia da fibra. A análise de componentes nucleares do tecido muscular revelou queda na presença de núcleos centrais nas fibras musculares em resposta a Adriamicina. Valores de capilar/fibra, núcleos/fibra e domínio nuclear se encontram aumentados em resposta ao exercício, com uma redução deste efeito promovido pelo exercício quando administrado Adriamicina. A administração conjunta de Adriamicina e Stattic, inibidor da via STAT3, em grupos submetidos ao EFR prévio é capaz de atenuar a redução de marcadores nucleares observados para a Adriamicina. Desta forma, os resultados obtidos apontam uma relação entre os danos renais e musculares no modelo de glomeruloesclerose experimental induzida por adriamicina, havendo a participação da via de sinalização STAT3 e de respostas ao exercício físico prévio no modelo experimental.

Palavras-chave: Glomeruloesclerose. Exercício físico. Fator de transcrição STAT3. Adriamicina. Lesão muscular.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) incidence has increased over the years, with glomeruli diseases representing a large portion of primary kidney injury capable of evolving into a chronic condition. Of the glomerular diseases, focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) stands out due to its prevalence and ability to progress to dialysis in more than 50% of cases over a 10-year period. Concomitantly with kidney damage, renal patients show muscle dysfunction, such as myofiber atrophy and muscle mass reduction, with higher mortality rate in CKD patients associated with greater muscle mass reduction. Acting on both the progression of kidney injury and muscle metabolism in response to exercise, STAT3 signaling pathway is highly activated in the fibrotic kidney tissue, being involved with the mechanisms of progression of kidney injury, and during cancer muscle cachexia, leading to myofibers atrophy. In contrast to the reduction in muscle mass observed in chronic renal patients, resistance physical training (RT) may lead to muscle mass gain, in addition to an important inflammatory modulation. Renal and muscle lesion markers were accessed to verify the effects of STAT3 inhibition and RT prior to Adriamycin injection in an experimental model of FSGS. Adriamycin lead to body weight loss in experimental groups, without changes in relation to previous exercise practice or inhibition of the STAT3 pathway. Urinary albumin/creatinine ratio detected peak caused by adriamycin delayed from 7 days for the sedentary protocol (2,44 (9,46); $p<0,05$) to 14 days for STAT3-inhibited group (3,10 (2,61)); $p<0,05$) and RT protocol (1,79 (2,92); $p<0,05$). STAT3 inhibition prevented the urinary albumin/creatinine detection at days 7 and 14 for the Adriamycin-induced mice from RT protocol. Muscle histomorphometric analyzes revealed an increase in intramuscular lipid deposition caused by Adriamycin in sedentary mice, with previous exercise being able to attenuate this response (3,4±0,12 *vs* 2,9±0,19; $p<0,05$). Changes in the average area of muscle fibers were not observed, as well as variations in the myofibers distribution or muscle composition of type I, IIa and IIb fibers. On the other hand, the area of type IIb fibers was found to be reduced in response to Adriamycin, and the inhibition of the STAT3 pathway together with previous exercise attenuated the fiber atrophy. Analysis of nuclear components of muscle tissue revealed a decrease of central nuclei in muscle fibers in response to Adriamycin. Capillary/fiber, nuclei/fiber and nuclear domain values are increased in response to exercise, with Adriamycin causing a reduction of the exercise effect. Altogether, administration of Adriamycin and Stattic, an inhibitor of the STAT3 pathway, in groups submitted to previous RT is able to attenuate the reduction of muscle nuclear markers caused by Adriamycin. Thus, the results obtained indicate a relationship between kidney and muscle damage in the model of experimental glomerulosclerosis induced by adriamycin, with the participation of the STAT3 signaling pathway and responses to previous physical exercise in the experimental model.

Key-words: Glomeruloesclerosis. Physical training. Transcription factor STAT3. Adriamycin. Muscle dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A via de sinalização STAT3. 20
Figura 2 – Vias de ativação da interleucina-6: clássica e trans-sinalização. 21
Figura 3 – Esquema do desenho experimental. 28
Figura 4 - Redução de peso corporal em resposta a ADR nos protocolos de exercício e sedentário.. 36
Figura 5 - Razão albumina/creatinina urinária de 0, 7 e 14 dias após administração de adriamicina. 38
Figura 6 - Razão albuminúria/creatininúria de animais do grupo ADR e exercício de resistência nos intervalos de 7 e 14 dias após administração de adriamicina. 38
Figura 7 - Albumina/creatinina urinária dos grupos ADR submetidos ao exercício de resistência e sedentários. 39
Figura 8 - Aumento do peso muscular dos animais Controle EFR. 40
Figura 9 - Deposição lipídica no músculo gastrocnêmio é aumentada no grupo ADR. 42
Figura 10 - Alterações nas fibras musculares dos animais sedentários. 43
Figura 11 - Alterações nas fibras musculares dos animais do protocolo de EFR. 44
Figura 12 - Distribuição das fibras musculares por sua área de secção transversa. .45
Figura 13 - Composição muscular por tipo de fibra de animais sedentários e do protocolo de EFR. 46
Figura 14 - Presença de núcleos centrais, número de núcleos por fibra e domínio nuclear nas fibras musculares do gastrocnêmio dos grupos sedentários. 48
Figura 15 - Presença de núcleos centrais, número de núcleos por fibra e domínio nuclear nas fibras musculares do gastrocnêmio dos grupos Controle e ADR que foram submetidos ao exercício de resistência. 49
Figura 16 - Variação de peso corporal dos animais tratados com Stattic. 51
Figura 17 - Comparação da variação de peso corporal dos animais ADR e ADR + Stattic. 51
Figura 18 - Inibição da STAT3 em camundongos que receberam adriamicina dos protocolos sedentário e exercício. 52

Figura 19 - Albumina/creatinina urinária dos animais do grupo ADR + Stattic que foram submetidos ao exercício de resistência e sedentários.. 54
Figura 20 - Medidas de tamanho e peso do rim esquerdo dos grupos experimentais. 56
Figura 21 - Peso do gastrocnêmio direito dos animais dos grupos ADR e ADR + Stattic 14 dias após a administração de adriamicina. 57
Figura 22 - Deposição de lipídeos intramusculares no músculo gastrocnêmio. 58
Figura 23 - A via de sinalização STAT3 participa da regulação da expansão e diferenciação de células satélites. 60
Figura 24 - Distribuição das fibras do gastrocnêmio por área de secção transversa do grupo Stattic. 62
Figura 25 - Distribuição das fibras do gastrocnêmio por área de secção transversa do grupo ADR + Stattic. 63
Figura 26 - Composição muscular por tipo de fibras 66
Figura 28 - Músculos gastrocnêmio corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. .68
Figura 29 - Número de capilares por fibra muscular. 69
Figura 30 - Núcleo por fibra muscular. 70
Figura 31 - Ação do exercício e drogas sobre a presença de núcleos centrais. 72
Figura 32 - Alterações no domínio nuclear dos grupos ADR e ADR + Stattic. 72
Figura 33 - Análise de componentes principais dos parâmetros musculares. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação histológica de GESF 17
Tabela 2 – Presença e ação de IL-6 em células do tecido renal 22
Tabela 3 – Divisão de grupos experimentais 27
Tabela 4 - Resultados dos testes de carga máxima 35
Tabela 5 - Área de secção transversa por tipo de fibra 47
Tabela 6 - Parâmetros séricos da funcionalidade renal 54
Tabela 7 – Área e diâmetros das fibras musculares dos grupos sedentários. 64
Tabela 8 – Área e diâmetros das fibras musculares dos grupos de Exercício 64
Tabela 9 - Área média das fibras musculares por tipo de fibra dos animais sedentário 66
Tabela 10 - Área média das fibras musculares por tipo de fibra dos animais de exercício de resistência 67

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ADR	– Adriamicina
CM	– Carga máxima
CLCF1	– Fator de citocina tipo-cardiotropina 1
DAP	– Doença arterial periférica
DRC	– Doença renal crônica
EFR	– Exercício físico de resistência
GESF	– Glomeruloesclerose segmentar e focal
IL-6R	– Receptores de membrana para IL-6
JAK	– Janus kinase
PCA	– Análise de componentes principais
pSTAT3	– Sinal transdutor e ativador de transcrição 3 fosforilado
ROS	– Espécies reativas de oxigênio
STAT	– Sinal transdutor e ativador de transcrição
sIL-6R	– Receptor solúvel para IL-6
suPAR	– Receptor ativador de plasminogênio tipo-uroquinase solúvel
uPAR	– Receptor ativador de plasminogênio tipo-uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL 16
1.2 VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 19
1.3 LESÕES MUSCULARES NO PACIENTE RENAL 23
1.4 EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA 24
2 OBJETIVOS 26
2.1 OBJETIVOS GERAIS 26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26
3 MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1 ANIMAIS 27
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL 27
3.3 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA 28
3.3.1 Adaptação 28
3.3.2 Teste de Carga Máxima 29
3.4 INDUÇÃO DA NEFROPATIA 29
3.5 INIBIÇÃO DA STAT3 30
3.6 COLETA DE URINA 30
3.7 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAIS 30
3.8 ANÁLISES SÉRICAS DE URÉIA, ALBUMINA E TRIGLICERÍDEOS 31
3.9 MENSURAÇÃO DA ALBUMINA/CREATININA URINÁRIA 31
3.9.1 Quantificação de albumina por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 31
3.9.2 Dosagem de creatinina urinária 32
3.10 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO 32
3.10.1 Secção e preparação de lâminas histológicas 32
3.10.2 Tipagem e contagem de fibras musculares pela técnica de NADH-TR 32
3.10.3 Alterações em número de núcleos, capilares e diâmetros das fibras musculares pela técnica de hematoxilina e eosina 33
3.10.4 Deposição de lipídeos intramusculares pela técnica de Sudan black 33
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA 34
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 35
4.1 A NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA E O EXERCÍCIO FÍSICO 35

4.1.1 Teste de carga máxima 35
4.1.2 Peso corporal 36
4.1.3 Albuminúria 37
4.1.4 Análises histomorfométricas do músculo gastrocnêmio 39
4.1.4.1 Peso muscular e deposição lipídica.....40
4.1.4.2 Área, densidade e número de capilares por fibras musculares 43
4.1.4.3 Área e distribuição das fibras musculares 44
4.1.4.4 Tipagem de fibras musculares.....45
4.1.4.5 Alterações nucleares nas fibras musculares 47
4.2 INIBIÇAO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 50
4.2.1 Peso corporal 50
4.2.2 A lesão renal após inibição da via STAT3 52
4.2.3 Alterações histomorfométricas 56
4.2.3.1 Peso muscular e deposição lipídica.....56
4.2.3.2 Área de secção transversa e distribuição de fibras musculares 59
4.2.3.3 Tipagem de fibras e número de capilares.....64
4.2.3.4 Alterações nucleares 70
4.2.3.5 Análise de componentes principais de parâmetros morfométricos musculares 73
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 77
REFERÊNCIAS.....78
APÊNDICE 1 – RAZÃO ALBUMINA/CREATININA URINÁRIA DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMETAIS 86
APÊNDICE 2 – CONTRIBUIÇÕES DE COMPONENTES PRINCIPAIS 87

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL

Doenças glomerulares correspondem a cerca de 25% dos casos de injúria renal prevalentes em indivíduos adultos, sendo uma das mais comuns causas de danos ao tecido renal entre crianças e indivíduos jovens (KDIGO, 2021).

Segundo último censo divulgado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, estima-se que o Brasil conta com um total de 139.691 pacientes em diálise, dos quais 79% são subsidiados pelo Sistema Único de Saúde – SUS (NEVES et al., 2021). Tanto no Brasil quanto no restante do mundo a prevalência de pacientes em diálise vem aumentando, sendo que o Brasil apresenta maior incidência de pacientes dialíticos em relação à média da América Latina e Europa (NEVES et al., 2021).

Primeiramente descrita clinicamente como uma manifestação histológica associada a síndrome nefrótica com alta resistência a esteroides (CHURG; HABIB; WHITE, 1970), a Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) compreende um grupo de lesões glomerulares acompanhada do aumento da excreção urinária de proteínas – proteinúria – e comumente acompanhada por um quadro de síndrome nefrótica – presença de proteinúria e hipoalbuminemia, muitas vezes acompanhados de dislipidemia e edema (KDIGO, 2021).

O quadro de lesão observado em casos de GESF se apresenta por um padrão histológico reconhecido em biópsias do tecido renal, onde um número reduzido de glomérulos (focal) e porções distintas do tufo glomerular (segmentar) apresentam lesão fibrótica (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014).

Conforme discutido por Rosenberg e Kopp (2017), a GESF parte de uma lesão causada aos podócitos – células altamente especializadas e de proliferação limitada que compõem a barreira de filtração glomerular– para a manifestação histológica via diferentes causas. Quando não é possível determinar o motivo da lesão podocitária inicial, o quadro passa a ser classificado como GESF primária.

Por outro lado, a presença de lesão aos podócitos associadas a um quadro de infecção viral, uso de medicamentos ou predisposição genética, com avanço ao quadro histológico de lesão presente na GESF, garante a caracterização do quadro como GESF secundária, ou adaptativa. Em sua maioria, quadros de GESF adaptativa

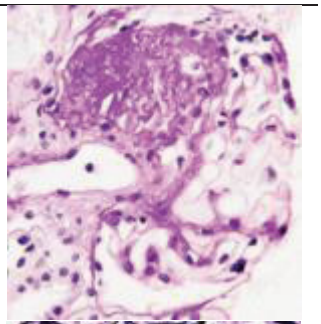
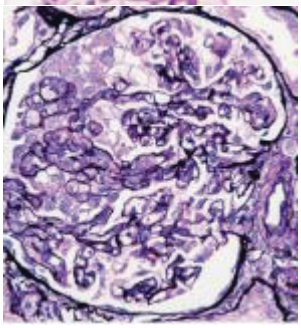
são encontrados após períodos de hiperfiltração e hipertensão glomerular (ROSENBERG; KOPP, 2017).

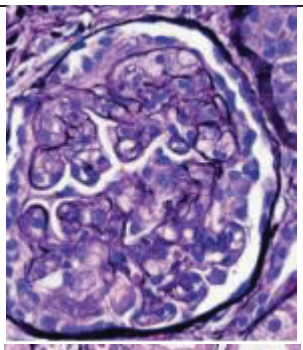
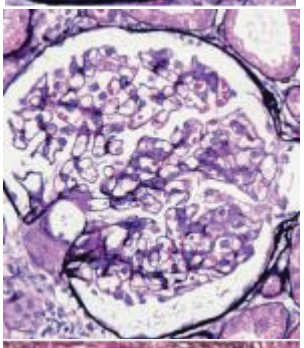
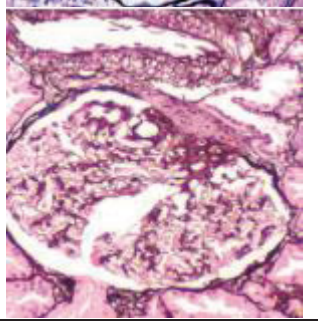
Pelo caráter progressivo da GESF, de 50 a 75% dos pacientes desenvolvem a necessidade de tratamento de diálise ou transplante renal em um período de 10 anos, enquanto a evolução dos quadros de GESF quando associados a síndrome nefrótica pode ocorrer em até 3 anos (PUDUR et al., 2016).

A fim de padronizar as diferentes manifestações histológicas observadas em glomérulos afetados por GESF, D'Agati *et al*. (2004) propuseram a classificação em cinco variações histológicas de lesão: GESF não especificada de outra forma, GESF colapsante, GESF celular, GESF perihilar e de lesão de ponta, ou do tipo *tip* (*tip lesion*). Estas distintas classificações histológicas podem fornecer informações sobre o prognóstico do quadro clínico, enquanto a progressão do quadro e aumento das lesões histológicas pode levar a uma evolução dos subtipos de GESF para o subtipo de lesão não especificada de outra forma (FOGO, 2015).

Esta classificação é reconhecida como classificação de Columbia, e engloba as lesões observadas tanto em GESF primária quanto em GESF secundária (D'AGATI et al., 2004). Suas especificações sobre o padrão morfológico da lesão estão contidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação histológica de GESF

Subtipo	**Manifestação histológica**	**Possível implicação**	
GESF não especificada de outra forma	Esclerose segmentar	Progressão normal	
GESF colapsante	Colapso do tufo glomerular, hiperplasia de podócitos	Pior prognóstico	

Subtipo	Manifestação histológica	Possível implicação	
GESF celular	Proliferação endocapilar, eventual hiperplasia de podócitos	Lesão de estágio inicial	
Lesão de ponta (*tip lesion*)	Esclerose do tufo ao polo do túbulo proximal	Melhor prognóstico	
Variante perihilar	Esclerose e hialinose ao polo vascular	Pode refletir GESF secundária	

FONTE: Adaptado de Fogo (2015).

A presença de determinada variação histológica manifesta diferentes respostas pelo paciente. Pacientes com a variação colapsante de GESF possuem os piores prognósticos e menores índices de remissão de proteinúria. Contudo, pacientes com a presença de lesão do tipo *tip* tendem a responder melhor ao tratamento com imunossupressores (FOGO, 2015). Estas diferenças de manifestações, também como resposta ao tratamento, têm sido averiguadas desde sua sugestão, e dados atuais suportam as variações clínicas observadas para os subtipos de GESF e a utilidade da classificação de Columbia (TSUCHIMOTO et al., 2020).

Em um importante estudo, Savin *et al*., (1996) apontaram a presença de um fator circulante na instalação da lesão glomerular. Em sua investigação, observaram que a exposição de glomérulos isolados de ratos ao soro de pacientes com GESF recorrente (isto é, novo diagnostico de GESF em pacientes após transplante renal) causava grande aumento da permeabilidade glomerular a albumina.

Interessantemente, a exposição de glomérulos ao soro de pacientes com síndrome nefrótica responsiva ao tratamento de corticoesteróides não resultou em aumento da permeabilidade glomerular a albumina, indicando um efeito específico do quadro de GESF (SAVIN et al., 1996).

Diversos estudos envolvendo o aumento da permeabilidade glomerular a albumina em resposta a exposição do tecido ao soro afetado suportam a hipótese da presença de um fator circulante atuante no desenvolvimento da glomerulopatia (LIM et al., 2016; WEN; SHAH; CAMPBELL, 2018). Atualmente, apesar dos avanços científicos e esforços para a identificação do fator circulante responsável pela instalação do quadro primário, este fator continua desconhecido (KDIGO, 2021). Dentre os fatores candidatos se destacam o receptor ativador de plasminogênio tipo-uroquinase (uPAR) e sua versão solúvel (suPAR), fator de citocina tipo-cardiotropina 1 (CLCF1), entre outras citocinas (WEN; SHAH; CAMPBELL, 2018).

A albumina excretada pelo glomérulo danificado resulta também em dano tubular, levando a ativação da comunicação destas células, que por vias parácrinas, ocasiona o aumento da produção de marcadores fibróticos no tecido, agravando o quadro de lesão renal (BIENAIME et al., 2016).

Um dos componentes responsáveis pela ativação e comunicação parácrina das células tubulares no processo de fibrose durante a lesão renal, a STAT3 (sinal transdutor e ativador de transcrição 3), também se apresenta como um mediador da lesão podocitária e comunicação parácrina entre podócitos e células epiteliais do tecido renal, ambas envolvidas em processo de lesão glomerular (BIENAIME et al., 2016; DAI et al., 2013). Aliado a redução de marcadores como fibrose intersticial e proteinúria, a inativação de STAT3 no tecido renal também se demonstrou capaz de atenuar a lesão observada pelo aumento da permeabilidade de albumina glomerular em resposta a exposição ao soro de pacientes com GESF, ou a CLCF1 (SHARMA et al., 2015).

1.2 VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3

O STAT3 é um fator de transcrição pertencente a família de proteínas do complexo Janus kinase/sinal transdutor e ativador de transcrição (JAK/STAT), composta por quatro membros JAK e sete diferentes STAT. Responsável pela regulação de processos como crescimento celular, angiogênese e resposta imune,

proteínas da família STAT possuem a função dupla de 1) comunicação em resposta a ativação de receptores da membrana e de 2) ativação da transcrição de genes no núcleo celular. As proteínas STAT se encontram residentes em forma latente no citoplasma e, após ativação de receptores, passam por fosforilação pelas proteínas JAK, se tornando biologicamente ativas (Figura 1) (LI et al., 2007).

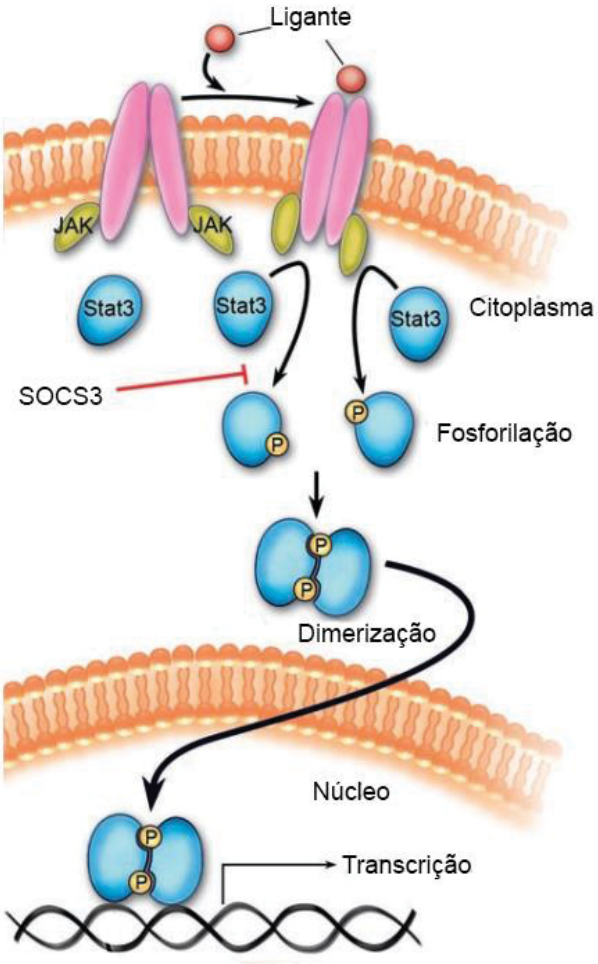


Figura 1 – A via de sinalização STAT3. Fonte: Adaptado de PEDRANZINI; LEITCH; BROMBERG (2004)

Sua ativação pode ocorrer por diferentes reguladores, como citocinas, especialmente IL-6, quimiocinas e fatores de transcrição. Uma das principais formas de ativação da via STAT3 acontece pela ligação de IL-6 a seu receptor. A sinalização por IL-6 acontece por duas vias agonistas da citocina, via clássica e via de trans-sinalização (CHEN et al., 2019).

Através da via clássica, receptores de membrana para IL-6 (IL-6R) são ativados desencadeando a homodimerização de gp130, um componente transdutor de sinal, e uma consequente ativação de JAK para a fosforilação de proteínas da família STAT, como STAT3 (CHEN et al., 2019). Pela via de trans-sinalização, IL-6 se liga a uma versão solúvel de seu receptor (sIL-6R), produzido através de mecanismos proteolíticos ou de *splicing* alternativo de seu mRNA, resultando em uma forma de IL-6R sem domínios transmembrana e citosólico (SU; LEI; ZHANG, 2017). Essa forma solúvel de receptor para IL-6 (sIL-6R) é predominantemente secretado por hepatócitos e células hematopoiéticas ao plasma (Figura 2) (CHEN et al., 2019; SCHELLER et al., 2011).

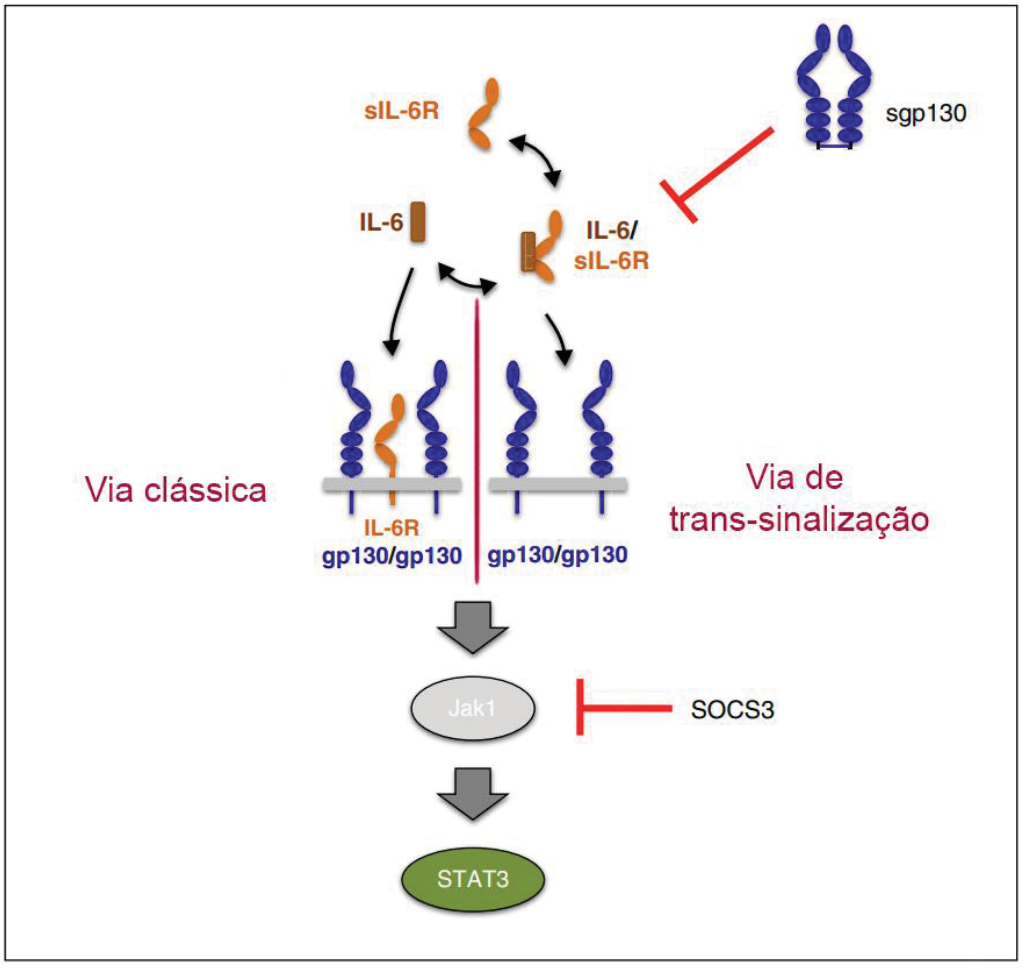


Figura 2 – Vias de ativação da interleucina-6: clássica e trans-sinalização. Fonte: adaptado de GARBERS; APARICIO-SIEGMUND; ROSE-JOHN (2015)

Esta divisão da sinalização por IL-6 reflete diferenças nas respostas ao estímulo causado pela IL-6, sendo creditado a via de trans-sinalização os efeitos

mediadores de respostas inflamatórias crônicas (GARBERS; APARICIO-SIEGMUND; ROSE-JOHN, 2015). A presença e efeitos da IL-6 nos tipos celulares presentes no tecido renal estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Presença e ação de IL-6 em células do tecido renal

Tipo celular	Produção de IL-6	Expressão de IL-6R	Efeitos da IL-6
Podócitos	Sim	Sim	Promove proliferação, diferenciação
Células mesangiais	Sim	Não	Amplia proliferação, acúmulo de matriz, aumenta síntese e liberação de MCP-1
Células endoteliais	Sim	Não	Induz vasoconstrição e disfunção do endotélio, aumenta produção de ROS
Células tubulares	Sim	Fraca	Estimula atrofia tubular, geração de colágeno tipo I, acelera o processo de fibrose tubulointersticial

MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos 1; ROS: Espécies reativas de oxigênio. Fonte: SU; LEI; ZHANG (2017)

Um dos principais mecanismos de regulação endógena da família STAT se dá pelos supressores de sinalização de citocina (SOCS), que se apresentam induzidos imediatamente após ativação de STAT por citocinas. Esta família de reguladores é capaz de impedir a fosforilação de STAT através da ligação a proteínas JAK quinase ou a seus receptores associados. Além deste mecanismo, a regulação de STAT pode ocorrer pela inibição da ligação de STAT ao DNA, sua desfosforilação e modificações pós-traducionais (PACE et al., 2019).

Seu papel no desenvolvimento e progressão de doenças devido aumento de sua ativação tem sido atual alvo de discussões. Em casos de doença renal, estudos recentes demonstram que a ativação de STAT3 está envolvida com a regulação de diferentes genes envolvidos com ativação de fibroblastos e vias de sinalização pró-fibróticas, além da participação da via nos quadros de proteinúria e infiltrado de células inflamatórias no tecido renal (PACE et al., 2019).

Em pacientes com GESF, os níveis de STAT3 em sua forma fosforilada (pSTAT3) se apresenta elevado (TAO et al., 2018). Em quadros de DRC, esta ativação ocorre especialmente nas regiões tubulares e vasculares da organização renal (BIENAIME et al., 2016; ZHENG et al., 2019). Aliado a isto, a análise transcriptômica

do tecido renal indica uma supra regulação de mRNA de componentes alvo da ativação de STAT3 (TAO et al., 2018).

No tecido muscular, a via de sinalização STAT3 participa do controle da diferenciação e proliferação de células satélites – células troncos especializadas do tecido muscular – e células miogênicas – células diferenciadas que participam ativamente da regeneração do tecido muscular – frente a estímulos que levam a ativação deste tecido. Contudo, a ativação excessiva e prolongada da via de sinalização STAT3 está relacionada com mecanismos de perda de massa muscular e degradação proteica, como encontrado em casos de caquexia (GUADAGNIN; MÁZALA; CHEN, 2018).

1.3 LESÕES MUSCULARES NO PACIENTE RENAL

Acompanhado de má nutrição, a presença de inflamação, acidose, desequilíbrios endócrinos e outros fatores podem acarretar em distúrbios do metabolismo proteico que afetam a musculatura esquelética. Este conjunto de fatores que compõem um quadro de alterações nutricionais e de composição corporal, como atrofia muscular, são comuns em pacientes renais crônicos, afetando especialmente pacientes dialíticos (OLIVEIRA et al., 2019). A perda de massa muscular em quadros de Doença Renal Crônica (DRC) tem sido relacionada com redução da qualidade de vida, aumento da incidência de depressão, presença de outros distúrbios metabólicos e aumento da mortalidade dos pacientes (OLIVEIRA et al., 2019; WATSON et al., 2015).

Quando o balanço entre a degradação proteica e sua síntese é afetado, seja em casos de denervação, caquexia, envelhecimento, ou um conjunto de alterações metabólicas como presente em quadros de DRC, e a taxa de síntese de proteínas no tecido muscular é ultrapassada pela degradação proteica, ocorre a atrofia muscular. A atrofia muscular envolve a redução do tamanho de fibras musculares devido uma perda total de proteínas e organelas. O quadro de atrofia aguda observada em diferentes quadros clínicos acontece pela intensa ativação de vias degradadoras de proteínas nas células do tecido muscular. Apesar de acometer localmente o tecido muscular, esta alteração local do metabolismo proteico afeta sistemicamente a homeostasia de proteínas (SCHIAFFINO et al., 2013)

Como forma de contrapor estas alterações musculares observadas na DRC, a prática de exercício de resistência pode favorecer mecanismos de hipertrofia, aumento da força e redução de fibras atrofiadas no tecido muscular, entre outras melhoras relacionadas a qualidade de vida em pacientes renais crônicos (CHEEMA et al., 2014).

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA

A prática de exercício físico está associada com uma redução do risco de doenças não infecciosas, como doenças cardiovasculares, doenças caracterizadas por quadro de inflamação crônica, câncer e infecções virais e bacterianas e melhora da qualidade de vida e prevenção de DRC (CAMPBELL; TURNER, 2018; KOUFAKI et al., 2015). O uso do exercício físico como instrumento para modulação da resposta inflamatória em DRC fornece uma via de modulação dos níveis de marcadores inflamatórios envolvidos na lesão renal. A prática prolongada de exercício físico promove a redução de IL-6 plasmática, um dos principais agentes inflamatórios em diversos quadros, incluindo DRC, e aumento de IL-10, um contraponto a ação da IL-6 (VIANA et al., 2014).

Entre os diferentes tipos de exercício, o exercício físico de resistência (EFR) – o exercício realizado pela contração muscular contrária a uma resistência externa – tem se demonstrado uma boa alternativa para pacientes com DRC, apresentando alta retenção aos programas de treinamento (WATSON et al., 2015), apesar do quadro de resistência muscular comprometida de pacientes crônicos.

Dos marcadores que conferem prognóstico ao paciente, a perda de massa muscular em DRC tem sido associada com aumento da mortalidade e perda da qualidade de vida. Além de promover aumento da massa muscular e modulação da resposta inflamatória, o exercício de resistência atua no sistema antioxidante, conferindo regulação sobre a produção de superóxidos na musculatura esquelética (SCHEFFER et al., 2012; WATSON et al., 2017).

Dos diferentes modelos experimentais de exercício físico de resistência, se destaca o descrito por Hornberger & Farrar, 2004. Este modelo utiliza uma escada vertical, onde o animal é submetido a repetições de escalada com ou sem pesos anexados em sua cauda. Conforme apontado por Neto (2016), este modelo tem sido amplamente utilizado nos últimos anos e vem se tornando um padrão para estudos

em modelo experimental de diferentes aspectos do exercício físico de resistência. O modelo oferece fácil execução de experimentos e desnecessidade de estímulo ou reforço positivo ao animal. Contudo, parâmetros importantes da execução do modelo possuem alta variação entre os estudos, ou seja, não são padronizados (NETO, 2016).

Além da intensidade de carga, frequência e número de repetições do exercício, que constituem uma parte ativa do protocolo, parâmetros como adaptação e familiarização dos animais ao equipamento podem afetar o desempenho e efeito do treinamento ao longo do protocolo (NETO, 2016).

Para o processo de adaptação dos animais diferentes protocolos já foram testados. Sua importância se dá pelo processo de aprendizagem dos animais, observado pela redução do tempo de escalada dos animais em resposta a um período de adaptação (CASSILHAS et al., 2013)

Outro parâmetro dissidente se refere ao uso de cargas correspondente ao peso corporal do animal ou o estabelecimento de um teste de carga máxima (CM). Testes de CM consistem no uso de diferentes cargas anexadas a cauda dos animais, podendo variar entre os estudos, que progressivamente alcançam um ponto onde os animais não são capazes de finalizar uma escalada completa (HORNBERGER JR.; FARRAR, 2004; NETO, 2016), fornecendo um valor individual sobre a intensidade do exercício para cada animal. A partir de estabelecida a capacidade máxima de carga, os experimentos conduzidos passam a utilizar progressivamente valores parciais do máximo determinado.

Deste modo, o estudo dos efeitos do exercício de resistência sobre o quadro de lesão renal pode auxiliar no melhor entendimento do envolvimento do sistema muscular e de vias ativadas pelo exercício físico sobre a proteção do tecido renal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de lesão renal e alterações musculares a partir do modelo de nefropatia por adriamicina (ADR) frente a inibição da via de sinalização STAT3 e o efeito da prática do exercício físico de resistência como um fator pré-condicionante a indução da lesão renal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a razão albumina/creatinina urinária induzida por ADR e alterações na razão albumina/creatinina causadas pelo exercício físico de resistência e bloqueio da via de sinalização STAT3.
- Analisar níveis de ureia, triglicerídeos e albumina sérica no modelo experimental induzido por ADR e alterações nestes parâmetros séricos causados pelo exercício físico de resistência e bloqueio da via de sinalização STAT3.
- Analisar alterações nas fibras musculares causadas por ADR e em resposta ao exercício físico de resistência e bloqueio da via de sinalização STAT3.
- Avaliar as alterações nucleares das fibras musculares em resposta ao exercício físico, inativação da via STAT e lesão por ADR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para análise do efeito do exercício físico de resistência e da participação da via STAT3 na progressão de GESF, foram utilizados camundongos (*Mus musculus)* machos da linhagem BALB/c, mantidos pelo Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos no biotério em caixas coletivas, em ciclo artificial de claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada e suprimento de água e alimento *ad libitum*.

Os procedimentos foram realizados de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal e aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o número 1184.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos de acordo com o protocolo de exercício (EFR e Sedentário) e por grupo de acordo com a administração de drogas (Controle, Stattic, ADR e ADR + Stattic).

Tabela 3 – Divisão de grupos experimentais

Protocolo	Controle (*n)*	Stattic (*n)*	ADR (*n)*	ADR + Stattic (*n)*
EFR	6	6	6	6
Sedentário	6	6	6	6

Divisão dos animais em diferentes grupos experimentais. Controle, receberam solução salina; Stattic, inibidor da via de sinalização STAT3; ADR, Adriamicina; ADR + Stattic, adriamicina e stattic em pontos distintos. EFR, exercício físico de resistência, animais submetidos ao protocolo de 8 semanas de exercício físico de resistência; Sedentário, animais que permaneceram 8 semanas sem realizar o protocolo de exercício físico de resistência; *n*: número amostral.

Finalizado o protocolo de exercício, os animais receberam ADR, Stattic ou solução salina. A Figura 3 representa o desenho experimental contendo os protocolos de exercício e dias de administração de drogas.

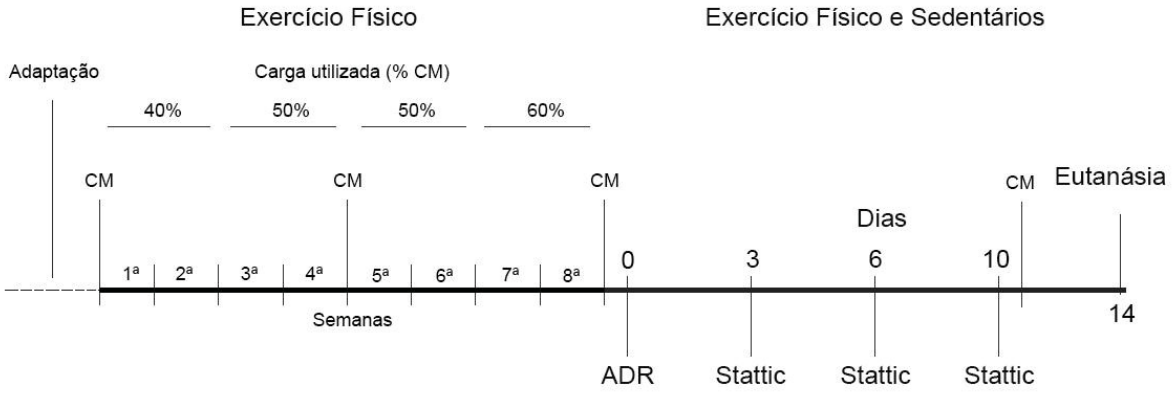


Figura 3 – Esquema do desenho experimental. Representação esquemática do desenho experimental, contendo os protocolos de exercício e administração de drogas

3.3 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA

Os animais foram submetidos a um protocolo de exercício físico de resistência utilizando uma escada vertical de 110 cm de altura, 18 cm de largura e degraus espaçados em 2 cm, conforme modelo descrito na literatura (HORNBERGER JR.; FARRAR, 2004), com uma caixa de 20x20x20 cm no topo para o repouso dos animais entre as escaladas.

Os animais realizaram séries de escaladas com pesos anexados na parte proximal de suas caudas. A cada dia de protocolo, os animais realizaram um total de 20 escaladas, com 90 segundos de intervalo entre cada escalada e progressão da carga utilizada a cada duas semanas (GUEDES et al., 2019; GUO et al., 2020) O protocolo teve duração de 8 semanas, sendo aplicado 3 dias não consecutivos por semana. O aumento de cargas foi estabelecido em relação ao seu desempenho em testes de carga máxima (CM). A carga inicial utilizada foi de 40%, com o valor máximo de carga atingido durante o protocolo de exercício de 60% da CM. Este valor máximo de 60% foi estabelecido com o intuito de manter uma intensidade moderada de exercício, e referente ao máximo de carga indicado para situações de exercício de resistência em doenças crônicas (SANCHES et al., 2013)..

Não foi utilizado nenhum estímulo aversivo, como choque, ou positivo, como recompensa, para condicionar os animais ao protocolo de escalada vertical.

3.3.1 Adaptação

Uma semana antes do início do protocolo de exercício, os animais foram submetidos a uma adaptação ao protocolo de escalada vertical. A adaptação consistiu de 3 escaladas por dia, em 3 dias não consecutivos na semana, partindo de 3 diferentes pontos: 35 cm, 55 cm e 110 cm de distância do topo da escada, com 120 segundos de intervalo a cada escalada, sem a utilização de cargas anexadas ao animal (CASSILHAS et al., 2013).

3.3.2 Teste de Carga Máxima

Após 24 horas da última seção de adaptação foi realizado o teste de CM. Para determinar a carga máxima, os animais passaram por uma série incremental de cargas, iniciando com 75% de seu peso corporal anexado a sua cauda. A cada escalada completada, os animais repousaram por 2 minutos na caixa de treino ao topo do aparato. Ao completar uma escalada, os animais receberam um incremento de 5g anexada a sua cauda para a próxima tentativa (SHEN et al., 2021).

O teste se repete até que o animal não consiga completar a escalada ou atinja um máximo de 6 escaladas com sucesso (PEDROSO et al., 2017; STOYELL-CONTI et al., 2019). O último valor de carga utilizado pelo animal será estabelecido como carga máxima para determinação da carga durante o protocolo e para os testes de CM subsequentes. O teste de CM é realizado na primeira, quarta e oitava semana de protocolo, onde para a realização na quarta e oitava semana, o teste é iniciado com 75% do valor estabelecido no teste de CM anterior.

Após intervalo de 11 dias da administração de drogas, um novo teste de CM foi conduzido para conferir a resposta ao exercício frente ação das drogas administradas.

3.4 INDUÇÃO DA NEFROPATIA

Após 72 horas da finalização do protocolo de exercício, se deu início a indução de nefropatia. Foi utilizado o modelo de nefropatia induzida pelo quimioterápico adriamicina (OKUDA et al., 1986). A ADR foi administrada em dose única de 10 mg/kg (LEE; HARRIS, 2011) por via intravenosa na veia caudal. Para o modelo, foi utilizado adriamicina (Adriblastina®) da marca Pfizer (Pfizer™, Inc. Nova Iorque, USA).

Para simular o estresse os animais dos grupos controle e Stattic receberam solução salina no momento referente ao protocolo de indução da nefropatia.

3.5 INIBIÇÃO DA STAT3

A inibição da via de sinalização STAT3 foi realizada pela administração do inibidor da via Stattic (Abcam™, Inc., Cambridge, MA) diluído em dimetilsulfóxido, na dose de 2 mg/kg, por via intravenosa na veia caudal nos dias 3, 6 e 10 após a administração de ADR, para os grupos Stattic e ADR + Stattic.

O volume de Stattic correspondente a dose de 2mg/kg foi ajustado para um volume final de 120 µL em solução salina. Para simular estresse e possível efeito da solução de diluição da droga, os animais dos grupos controle receberam solução salina com o equivalente de dimetilsufóxido no mesmo intervalo correspondente a administração de drogas aos devidos grupos.

3.6 COLETA DE URINA

Para análise de albuminúria e creatininúria, a urina dos animais foi coletada no período de 0 (basal), 7 dias, e 14 dias após a indução de nefropatia por ADR.

3.7 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAIS

A eutanásia dos animais ocorreu após anestesia prévia utilizando solução de xilasina e cetamina (16 mg/kg e 150mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal, 14 dias após a administração das drogas.

No momento da eutanásia foi realizado a coleta de sangue, via punção cardíaca. O sangue foi centrifugado e o soro separado e armazenado a -20ºC.

Os rins foram coletados e descapsulados, sendo o rim esquerdo fotografado, pesado e dividido em duas metades por corte longitudinal e armazenado em solução formol. O rim direito foi cortado transversalmente em 4 pedaços, sendo depositados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a -80 ºC.

Foram coletados, medidos e pesados os músculos gastrocnêmios. O músculo gastrocnêmio esquerdo foi mantido em temperatura ambiente por 10 minutos, e então

envolto em talco neutro e depositado em nitrogênio líquido para posteriormente ser armazenado a -80º C.

3.8 ANÁLISES SÉRICAS DE URÉIA, ALBUMINA E TRIGLICERÍDEOS

Para mensuração dos níveis de uréia, albumina e triglicerídeos séricos foram utilizados kit comerciais colorimétricos em reação de ponto final. Foi utilizado o espectrofotômetro GENESYS™ 10, da Thermo Electron Corporation para leitura colorimétrica das amostras.

A análise uréia foi realizada pela metodologia de reação com a urease e leitura a 600 nanômetros (nm), através do kit Urease CE, da marca Labtest Diagnóstica (Ref.: 27, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A mensuração de albumina no soro foi realizada pelo método de verde de bromocresol, com leitura a 630 nm, pelo kit Albumina, da marca Labtest Diagnóstica (Ref.: 19, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Os níveis de triglicerídeos foram analisados pelo kit Triglicérides, da marca Katal Biotecnológica (Belo Horizonte - MG. Brasil), com leitura a 500 nm.

Para todas as análises, foram seguidas as instruções segundo o fabricante.

3.9 MENSURAÇÃO DA ALBUMINA/CREATININA URINÁRIA

3.9.1 Quantificação de albumina por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Foi realizada uma estimativa da albuminúria via eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (29:1 acrilamida:*bis*-acrilamida). A concentração do gel de separação utilizado foi de 10% e do gel de empacotamento de 5%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical, com voltagem constante de 60 V para o gel de empacotamento, e 110 V a partir do momento em que as amostras adentravam o gel de separação.

As amostras de urina foram diluídas para 10% para possibilitar a análise específica de albumina presente na amostra. Foi adicionado o agente redutor de pontes dissulfeto β-mercaptoetanol junto a amostra para uma solução final de 50% (v/v) da amostra diluída e 50% (v/v) de β-mercaptoetanol. Após a separação de

proteínas, o gel foi corado com Azul de Comassie por 30 minutos e descorado em solução 35% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético. A quantificação da albuminúria foi realizada utilizando padrão de albumina de concentração conhecida, com o fotodocumentador modelo Amersham Imager 600 da General Electric®.

3.9.2 Dosagem de creatinina urinária

A análise de creatinina na urina foi feita através de kit para a realização do ensaio colorimétrico Creatinina, da marca Labtest Diagnóstica (Ref.: 35, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), com leitura a 510 nm. Foi utilizado o protocolo fornecido pelo fabricante junto ao produto.

3.10 AVALIAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS

3.10.1 Secção e preparação de lâminas histológicas

Músculos gastrocnêmios armazenados a -80ºC foram transferidos para criostato a -20ºC e fixados com o composto Tissue-Tek® O.C.T às platinas. A região mediana dos músculos foi seccionada transversalmente na espessura de 10 µm. Lâminas histológicas foram preparadas contendo 3 secções transversais semi-seriadas do tecido muscular. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente entre 30 a 40 minutos para adesão do tecido a lâmina e armazenadas a -20ºC até o momento do ensaio ou coloração do tecido pelas técnicas de coloração por hematoxilina e eosina (HE), NADH-TR e Sudan black.

As lâminas foram fotodocumentadas em objetiva de 10x e 40x com auxílio de microscópio (Carl Zeiss™ Primo Star™) com câmera acoplada (Carl Zeiss™ AxioCam ERc 5s) no programa ZEN 3.1 (Carl Zeiss™), e as análises realizadas pelo software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

3.10.2 Tipagem e contagem de fibras musculares pela técnica de NADH-TR

Lâminas contendo os cortes histológicos foram mantidas por 10 minutos em estufa a 37ºC e então submetidas a reação histoquímica pelo método de nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazólio redutase (NADH-TR) (DUBOWITZ; BROOKE, 1973).

Foram utilizados os reagentes adenina nicotinamida dinucleótido tetrazólio redutase (Sigma-Aldrich, N8129) e Nitrotetrazolium Blue (NBT) (Sigma-Aldrich, N8129).

Foram analisados 4 campos histológicos aleatórios de cada animal para determinação de fibras totais presentes na área analisada, área total (μm²) do campo e a divisão entre fibras do tipo I, IIa e IIb de acordo com a intensidade de coloração da reação. A área de secção transversa de cada tipo de fibra foi analisada pela mensuração de 50 fibras de cada tipo por animal. Foi estabelecido a área de média das fibras pela média ponderada da média das áreas de cada tipo de fibra de acordo com seu percentual de representação total no tecido.

3.10.3 Alterações em número de núcleos, capilares e diâmetros das fibras musculares pela técnica de hematoxilina e eosina

Análises morfométricas foram realizadas após coloração por hematoxilina e eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para fim de quantificar o número de fibras musculares, núcleos periféricos e centrais e capilares sanguíneos presentes no campo analisado. Foram mensurados os diâmetros maior e menor das fibras musculares. Foi realizada a mensuração da área total do campo que compreendia fibras musculares completas, sendo desconsideradas as fibras que apareciam parcialmente no campo.

Para determinação de diâmetros menor e maior, foram analisadas 150 fibras por animal.

A partir das analises morfométricas das fibras foi calculada a densidade de fibras (mm²) ($Densidade = nº\ de\ fibras/área\ mensurada$). A partir da análise de núcleos e capilares foram calculadas a razão de núcleos por fibra ($Núcleo/fibra = nº\ de\ núcleos\ totais\ /nº\ de\ fibras$), o domínio nuclear ($Domínio\ nuclear = nº\ de\ núcleos\ por\ fibra/área\ média\ das\ fibras$) e capilares ($Capilar/Fibra = (nº\ de\ capilares)\ /\ (nº\ de\ fibras)$) por fibra.

3.10.4 Deposição de lipídeos intramusculares pela técnica de Sudan black

Para determinação da deposição de lipídeos no tecido muscular, secções histológicas do gastrocnêmio foram coradas pela técnica de Sudan black (LEACH,

1938). Foram analisadas 12 imagens de cada lâmina e quantificados pela intensidade de coloração.

3.10.5 Mensuração do tecido renal

O rim esquerdo, fotografado sobre papel milimetrado no momento de sua coleta, foi mensurado longitudinalmente com auxílio do *software* ImageJ.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas e representações gráficas foi utilizado o RStudio Team (2020) versão 1.3.1056. Para comparação entre dois grupos foi utilizado teste T de Student para variáveis paramétricas e teste U de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. Para a comparação entre dois ou mais grupos foi utilizado testes de ANOVA para amostras paramétricas, ou teste de Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas e teste de Friedman para amostras não paramétricas de medidas repetidas. Em casos de diferenças entre as variáveis, os grupos foram comparados entre si com correção de Tukey em caso de variáveis paramétricas e de Bonferroni para variáveis não-paramétricas. As diferenças são consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 A NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA E O EXERCÍCIO FÍSICO

4.1.1 Teste de carga máxima

Para avaliar o efeito do exercício físico na performance individual de cada animal e ajustar a carga recomendada para cada período do protocolo de EFR, foi realizado o teste de CM.

A análise dos resultados demonstrou que há progressão da capacidade máxima de carga dos animais ao longo do protocolo, com aumento das cargas entre o intervalo do primeiro ao terceiro teste de carga máxima voluntária e manutenção dos valores no período entre o terceiro e quarto teste (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados dos testes de carga máxima

Teste de CM	Resultados (g)
1º CM	37,6 ± 1,04[a]
2º CM	40,8 ± 1,11[b]
3º CM	47,4 ± 2,02[c]
4º CM	48,3 ± 1,26[c]

Resultados obtidos nos testes de carga máxima para determinação de carga durante o protocolo de exercício físico. 1º, 2º e 3º testes foram realizados durante o protocolo de EFR; 4º teste foi realizado 11 dias após o término do protocolo de EFR. Média ± erro padrão da média. CM: Carga máxima. Letras indicam diferença estatística, onde valores com letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Conforme o estabelecido, os animais foram submetidos a um protocolo de exercício de intensidade moderada, com uma carga utilizada variando de 40 a 60% dos valores obtidos pelo teste de CM (SANCHES et al., 2013). O exercício físico de resistência realizado mostrou uma melhora no desempenho dos animais durante o protocolo, uma vez que os testes realizados ao longo da duração do protocolo de EFR (1º a 3º teste de CM) apresentaram em média um aumento das cargas toleradas pelos animais.

Os resultados do 4º teste de CM (48,3 ± 1,26), realizado 11 dias após o protocolo de EFR e com os animais respondendo a administração de drogas, não

apresentou diferença comparado ao 3º CM. Este resultado pode indicar tanto uma comprovação que o protocolo de exercício estabelecido foi capaz de promover aumento da capacidade de carga dos animais, como a manutenção da capacidade de carga adquirida após a interrupção do protocolo de EFR.

4.1.2 Peso corporal

Uma das respostas encontradas no modelo experimental de nefropatia por ADR é a queda do peso corporal dos animais nos dias seguintes à administração da droga. Esta resposta, em conjunto com proteinúria elevada indicam o desenvolvimento da lesão renal (WANG et al., 2015).

Foi observado, tanto para os animais que realizaram o protocolo de exercício quanto para os animais sedentários, uma redução do peso corporal devido ação da ADR (Figura 4).

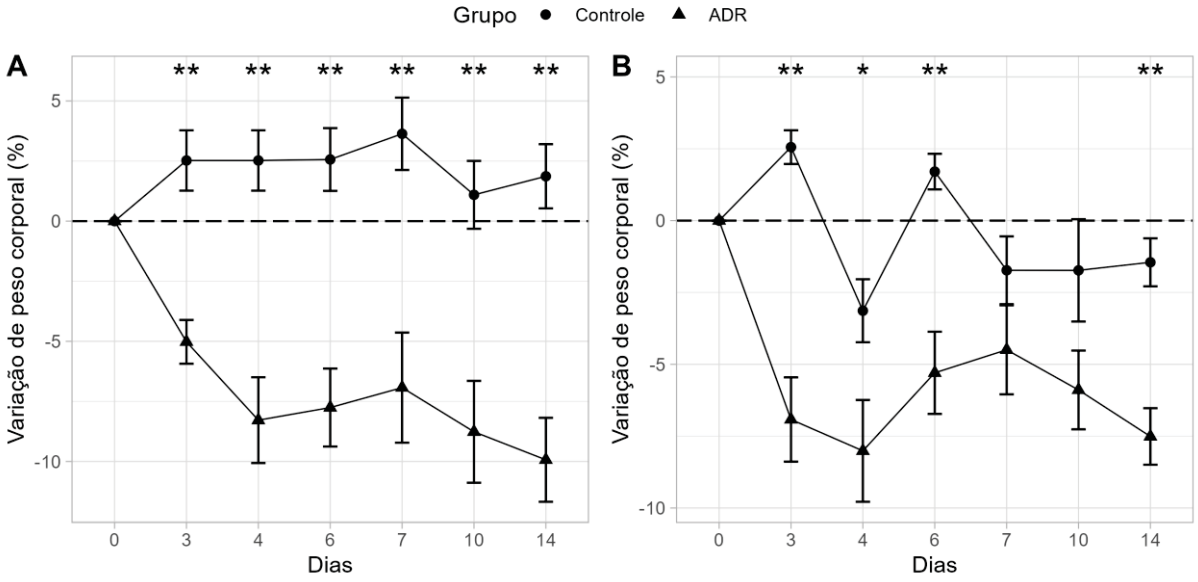


Figura 4 - Redução de peso corporal em resposta a ADR nos protocolos de exercício e sedentário. Intervalo entre 0 a 14 dias após a administração de adriamicina**.** (A) Protocolo sedentário e (B) protocolo de EFR. n=6 por grupo, *p<0,05, **p<0,01. Média ± desvio padrão.

Conforme observado, os animais que receberam ADR apresentaram queda no peso corporal desde o 3º dia após administração de ADR até o momento de eutanásia, no 14º dia, em comparação com o grupo controle

Similar aos dados encontrados, Scarfe *et al.,* (2015) observaram uma queda acentuada no peso corporal de camundongos em resposta a ADR no intervalo de 1 semana, sem haver reversão do quadro em nenhum momento durante o período de 5 semanas de estudo. Utilizando o modelo de nefropatia por ADR, porém em camundongos C57BL/6, Jeansson et al., (2009) observaram uma queda de peso corporal também durante o período total do estudo, do 3º ao 6º dia após injeção de ADR.

De mesmo modo que os animais que não realizaram o exercício de resistência, o grupo ADR submetido ao protocolo de exercício apresentou queda do peso corporal a partir do terceiro dia de ação da ADR. Apesar da redução da amplitude dos valores entre grupos para os dias 7 e 10, a retomada da redução de peso no período de 14 dias indica que o padrão de perda de peso corporal se manteve para os animais de exercício físico.

4.1.3 Albuminúria

Uma das principais características observadas no modelo de lesão renal por ADR é a indução de intensa proteinúria decorrente de danos na estrutura e função glomerular (LEE; HARRIS, 2011).

A análise da urina para detecção de albuminúria e creatininúria em razão da lesão renal presente em animais sedentários do grupo ADR indicou um aumento significativo dos níveis de albuminúria/creatininúria no intervalo de 7 dias após a ADR. No intervalo de 14 dias, porém, não foi observado presença de albumina/creatinina urinária (Figura 5).

Diferente do quadro dos animais que não realizaram o exercício como medida de pré-condicionamento, foi observado um aumento significativo da albumina/creatinina urinária dos animais do protocolo de EFR no período de 14 dias, sem haver detecção para o intervalo de 7 dias (Figura 6).

A progressão da lesão pelo modelo de nefropatia induzida por ADR pode ser dividida em duas fases. Um primeiro momento de lesão pode ocasionar comprometimento da barreira de filtração glomerular, levando a altos níveis de proteinúria, mas sem haver manifestações histológicas observáveis. Em um segundo momento, é observado maiores níveis de fibrose do tecido renal, resultando em perda de superfície disponível para realização da filtração glomerular. Isto resulta em uma

redução da taxa de filtração glomerular, e consequentemente, menores níveis de albuminúria são detectados (SCARFE et al., 2015).

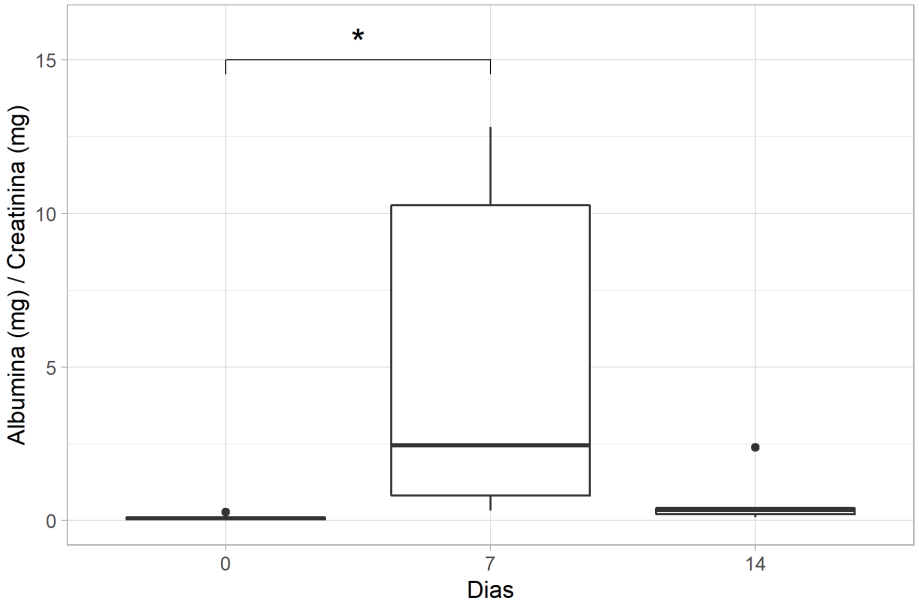


Figura 5 - **Razão albumina/creatinina urinária de 0, 7 e 14 dias após administração de adriamicina do protocolo sedentário**. É observado um aumento significativo da albumina/creatinina no período de 7 dias, sem haver níveis elevados detectados no 14º dia. n=5 por grupo, *p<0,05.

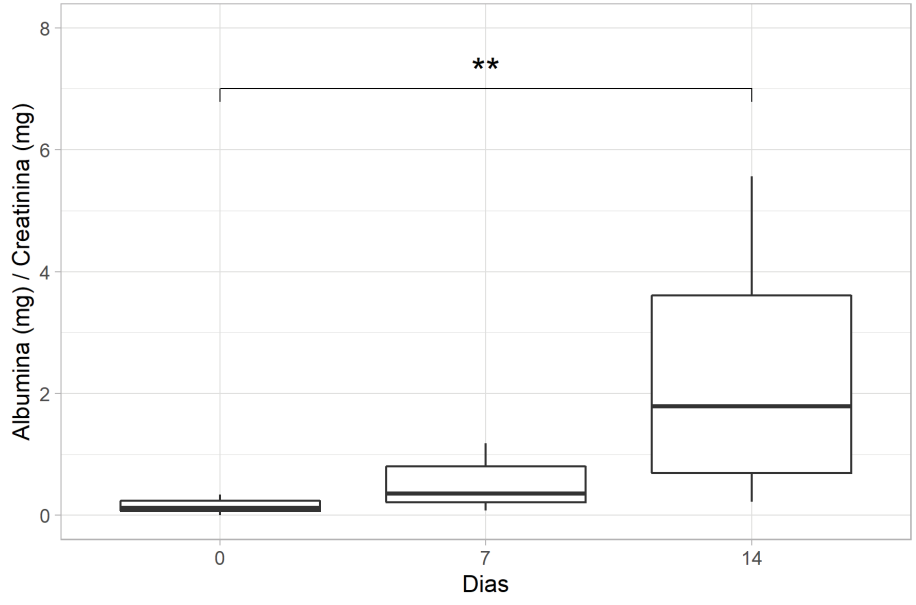


Figura 6 - Razão albuminúria/creatininúria de animais do grupo ADR do protocolo de exercício de resistência nos intervalos de 7 e 14 dias após administração de adriamicina. n=5 animais por grupo, **p<0,01.

Conforme apontado, a indução de lesão renal por ADR em animais pré-condicionados com o exercício físico promoveu uma alta da albuminúria no período de 14 dias, enquanto na ausência do exercício físico, foi observado uma albuminúria significativa no intervalo de 7 dias. Este resultado pode indicar um atraso da progressão da lesão por ADR ocasionado pelo exercício, deslocando o pico de proteinúria encontrado de 7 para 14 dias.

Este efeito de atraso da progressão de proteinúria em modelo experimental pode ser observado em resposta a inibição da atividade de STAT3 (EDWARDS; MIZUI; KYTTARIS, 2015).

Apesar da alteração do ponto de detecção de albuminúria, a comparação de albumina/creatinina urinária entre os animais do grupo Exercício e grupo Sedentário não apresentou diferenças estatísticas (Figura 7). Para o período de 7 dias, entretanto, Faleiros et al., (2017) encontraram uma redução da albumina urinária de 24 horas do grupo pré-condicionado com exercício físico comparado ao grupo sedentário de ratos com lesão induzida por adriamicina.

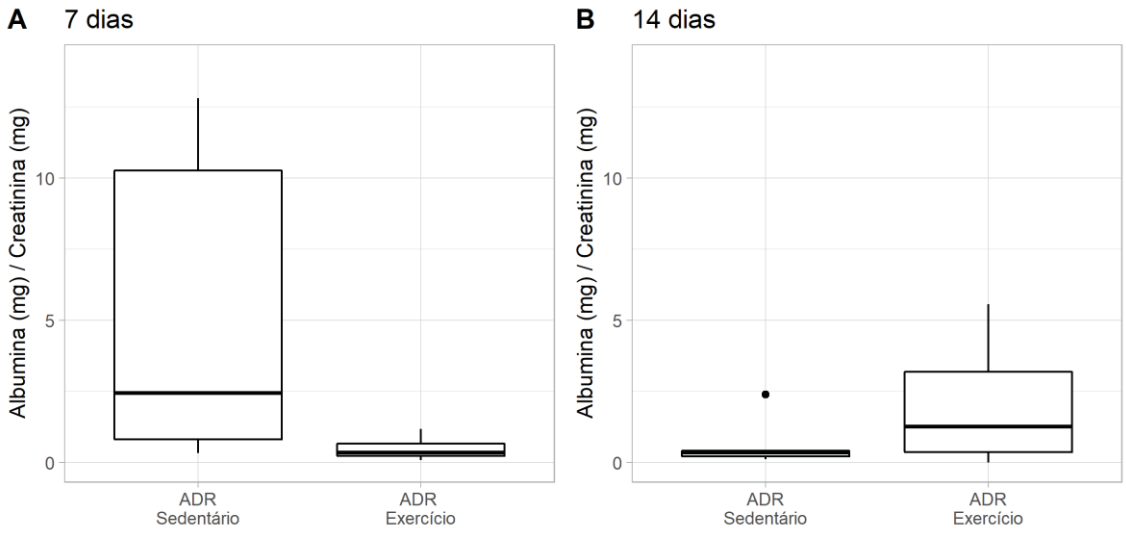


Figura 7 - Albumina/creatinina urinária dos grupos ADR submetidos ao exercício de resistência e sedentários. Albuminúria no período de (A) 7 dias e (B) 14 dias. n=5 animais para grupo Sedentário e 6 animais para grupo Exercício. Pontos indicam a presença de *outlier*.

4.1.4 Análises histomorfométricas do músculo gastrocnêmio

Adriamicina é capaz de causar lesão a diferentes tecidos. A miopatia causada por ADR causa atrofia das fibras musculares e disfunção contrátil do músculo afetado. A disfunção mitocondrial e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela ação da ADR no tecido muscular esquelético são ditos responsáveis pelos danos causados as fibras musculares (POWERS et al., 2019).

O exercício de resistência prolongado, assim como protocolos de exercício de curta duração, reportam um efeito positivo do pré-condicionamento causado pelo exercício prévio a administração de ADR, reduzindo a toxicidade muscular da droga. Além de oferecer proteção contra os danos por estresse oxidativo, o exercício físico pode promover redução da atividade de genes envolvidos em processos do sistema ubiquitina-proteossomo e degradação muscular (MARQUES-ALEIXO et al., 2018).

4.1.4.1 Peso muscular e deposição lipídica

A mensuração do peso isolado do músculo gastrocnêmio dos animais revelou um aumento do peso muscular para o grupo controle do protocolo de EFR em relação ao controle sedentário (Figura 8).

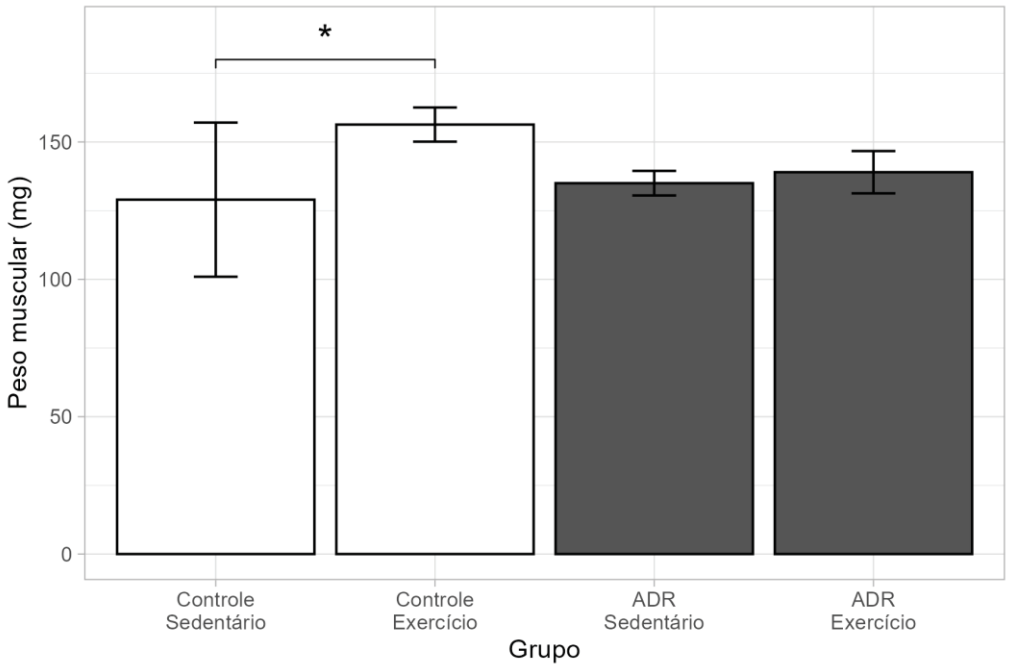


Figura 8 - Aumento do peso muscular dos animais Controle e ADR dos protocolos sedentário e EFR. Pesagem do músculo gastrocnêmio 14 dias após administração de adriamicina. n=6 animais por grupo, *p<0,05. Média ± desvio padrão.

Apesar do aumento do peso muscular causado pelo protocolo de EFR nos animais do grupo controle, nenhuma diferença foi observada para os animais do grupo ADR. Além da redução de peso corporal, diferentes estudos observaram redução do peso muscular de diferentes músculos em modelo animal em resposta a ADR. Em estudo de meta-análise publicado por Hiensch *et al*., (2020), foi observado uma redução de 14% do peso muscular associado a administração de ADR em ratos.

Embora não haja redução direta do peso muscular causada pela ADR, a ausência do aumento do peso do músculo gastrocnêmio para o grupo ADR do protocolo de EFR pode indicar um efeito da ADR neste parâmetro, visto que o protocolo de exercício ocasionou um aumento do peso muscular no grupo controle.

Diferentes células, incluindo células da musculatura esquelética, podem formar gotículas de lipídeos intracelulares. Em quadro como obesidade e diabetes tipo 2, o aumento de lipídeos intramusculares, em especial o triacilglicerol, se correlaciona inversamente com a sensibilidade muscular a insulina e se apresenta como um bom preditor ao risco de diabetes (KOVES et al., 2013).

Apesar desta relação entre lipídeos intramusculares e distúrbios metabólicos, nem sempre seu aumento estará relacionado com um quadro patológico. A prática de exercício físico pode levar ao aumento de gotículas de lipídeo, ocasionando níveis elevados deste componente em atletas, mas sem haver uma associação entre os níveis de lipídeos intramusculares e queda da sensibilidade muscular a insulina nestes indivíduos (KOVES et al., 2013).

A análise de lipídeos intramusculares no músculo gastrocnêmio dos animais revelou aumento de gotículas de lipídeos presentes nos grupos ADR, especialmente para o grupo ADR sedentário, que apresentou níveis elevados em comparação a ambos controles, sedentário e EFR. No caso do grupo ADR do protocolo de EFR, houve aumento de lipídeos intramusculares apenas em relação ao grupo controle sedentário. Interessantemente, além de não haver aumento de gotículas de lipídeos entre os grupos controle e ADR do protocolo de EFR, o protocolo de exercício ocasionou redução dos níveis encontrados para o grupo ADR de EFR em relação ao grupo ADR sedentário (Figura 9).

A doença renal crônica terminal pode levar a acumulação de tecido adiposo ectópico, ou seja, aumento da presença de lipídeos circundantes a tecidos não-adiposos, como a musculatura esquelética. Aliado a isto, segundo Keddar *et al*. (2020), a análise da deposição lipídica em pacientes de transplante renal revelou uma

redução de lipídeos ectópicos em 75% dos pacientes após o transplante renal. Esta redução indica que apesar da injúria renal levar a distribuição ectópica de lipídeos, a reversão do quadro renal pode ocasionar também em reversão da deposição de lipídeos na musculatura esquelética.

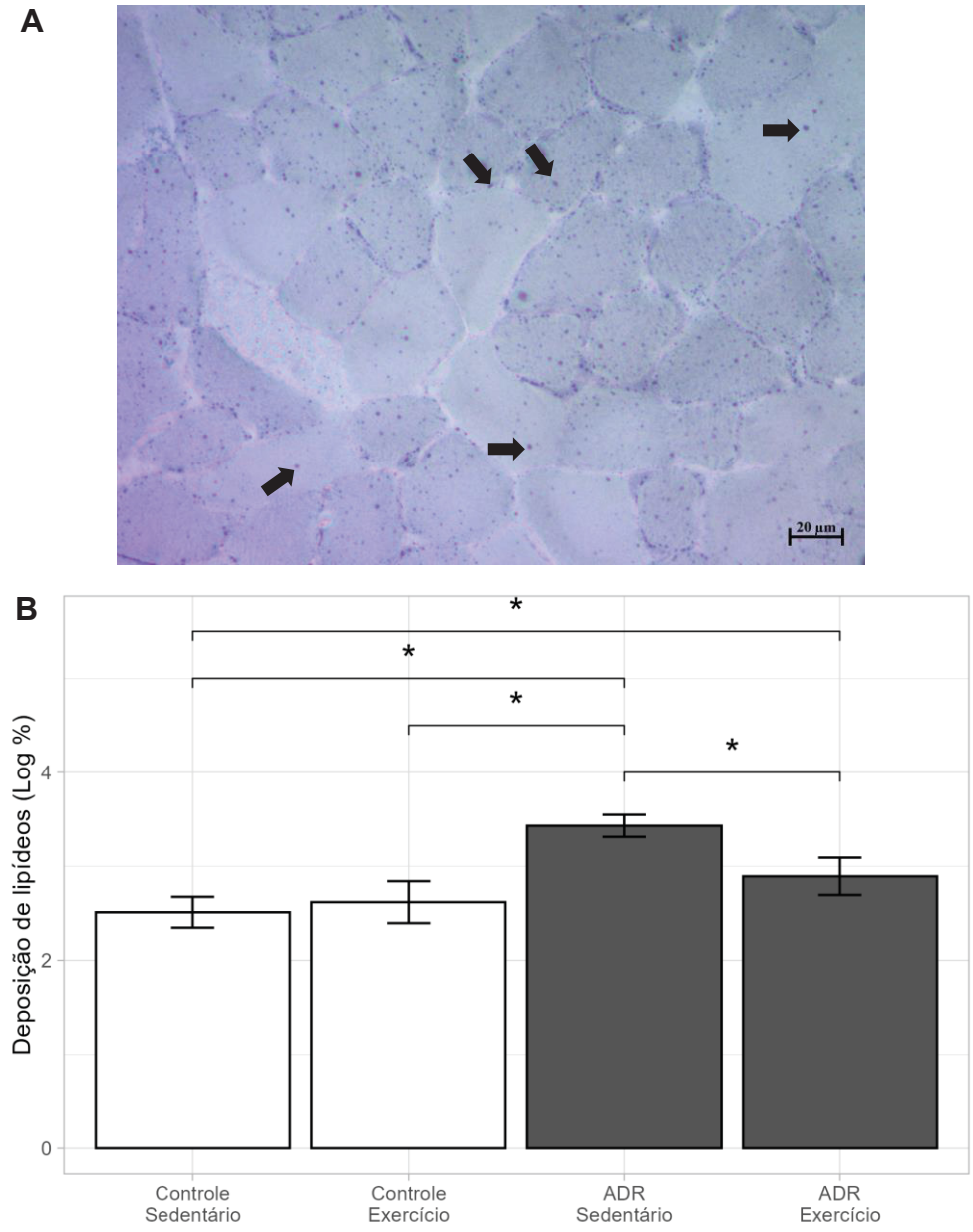


Figura 9 - Deposição lipídica no músculo gastrocnêmio é aumentada no grupo ADR. (A) Representação histológica da coloração de *Sudan black*, aumento de 400x. Setas apontam exemplos de gotículas de lipídeos no tecido. (B) Quantificação da deposição lipídica intramuscular dos grupos controle e ADR dos protocolos sedentário e EFR. n=6 animais por grupo, **p<0,01. Média ± desvio padrão.

Sendo assim, o aumento da deposição de gotículas de lipídeos no tecido muscular, como o observado, pode refletir não apenas uma disfunção do tecido

muscular, mas também estar relacionado com a funcionalidade renal. Aliado a isto, a prática de exercício físico de resistência pode levar a redução dos níveis de deposição lipídica na musculatura esquelética, como observado pela redução encontrada entre os grupos ADR sedentário e ADR de EFR.

4.1.4.2 Área, densidade e número de capilares por fibras musculares

Diferentes modalidades de exercício podem conferir proteção as fibras musculares sobre o efeito de lesão provocado por ADR. O exercício físico prévio a indução de lesão por ADR resultou em redução de marcadores de lesão muscular e redução da presença de ROS no tecido muscular em modelo experimental, e atenuação da atrofia de fibras musculares nos músculos diafragma, plantar e sóleo de ratos em modelo de lesão por ADR (POWERS et al., 2019).

Apesar da redução do peso corporal causada por ADR, os animais do grupo ADR sedentário não apresentaram alterações significativas quanto a área média das fibras musculares, densidade de fibras no tecido muscular, ou número de capilares por fibra (Figura 10).

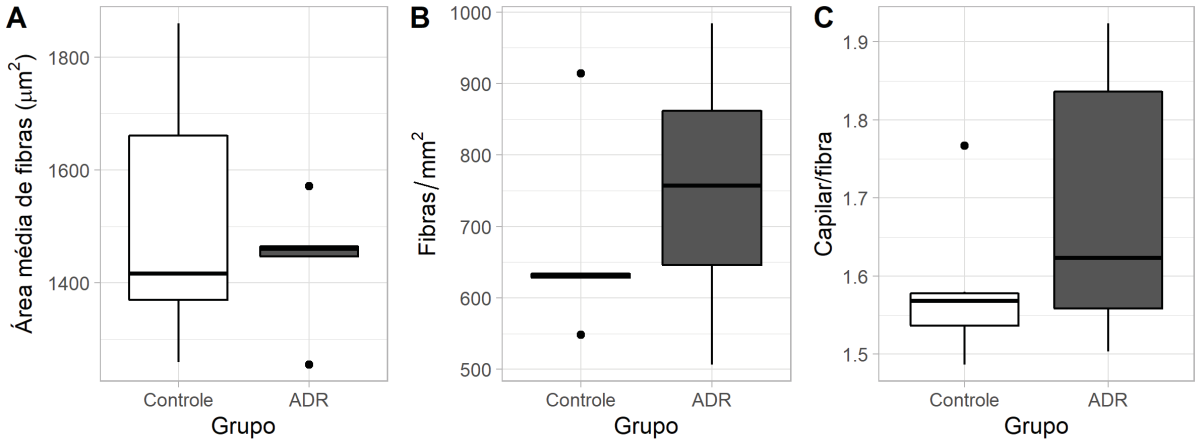


Figura 10 - Alterações nas fibras musculares dos animais sedentários. (A) Área de secção transversa média. (B) Densidade de fibras musculares. (C) Razão de capilares por fibra. n = 4 a 6 animais por grupo. Pontos indicam a presença de *outlier*.

A análise destes parâmetros dos animais do protocolo de EFR revelou uma redução do número de capilares por fibra para o grupo ADR, sem haver alterações da área média das fibras ou da densidade de fibras no campo (Figura 11).

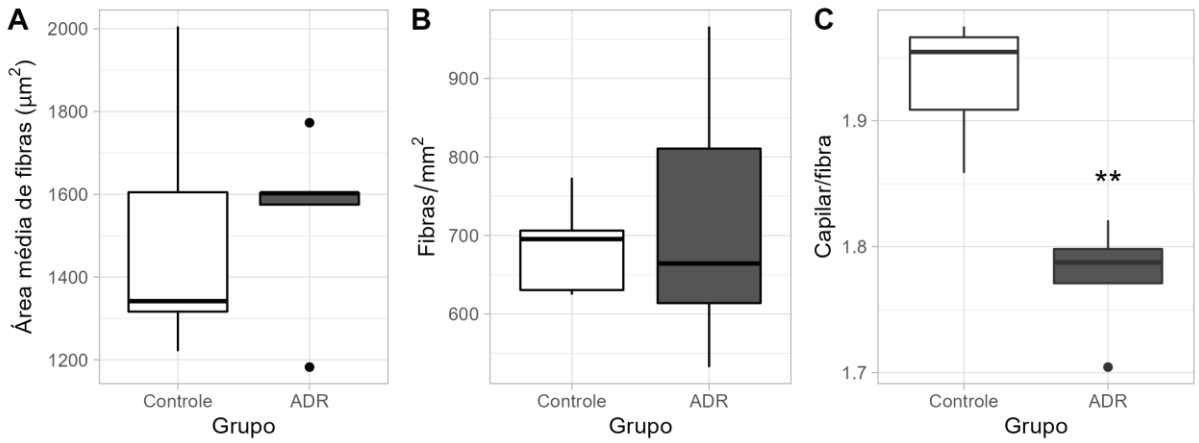


Figura 11 - Alterações nas fibras musculares dos animais do protocolo de EFR. (A) Área de secção transversa média. (B) Densidade de fibras musculares. (C) Razão de capilares por fibra. n = 4 a 6 animais por grupo. Pontos indicam a presença de *outlier*.

O processo de angiogênese ocorre em equilíbrio com o estimulo de fatores angiogênicos e antiangiogênicos que interagem com células endoteliais e matriz extracelular vasculares. O exercício físico promove a expressão de fatores de crescimento angiogênicos e promove o aumento de capilares no tecido muscular. O exercício de resistência pode promover o aumento da capilarização do tecido muscular tanto em humanos como em modelos animais, assim como outros tipos de exercício, o que está ligado com melhora do estado de saúde tanto em humanos como animais (GUO et al., 2020).

Diferente dos animais sedentários, a avaliação do número de capilar/fibra muscular dos animais submetidos ao exercício de resistência demonstra uma redução dos capilares em resposta a ADR (Figura 11C). Desta forma, a ADR é capaz de interferir na resposta causada pelo exercício, reduzindo a capacidade de vascularização muscular daqueles músculos pré-condicionados com o exercício físico, mas não dos músculos não treinados.

4.1.4.3 Área e distribuição das fibras musculares

Para conferir o efeito causado pela adriamicina sobre as fibras musculares, uma vez que a área média das fibras não apresentou diferenças, foi realizado a estratificação das fibras por sua área de secção transversa, e analisado sua distribuição relativa.

A análise da população de fibras por seu tamanho não revelou um efeito da adriamicina em nenhum dos protocolos, conforme não foi observado diferenças entre o grupo controle e grupo ADR (Figura 12).

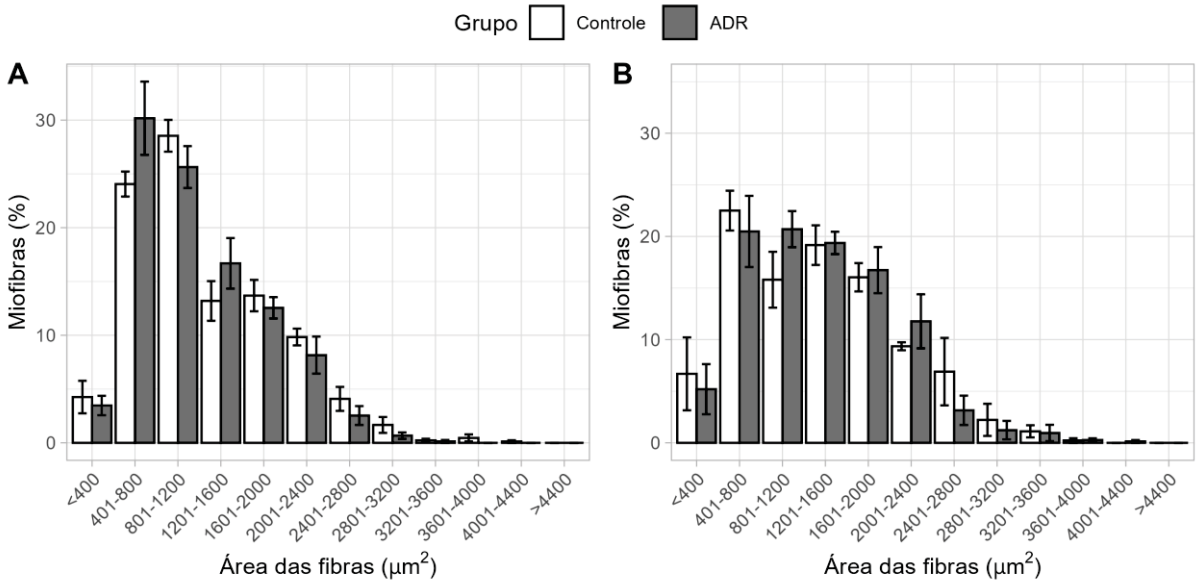


Figura 12 - Distribuição das fibras musculares por sua área de secção transversa. Distribuição das fibras musculares pela área das fibras dos animais do protocolo (A) sedentário e (B) de exercício de resistência. n=6 animais por grupo. Média ± desvio padrão.

O levantamento de diferentes estudos em uma meta-análise revelou que, assim como ocorre redução do peso corporal, a ADR utilizada em modelo experimental leva a redução de 17% da área de secção transversa de fibras musculares quando comparadas ao grupo controle. Entretanto, estes resultados refletem estudos cujo o alvo da análise é focado nos músculos diafragma, plantar e sóleo (HIENSCH et al., 2020).

Em concordância com os resultados aqui apresentados, a análise do efeito de ADR no músculo gastrocnêmio de camundongos não revelou alterações da área de secção transversa média ou da distribuição das fibras musculares (YU et al., 2014, 2015).

4.1.4.4 Tipagem de fibras musculares

A musculatura esquelética pode ser dividida por tipos de fibras musculares presentes no tecido, que se dividem por sua composição quanto a capacidade oxidativa, proteínas constitutivas e o tipo de cadeia pesada de miosina presentes.

De acordo com estes parâmetros, as fibras musculares são divididas de acordo com a isoforma da cadeia pesada de miosina presente na fibra em fibras do tipo I (oxidativa, contração lenta), fibras do tipo IIa (oxidativa, contração rápida) e fibras tipo IIb (glicolítica, contração rápida) (GUO et al., 2020; LEE et al., 2018).

O musculo esquelético tem a capacidade de se adaptar em resposta a estímulos, como ativação de nervos, influencias hormonais, ou o seu uso em atividades como o exercício de resistência. A plasticidade muscular envolvendo a troca do tipo de fibra, principalmente a troca entre fibras lentas (Fibras I) em fibras rápidas (Fibras do tipo IIa e IIb) (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011), ocorre em diferentes modelos experimentais submetidos a diferentes tipos de exercício (GUO et al., 2020).

A composição muscular pela classificação de fibras por seu tipo (I, IIa e IIb) aparenta não sofrer alterações pela administração de ADR, mantendo a composição muscular de fibras sem haver efeitos do protocolo de EFR ou da administração de ADR (Figura 13).

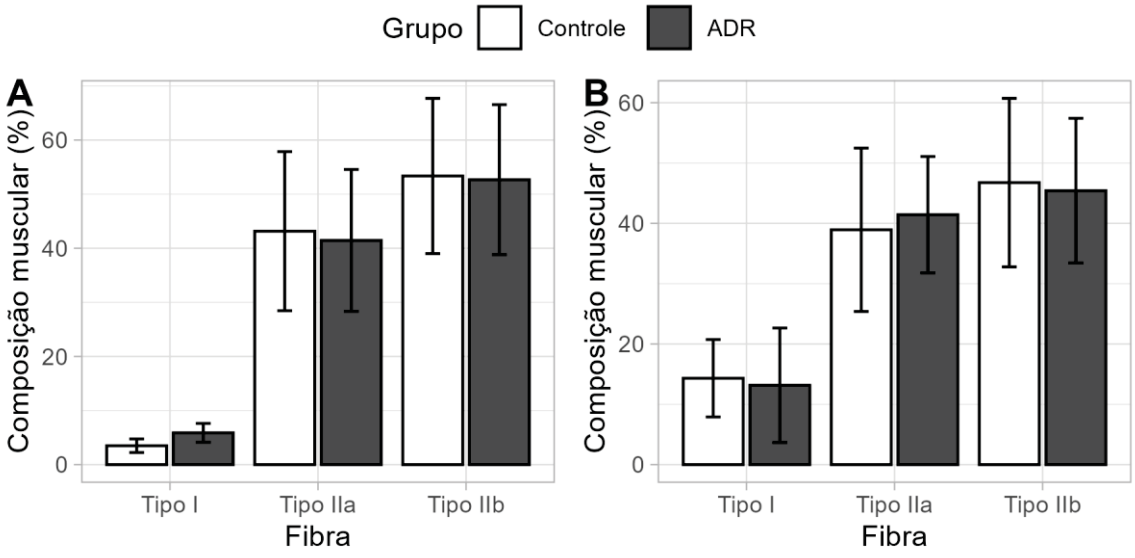


Figura 13 - Composição muscular por tipo de fibra de animais sedentários e do protocolo de EFR. (A) Grupos de animais sedentários e (B) grupos submetidos ao protocolo de EFR. n=4 a 6 animais por grupo. Média ± desvio padrão.

Apesar de não haver alterações na composição de tipos de fibras musculares encontradas, diferentes modelos experimentais podem ocasionar a troca entre tipos de fibras. Utilizando um modelo animal de exercício em esteira, Lee *et al*., (2018) observaram um aumento nas fibras de contração lenta no músculo gastrocnêmio de

camundongos após 4 semanas de exercício, reportando o envolvimento de um canal de Ca^{2+} ativado por estresse oxidativo nos mecanismos responsáveis pela indução da troca do tipo de fibra.

A lesão por ADR em músculos diafragma, sóleo e plantar é capaz de levar a redução da área de secção transversa das fibras musculares (POWERS et al., 2019). Apesar de não observar uma redução da área de secção transversa média das fibras do músculo gastrocnêmio, a análise por tipo de fibra revelou alterações da área das fibras de acordo com o tipo de fibra analisado (Tabela 5).

Tabela 5 - Área de secção transversa por tipo de fibra

Protocolo	**Grupo**	**Área de fibras (μm²)**		
		Tipo I	**Tipo IIa**	**Tipo IIb**
Sedentário	Controle	661,2 ± 17,4^{ab}	1016,4 ± 18,0^{a}	1989,2 ± 30,8^{a}
	ADR	656,3 ± 13,7^{ab}	1018,7 ± 16,7^{a}	1839,9 ± 27,1^{c}
Exercício de	Controle	608,6 ± 17,8^{a}	1338,2 ± 25,0^{b}	2169,1 ± 45,9^{b}
resistência	ADR	680,5 ± 17,9^{b}	1279,8 ± 24,6^{b}	2055,6 ± 31,8^{ab}

Área de secção transversa por tipo de fibra dos grupos controle e ADR. n = de 3 a 5 animais por grupo. Média ± erro padrão da média. Letras indicam diferença estatística, onde valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

As fibras do tipo I apresentaram alteração de sua área em resposta a ADR no caso de animais submetidos ao protocolo de exercício, enquanto as fibras do tipo IIa demonstram um efeito do exercício ocasionando o aumento da área das fibras em relação aos grupos sedentários. A análise das fibras do tipo IIb revelou atrofia das fibras do grupo ADR sedentário, visto que apresentaram menores valores de área de fibra comparado a todos os grupos. O grupo ADR de EFR, por sua vez não apresentou esta redução da área das fibras.

Tanto a diversificação da composição muscular sobre o tipo de fibra quanto alterações sobre a área de cada fibra refletem a adaptação do organismo a estados do metabolismo. Em casos de perda de massa muscular, como caquexia ou sepse, fibras glicolíticas do tipo II (IIb) apresentam maior atrofia que fibras oxidativa tipo I (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011).

4.1.4.5 Alterações nucleares nas fibras musculares

Alterações nucleares nas fibras da musculatura esquelética podem indicar a presença de disfunções do tecido. Fibras musculares apresentam núcleo periférico, localizado próximo a membrana plasmática. A presença de núcleos centrais, ou seja, núcleos localizados fora da região periférica próxima da membrana basal, pode ser um indício de condições de lesão, como perda de massa muscular, ou um processo de regeneração (ROMAN; GOMES, 2018).

No caso de animais sedentários, foi observado redução de núcleos centrais no grupo ADR (Figura 14), apesar de que a análise de outros componentes da situação nuclear, indicativos da atividade nuclear e ação direta da droga sobre os núcleos das fibras musculares, não apresentaram alterações devido administração de ADR.

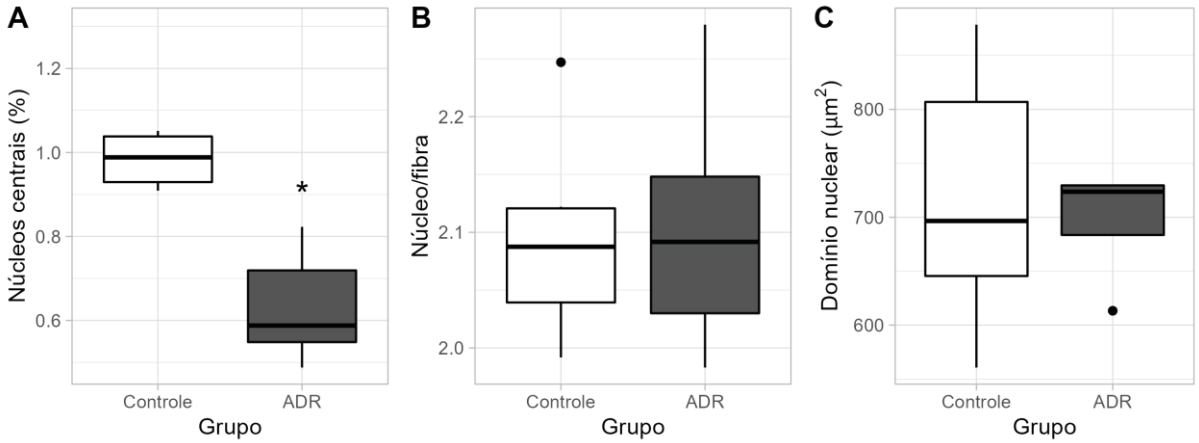


Figura 14 - Presença de núcleos centrais, número de núcleos por fibra e domínio nuclear nas fibras musculares do gastrocnêmio dos grupos sedentários. (A) Presença de núcleos centrais, (B) número de núcleos por fibra e (C) domínio nuclear. n = 5 animais por grupo, *p<0,05 vs Controle, **p<0,01 vs Controle. Pontos indicam a presença de *outlier*.

Entretanto, a análise dos núcleos das fibras musculares do gastrocnêmio de animais submetidos ao exercício de resistência revelou que, novamente, o grupo ADR apresenta uma redução da presença de núcleos centrais comparado ao grupo controle. Por outro lado, para os animais submetidos ao exercício de resistência tanto o número de núcleos por fibra muscular quanto o domínio nuclear apresentaram diferenças, o que não ocorreu com os grupos sedentários (Figura 15).

A análise da presença de núcleos centrais nos músculos gastrocnêmio revelou uma redução de núcleos centrais em resposta a ADR (Figura 14, 15). Em contraste aos dados encontrados, dados da literatura demonstram que a

administração intraperitoneal de 15 mg/kg de ADR resultou em um aumento dos núcleos centrais observados no músculo gastrocnêmio de camundongos C57BL/6 em um intervalo de 4 dias após a administração de ADR (YU et al., 2014, 2015).

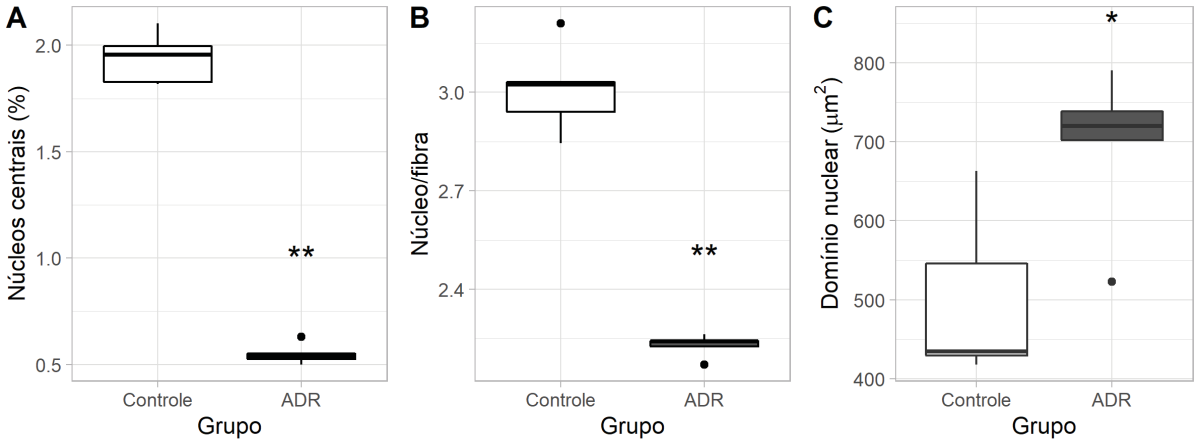


Figura 15 - Presença de núcleos centrais, número de núcleos por fibra e domínio nuclear nas fibras musculares do gastrocnêmio dos grupos Controle e ADR que foram submetidos ao exercício de resistência. (A) Presença de núcleos centrais, (B) número de núcleos por fibra e (C) domínio nuclear. n = 5 animais por grupo, *p<0,05 vs Controle, **p<0,01 vs Controle. Pontos indicam a presença de *outlier*.

Contudo, a exposição prolongada de animais a ADR resultou na redução de núcleos centrais do músculo sóleo de ratos em resposta a um tratamento com administração de ADR semanal ao longo de 4 semanas (KWON, 2020), assim como a análise de uma dose aguda em animais exercitados reduziu a presença de núcleos centrais no músculo sóleo de ratos 24 horas após o exercício (HUANG et al., 2017).

Alterações no número de núcleos de fibras musculares pode indicar um presente crescimento ou hipertrofia muscular, visto o papel de células satélites da musculatura esquelética e sua fusão com fibras musculares nestes processos levarem ao aumento de núcleos no tecido. A redução de núcleos/fibra por sua vez, pode demonstrar um processo de lesão às fibras (SCHIAFFINO et al., 2013). Apesar de não ter sido encontrado uma redução da área média das fibras musculares, a redução de núcleos presentes e aumento do domínio nuclear indicam a presença de lesão causada por ADR na atividade nuclear, sem haver alteração das áreas de fibras.

Seguindo a hipótese de inclusão de núcleos em razão de hipertrofia muscular e de redução de núcleos em quadros de atrofia, cada núcleo presente nas fibras musculares apresentaria atividade sobre um determinado volume de citoplasma, sendo o núcleo responsável pela transcrição e síntese proteica das suas regiões

imediatas. Esta compartimentalização do volume citoplasmático em regiões correspondentes a um núcleo celular estabelece uma relação linear entre o tamanho da fibra muscular e seu conteúdo nuclear, e é chamada de domínio nuclear (SNIJDERS et al., 2020).

Contrariando esta hipótese, a atrofia muscular sem a redução do número de núcleos, como observado em diferentes modelos experimentais de atrofia muscular, resultaria em alterações nos valores obtido para o domínio nuclear (SNIJDERS et al., 2020). Desta forma, a atrofia muscular poderia ser acompanhada por alterações nos valores de domínio nuclear. Como foi observado, a redução de núcleos/fibra nos animais do grupo ADR do protocolo de EFR sem estar acompanhada de alterações na área média das fibras levou a alteração do valor encontrado para o domínio nuclear, podendo indicar um processo de lesão presente nestes animais.

4.2 INIBIÇAO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3

Diferentes estudos discorrem sobre o envolvimento de STAT3 e os mecanismos de lesão renal, reportando melhora no quadro de albuminúria, redução da expansão mesangial, infiltração de células inflamatórias e da fibrose intersticial no tecido renal em resposta a inativação de STAT3 (PACE et al., 2019).

Apesar da presença constitutiva de STAT3 no tecido renal, em quadros como a GESF é observado aumento dos níveis de STAT3 fosforilada (pSTAT3) nas regiões tubulares e vascular do tecido renal (BIENAIME et al., 2016; LI et al., 2007; TAO et al., 2018).

4.2.1 Peso corporal

De mesmo modo que os grupos ADR, a administração de ADR, mesmo com a administração conjunta de Stattic, levou a uma queda do peso corporal dos animais em ambos os protocolos sedentário e de EFR. Apesar dos possíveis envolvimentos da via STAT3 na progressão da lesão renal, a inibição da via após a indução da nefropatia não causou alterações na manutenção do peso corporal (Figura 16).

A comparação entre os grupos ADR e ADR + Stattic demonstra que a inativação da via de sinalização STAT3 não causa alterações na variação do peso corporal causado pela ADR no caso de animais do protocolo sedentário, enquanto

para o protocolo de exercício é observado uma recuperação do peso corporal apenas no décimo dia. Apesar dessa breve recuperação no ponto de 10 dias após a indução da lesão renal, o grupo ADR + Stattic volta a não apresentar diferenças com o grupo ADR no período de 14 dias (Figura 17).

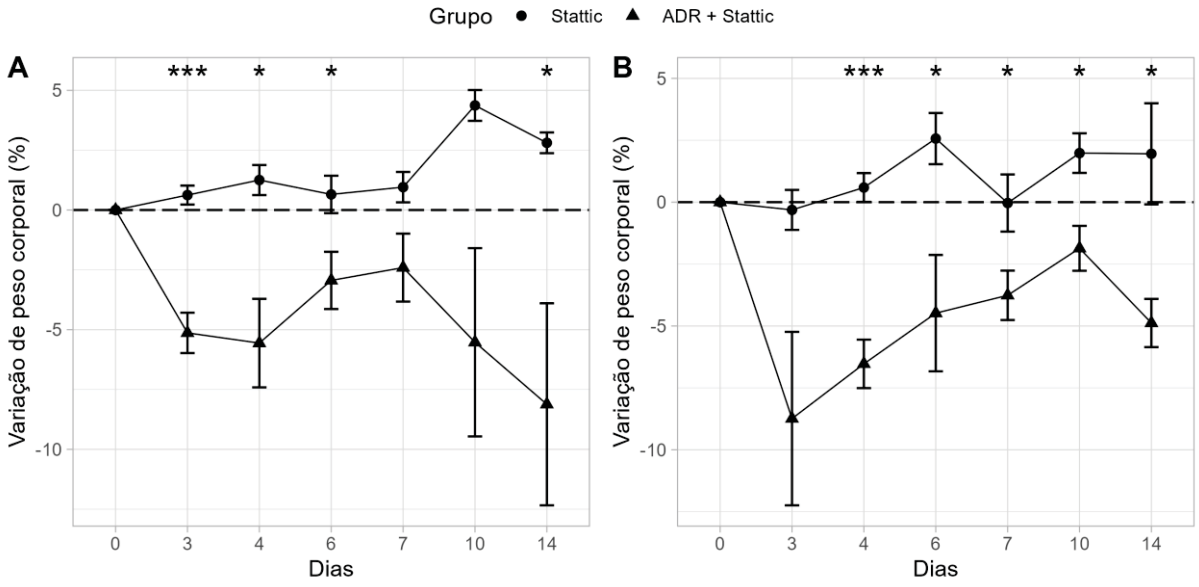


Figura 16 - Variação de peso corporal dos animais tratados com Stattic. (A) Sedentário e (B) Exercício que receberam Stattic ou ADR + Stattic. n=6 por grupo, *p<0,05, ***p<0,001.

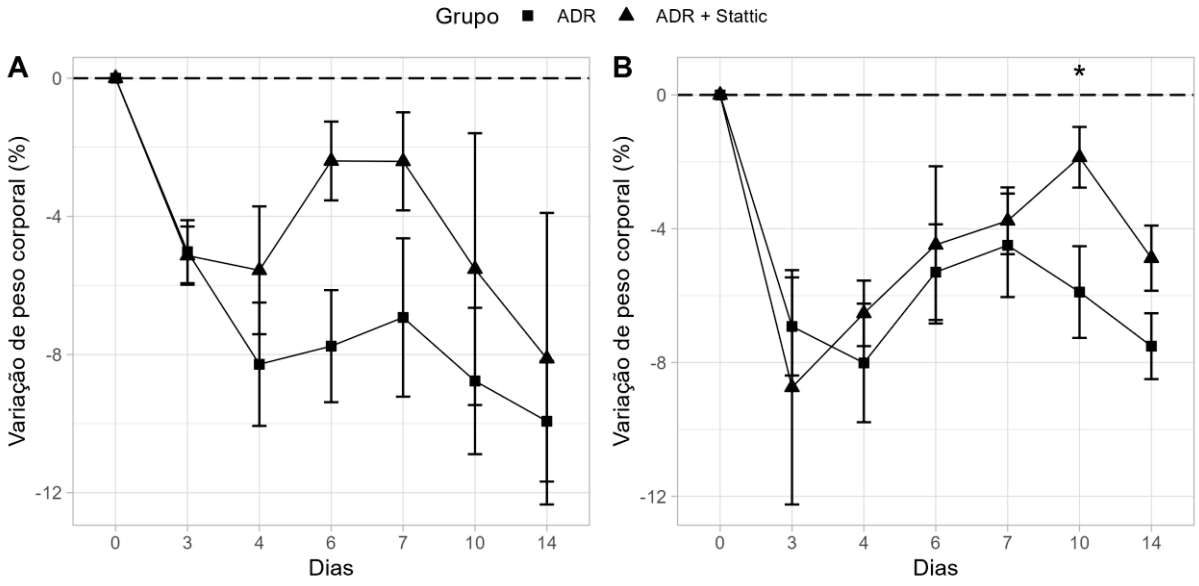


Figura 17 - Comparação da variação de peso corporal dos animais ADR e ADR + Stattic. (A) Animais do protocolo Sedentário e (B) animais do protocolo de EFR**.** n=6 por grupo, *p<0,05.

4.2.2 A lesão renal após inibição da via STAT3

Estudos envolvendo a progressão de lesão renal e a ação da STAT3 nos mecanismos de fibrose, infiltrado inflamatório e quadro de proteinúria destacam o papel da ativação de STAT3 como um potencial modulador do comprometimento da barreira de filtração glomerular (PACE et al., 2019).

A inativação da via STAT3 resultou em níveis de albumina/creatinina que não apresentaram diferenças significativas ao longo do período de 14 dias apesar de uma aparente progressão da albuminúria para os animais do protocolo sedentário entre os intervalos de tempo analisados. Em comparação, animais do protocolo de exercício de resistência além de não obterem aumento da albuminúria ao longo do tempo, expressam menores níveis de albumina/creatinina urinária (Figura 18).

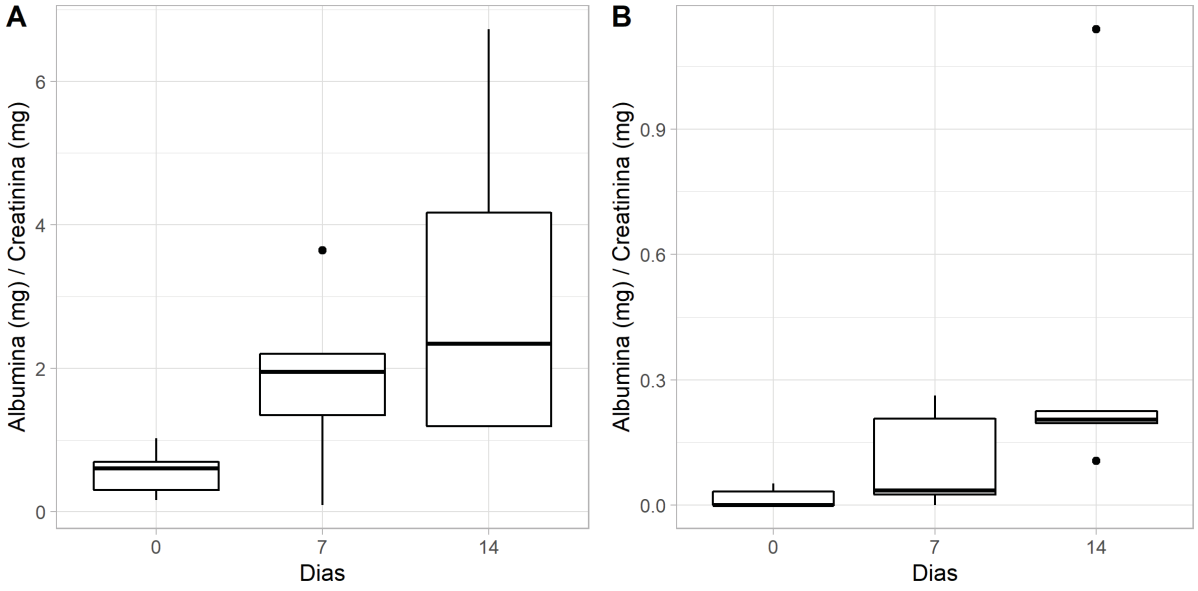


Figura 18 – Albuminúria e a inibição da STAT3 em camundongos que receberam adriamicina dos protocolos sedentário e exercício. Grupos ADR + Stattic (A) Sedentário e (B) Exercício de resistência não apresentaram diferenças significativas nos níveis de albuminúria ao longo de 14 dias. n = 5 animais por grupo. Pontos indicam a presença de *outlier*.

Em comparação com o grupo ADR do protocolo sedentário (Figura 5), a inibição da via STAT3 após ADR resultou, também em animais sedentários, na conversão da resposta intensa observada pelos maiores níveis de albumina/creatinina no intervalo de 7 dias dos animais ADR sedentário, para uma resposta progressiva de albuminúria ao longo dos 14 dias nos animais ADR + Stattic sedentários. Assim como observado para os animais ADR do protocolo de exercício, a inibição de STAT3

aparenta causar a redução da agressividade do modelo por ADR, reduzindo a progressão da lesão renal e atrasando a manifestação de proteinúria para além do período de 7 dias.

Utilizando modelo experimental de nefrite lúpica, Edwards *et al*., (2015) encontraram um efeito de adiamento da lesão renal em resposta ao tratamento de curta duração utilizando Stattic. Neste modelo experimental, com o passar da idade os animais manifestam a doença autoimune e apresentam marcadores de lesão renal. Contudo, camundongos tratados com Stattic intraperitoneal por duas semanas apresentaram atraso do quadro de proteinúria em até 3 semanas em comparação com animais não tratados (EDWARDS; MIZUI; KYTTARIS, 2015).

Em concordância com este achado, Li *et al*., (2007), utilizaram a inibição de JAK2, que resultou em menor ativação de STAT3 no tecido renal, ocasionando a redução da excreção urinária de albumina (albumina/creatinina) ao longo de 6 semanas, e atenuando a presença de glomeruloesclerose e lesão tubulointersticial no rim de camundongos com nefropatia induzida por ADR.

Em complemento, níveis de ativação de STAT3 (pSTAT3/STAT3) se encontram elevados no tecido renal em diferentes estudos envolvendo a progressão de lesão renal (EDWARDS; MIZUI; KYTTARIS, 2015; LI et al., 2007; ZHANG et al., 2017; ZHENG et al., 2019), acompanhados de modulação da evolução de fibrose e redução da proteinúria decorrentes da progressão da lesão.

Pela presença do efeito atenuador dos níveis de albumina/creatinina urinários tanto para o exercício físico, quanto para a inibição da via STAT3, os níveis de albuminúria dos grupos com ambas as intervenções foram comparados. Ao analisar os níveis de albumina/creatinina urinária dos grupos ADR + Stattic, percebe-se nos períodos de 7 e 14 dias após a administração de ADR que há redução dos níveis de proteinúria dos animais do protocolo de exercício em comparação aos animais sedentários (Figura 19). A comparação entre todos os grupos dos protocolos sedentário e exercício estão presentes no apêndice 1.

A redução de albumina/creatinina encontrada para o grupo ADR + Stattic do protocolo de exercício em comparação ao grupo ADR + Stattic sedentário, assim como a observação de um efeito de adiamento do pico de albuminúria causados tanto pelo exercício quanto a inativação de STAT3, fornecem bases para a sugestão de um efeito conjunto do bloqueio da via de sinalização STAT3 e do efeito protetor do exercício

físico de resistência sobre a instalação da proteinúria e melhora da resposta do tecido renal.

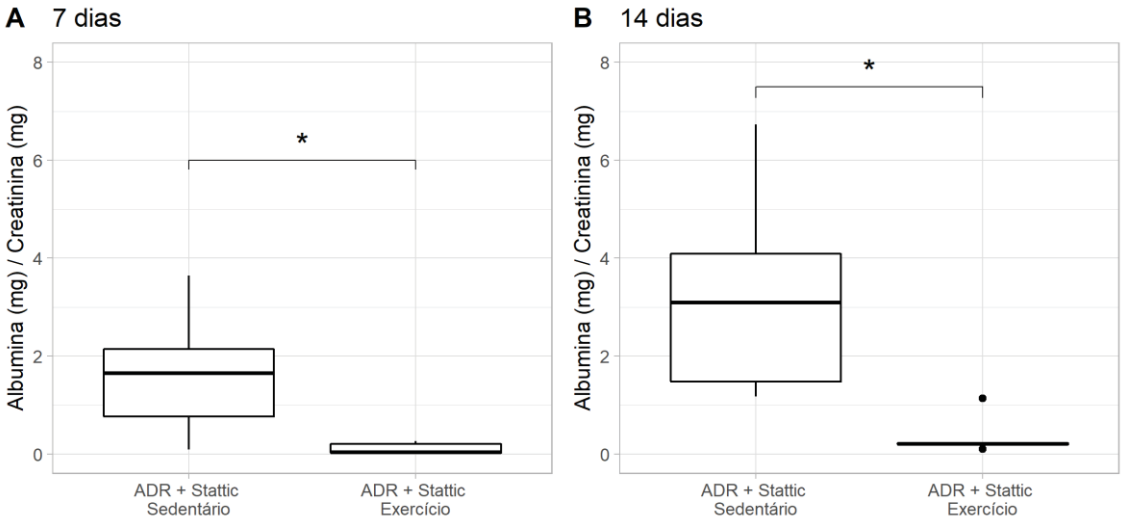


Figura 19 - Albumina/creatinina urinária dos animais do grupo ADR + Stattic que foram submetidos ao exercício de resistência e sedentários. Intervalos de (A) 7 dias e (B) 14 dias após administração de adriamicina. n=5 (Sedentário) a 6 (Exercício). *p<0,05. Pontos indicam a presença de *outlier*.

Parâmetros séricos envolvidos com a funcionalidade renal foram analisados, conforme a Tabela 6.

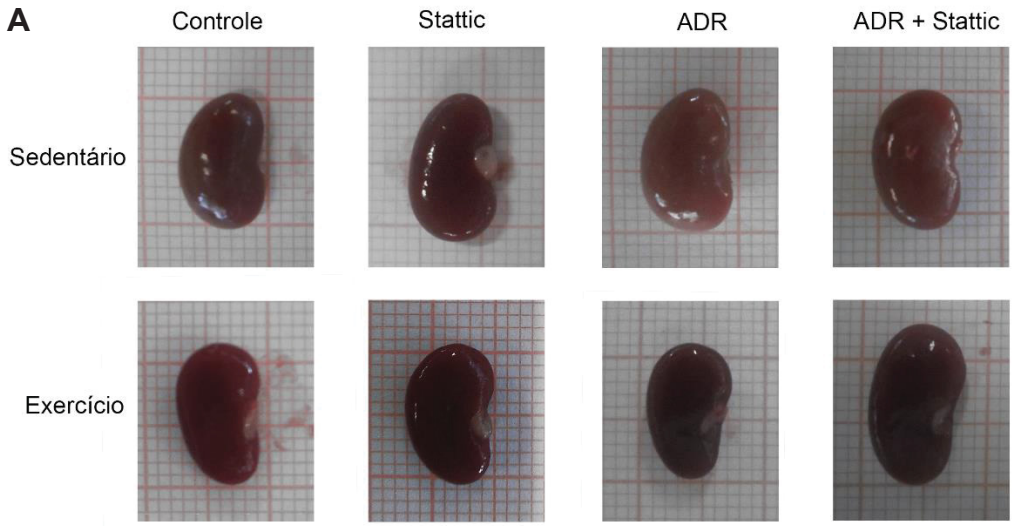
Tabela 6 - Parâmetros séricos da funcionalidade renal

	Grupo	Ureia (mg/dL)	Albumina (g/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
Sedentário	Controle	50,5 ± 2,9	2,3 ± 0,17^{ab}	64,0 ± 9,0^{ab}
	Stattic	48,6 ± 2,7	2,3 ± 0,02^{ab}	60,9 ± 6,3^{ab}
	ADR	56,1 ± 3,1	2,5 ± 0,23^{a}	61,3 ± 1,6^{ab}
	ADR + Stattic	60,2 ± 9,6	2,3 ± 0,14^{ab}	98,2 ± 28,3^{ab}
Exercício	Controle	70,6 ± 5,8	2,3 ± 0,29^{ab}	146,3 ± 45,9^{a}
	Stattic	60.1 ± 3,9	2,1 ± 0,16^{ab}	105,1 ± 19,2^{ab}
	ADR	68,5 ± 9,9	2,1 ± 0,05^{ab}	136,8 ± 25,2^{a}
	ADR + Stattic	54,6 ± 9,5	1,6 ± 0,16^{b}	34,0 ± 7,9^{b}

Avaliação de uréia, albumina e triglicerídeos séricos. n = 3 a 4 animais por grupo. Letras indicam diferença estatística, onde valores com letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças entre os grupos para os níveis de ureia sérica. Enquanto isso, o grupo ADR + Stattic do protocolo de exercício apresentou níveis reduzidos de albumina sérica em comparação ao grupo ADR sedentário, apesar de nenhum dos grupos apresentar diferenças em comparação aos grupos controle. A análise de triglicerídeos demonstrou uma redução dos valores para o grupo ADR + Stattic em comparação com o grupo Controle, ambos do protocolo de exercício de resistência. Os demais grupos não apresentaram diferenças entre sí ($p>0,05$).

A análise do tamanho e do peso do tecido renal revelou um aumento de ambos os parâmetros para o grupo controle exercício em comparação ao grupo controle sedentário. Da mesma forma, o grupo ADR + Stattic do protocolo de EFR apresentou valores aumentados em relação ao controle sedentário, havendo também aumento do peso do rim esquerdo dos animais Stattic EFR em comparação ao controle sedentário (Figura 20).



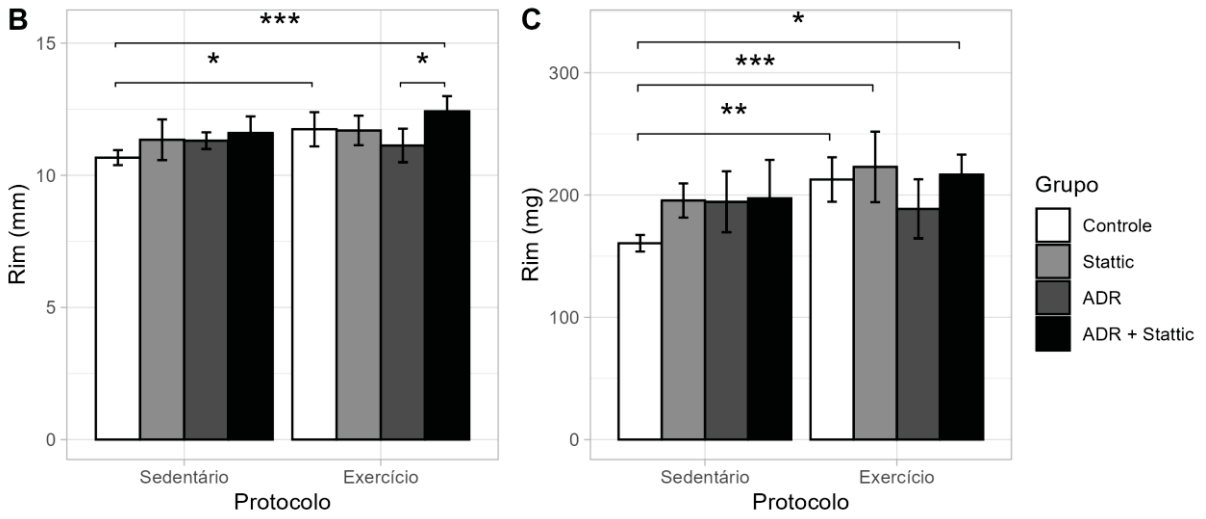


Figura 20 - Medidas de tamanho e peso do rim esquerdo dos grupos experimentais. (A) Imagem representativa do tecido renal dos grupos experimentais. (B) Mensuração longitudinal do rim esquerdo e (C) peso do rim esquerdo dos grupos experimentais. n=6 por grupo. Média ± desvio padrão.

Diferentes modelos experimentais de DRC apresentam alterações morfológicas do tecido renal, como aparência pálida, granular, redução do tamanho e peso do tecido renal. Utilizando um modelo de lesão renal aguda através da redução temporária da perfusão renal, Zhang et al. (2020) detectaram redução do tamanho e peso do tecido renal após 96 dias da indução da lesão renal aguda. No caso de modelo experimental de DRC induzido em camundongos pela suplementação com adenina, Berru *et al*. (2019) observaram redução da massa e tamanho renal no intervalo de 6 semanas após o início da indução de lesão renal.

Apesar de a ADR levar ao aumento da albuminúria e queda do peso corporal, não foi possível detectar redução do tamanho e peso renal no período de 14 dias do estudo.

4.2.3 Alterações histomorfométricas do músculo gastrocnêmio

4.2.3.1 Peso muscular e deposição lipídica

A mensuração do peso do músculo gastrocnêmio dos animais do grupo ADR e grupo ADR + Stattic revelou novamente um efeito observado no conjunto de exercício e inativação da via STAT3 (Figura 21). Animais do protocolo sedentário não apresentaram diferenças, porém o grupo ADR + Stattic apresentou maior peso muscular em relação ao grupo ADR submetidos ao protocolo de EFR.

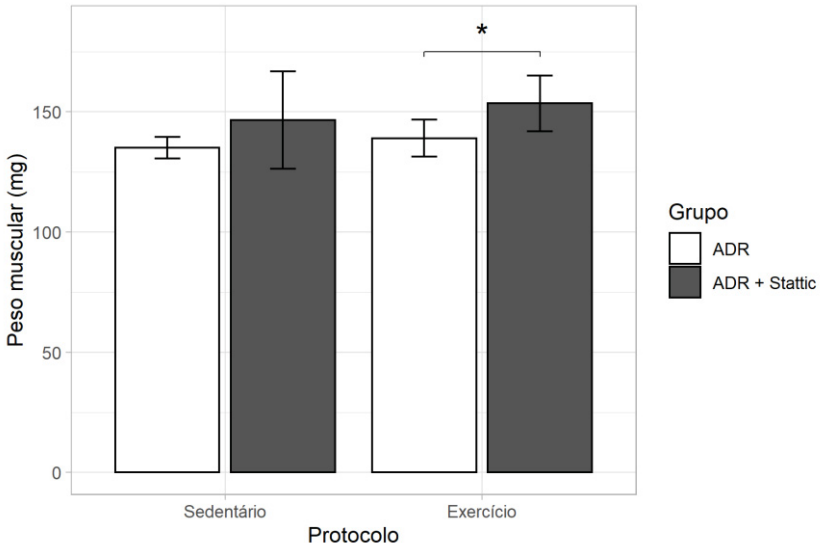


Figura 21 - Peso do gastrocnêmio direito dos animais dos grupos ADR e ADR + Stattic 14 dias após a administração de adriamicina. . n=6, *p<0,05. Média ± desvio padrão.

Conforme discutido anteriormente, a presença de DRC pode ocasionar a redistribuição de lipídeos, aumentando a sua presença em tecidos não-adiposos, como a musculatura esquelética. Aliado a isto, a lesão muscular causada por ADR, através de mecanismos de estresse oxidativo que levam a disfunção mitocondrial, pode ocasionar alterações no metabolismo energético das fibras musculares, alterando seu perfil lipídico (POWERS et al., 2019).

A análise da deposição lipídica revelou que houve um aumento dos níveis de lipídeos intramusculares, tanto para os grupos sedentário quanto para os grupos de EFR, em resposta a ADR. Interessantemente, o grupo ADR de animais submetidos ao exercício não apresentou um aumento significativo comparado ao grupo controle, enquanto o inverso ocorreu no caso de animais sedentários (Figura 22).

Além do efeito do exercício sobre a disposição de transportadores de glucose (GLUT4) permitindo maior captação de glucose por células da musculatura esquelética (KOH et al., 2019), a STAT3 promove a translocação de GLUT4 à membrana plasmática a partir de estímulos como IL-6 e IL-15. Deste modo, a inibição de STAT3 causa a redução da captação de glucose pela redução da presença de transportadores GLUT4 em células da musculatura esquelética (KROLOPP; THORNTON; ABBOTT, 2016).

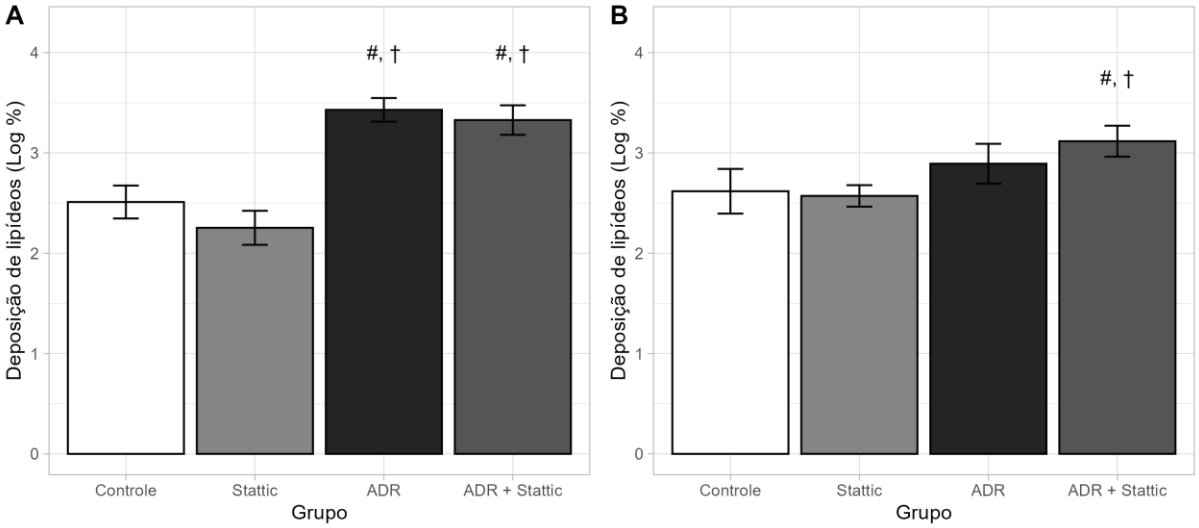


Figura 22 - Deposição de lipídeos intramusculares no músculo gastrocnêmio. (A) Protocolo sedentário e (B) protocolo de exercício de resistência. n=5 a 6 por grupo. #=p<0,001 vs Controle. †=p<0,001 vs Stattic. Média ± desvio padrão.

Associado com os mecanismos de translocação de GLUT4 à membrana de células musculares, o exercício físico leva a ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK). O aumento de IL-6 muscular pela prática de exercício ocasiona, via AMPK, aumento da oxidação de ácidos graxos no tecido muscular (YAMAGUCHI et al., 2015).

A redução da capacidade de oxidação de ácidos graxos pode ocasionar a relocação lipídica para armazenamento ectópico, aumentando os níveis de lipídeos em células musculares, sendo que o exercício físico promove melhoras na oxidação lipídica no tecido muscular esquelético (BERGGREN et al., 2008). Desta forma, a ausência do aumento da deposição lipídica no grupo ADR do protocolo de exercício pode ser explicada pelo efeito promovido pela prática de exercício sobre a oxidação lipídica nas células musculares.

A presença do inibidor da via de sinalização STAT3 não ocasionou alterações na deposição lipídica, nem atenuou o quadro dos animais ADR + Stattic no protocolo sedentário. No caso de animais do protocolo de EFR, o grupo ADR + Stattic se manifesta com aumento da deposição lipídica.

A leptina é um dos componentes da regulação do metabolismo energético do músculo esquelético. A ativação de receptores de leptina leva a fosforilação de proteínas JAK, desencadeando a ativação de vias de sinalização, incluindo AMPK e STAT3 (GUADALUPE-GRAU et al., 2014). A ativação de STAT3 está relacionada com

aumento da capacidade oxidativa de lipídeos no tecido muscular (PÉREZ-LÓPEZ et al., 2019; WOLSK et al., 2011). Assim sendo, o aumento da deposição lipídica para o grupo ADR + Stattic dos animais sedentários está relacionada com a inibição da via STAT3, impedindo o total funcionamento dos mecanismos de oxidação lipídica e contrabalanceando o efeito do exercício nesta função.

4.2.3.2 Área de secção transversa e distribuição de fibras musculares

Para avaliar o efeito direto do exercício e STAT3 nas fibras musculares, foi avaliada a área de secção transversa e distribuição das fibras musculares do músculo gastrocnêmio.

A participação da STAT3 na manutenção do tecido muscular, especificamente das fibras musculares, ocorre por mecanismos de controle e manutenção da expansão e especialização de células satélites (Figura 23).

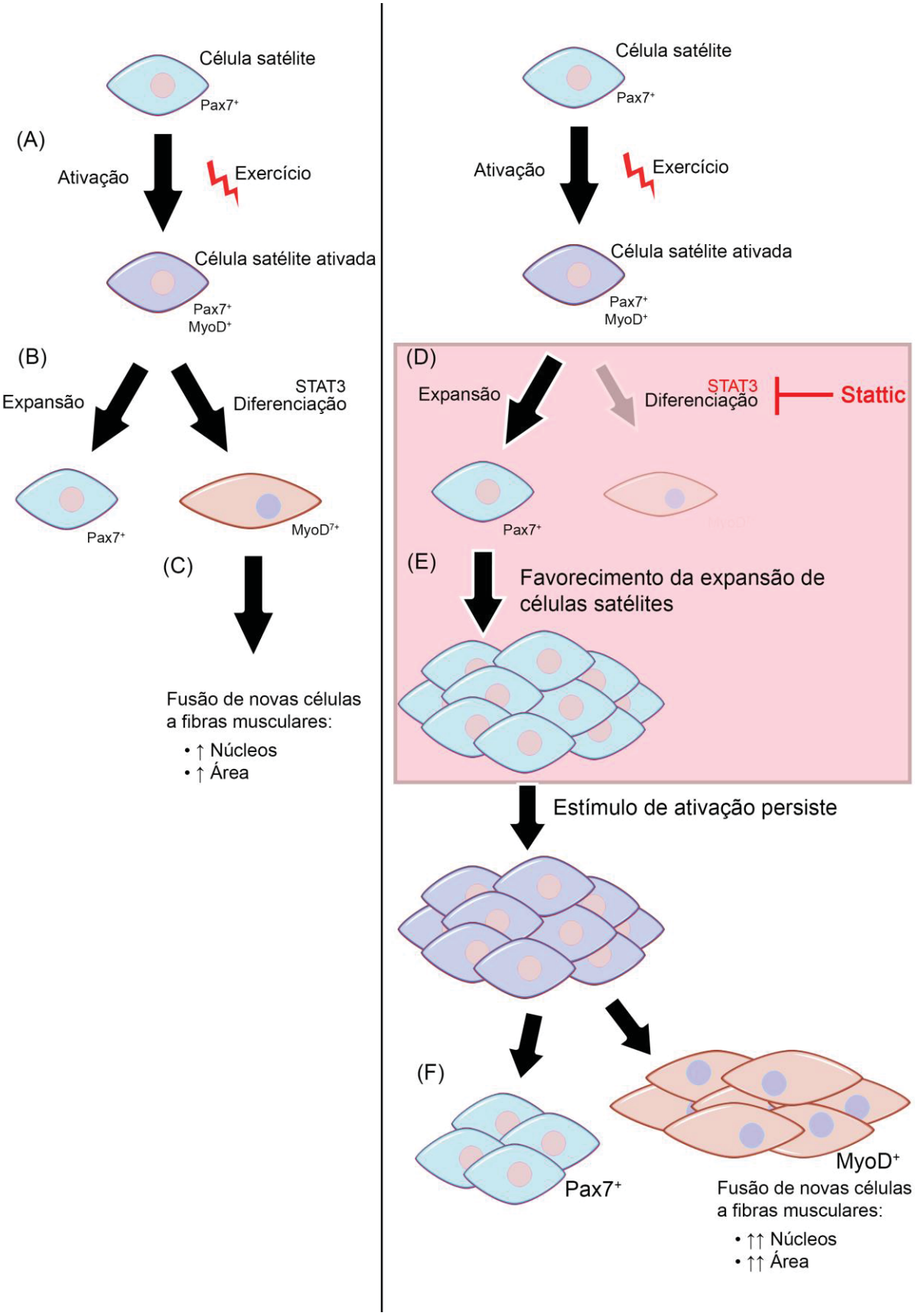


Figura 23 - A via de sinalização STAT3 participa da regulação da expansão e diferenciação de células satélites. (A) Estímulos como exercício podem ativar células satélites para o processo de regeneração do tecido. (B) Células ativadas promovem expansão de células satélites (Pax7^{+}) e células

miogênicas diferenciadas (MyoD^{+}). (C) Células MyoD^{+} promovem a regeneração, reparo e crescimento do tecido por um processo de fusão com fibras musculares, resultando em aumento de núcleos e da área dessas fibras. (D) O processo de diferenciação é alterado pela inibição de STAT3, sem haver redução da capacidade de expansão das células satélites. (E) A inibição de STAT3, portanto, favorece o processo de expansão de células satélites. (F) Ao fim da inibição de STAT3 a expansão de células satélites promovida propicia uma maior quantidade de células disponíveis para diferenciação e reparo do tecido. Fonte: o autor.

Células satélites são células específicas do tecido muscular localizadas sobre a lâmina basal das fibras musculares. Estas são células tronco do tecido muscular responsáveis pela regeneração e aumento do número de núcleos presentes nas fibras musculares pela proliferação e processo de fusão de células satélites com as fibras durante crescimento e hipertrofia muscular (CICILIOT; SCHIAFFINO, 2010). Células satélites podem ser identificadas pela presença de proteínas da família Pax (Paired box proteins), 3 e 7.

Seguido de lesão ao tecido muscular, células satélites iniciam proliferação em resposta ao estímulo (A). Sua proliferação resulta em novas células indiferenciadas e em células precursoras miogênicas que expressam os reguladores de diferenciação miogênica MyoD (B). A partir da sua ativação, estas células miogênicas iniciam sua diferenciação expressando cadeia pesada de miosina e dão início ao processo de fusão (C) (SCHIAFFINO et al., 2013; TIERNEY et al., 2014).

No período recente após estímulo de lesão das fibras, STAT3 apresenta uma regulação da proliferação e regeneração de fibras musculares. A inibição de STAT3 durante o período inicial de resposta a lesão ocasiona a redução da expressão de Myod1 e expansão de células satélites (D), com aumento da regeneração de miofibras, observado por aumento da área de secção transversa de fibras lesionadas tratadas com inibidor de STAT3. Este efeito não é observado em intervalos de tempo maiores, e não é encontrado em fibras musculares maduras na ausência de estímulo de lesão (TIERNEY et al., 2014).

Deste modo, a inibição de STAT3 possibilita a proliferação de células satélites, aumentando a disponibilidade dessas células para o processo de regeneração muscular, renovando os estoques de células satélites ao longo do período de tempo de inibição (E). Com o fim da inibição da STAT3, estas células satélites, agora em maior número, podem retomar o processo de diferenciação e atuar em processos regenerativos do tecido muscular (F).

O mecanismo de hipertrofia com participação de células satélites está relacionado ao estímulo muscular agudo, com indução de leão das fibras musculares. Por outro lado, um mecanismo de hipertrofia onde não ocorre a lesão muscular, e portanto, sem a participação de células satélites, pode ocorrer através do aumento da síntese proteica das células musculares residentes (SCHIAFFINO et al., 2013).

Ao analisar a distribuição das fibras musculares por sua área de secção transversa, observamos a distribuição diferencial de fibras do grupo Stattic em relação ao controle para fibras com área entre 401 e 800 μm^2 dos grupos sedentários e uma distribuição diferencial de fibras com área entre 2001 a 2400 μm^2 (Figura 22), enquanto não há aparente diferença entre a distribuição de fibras de animais do grupo ADR + Stattic (Figura 24). Nenhuma diferença na distribuição de fibras por sua área foi encontrada para o grupo ADR + Stattic (Figura 25).

O aumento de níveis de citocinas inflamatórias no tecido muscular resulta na fosforilação de STAT3. Em quadros de caquexia, esta ativação de STAT3 por IL-6 no tecido muscular leva a redução da massa muscular e atrofia das fibras, enquanto o bloqueio da via de sinalização é capaz de inibir este efeito (BONETTO et al., 2012).

Este dado pode refletir uma alteração transiente encontrada na inibição de STAT3 e estímulos sobre o tecido muscular. Por seu papel na diferenciação miogênica, a inativação de STAT3 em momentos distintos referentes ao estímulo de lesão pode levar a alterações no comportamento das fibras musculares, alterando as populações de fibras quando analisadas pela estratificação por seu tamanho.

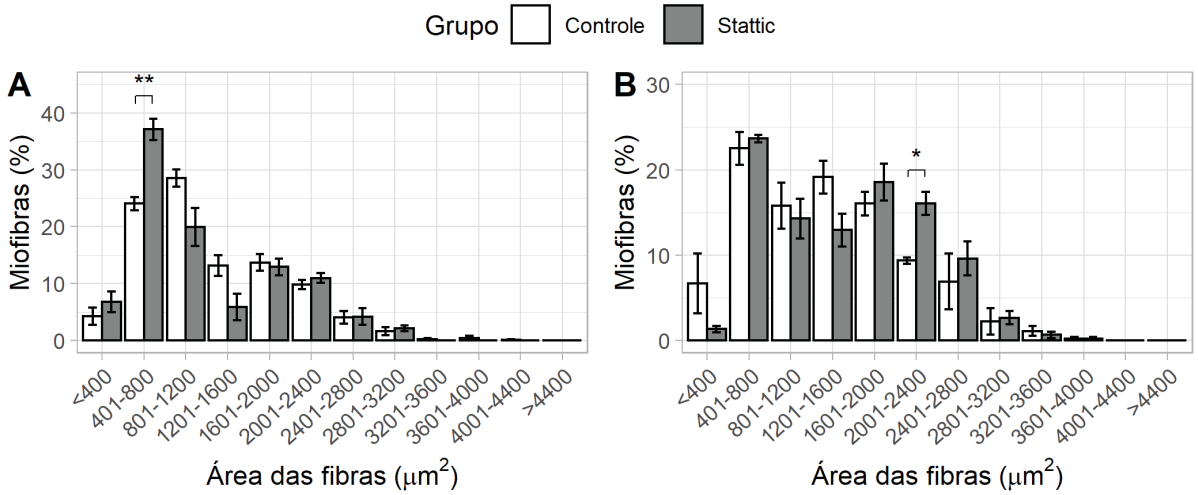


Figura 24 - Distribuição das fibras do gastrocnêmio por área de secção transversa do grupo Stattic. (A) Animais Sedentário e (B) animais do protocolo de exercício de resistência. n=3 a 5 animais por grupo, *p<0,05, **p<0,01. Média ± desvio padrão.

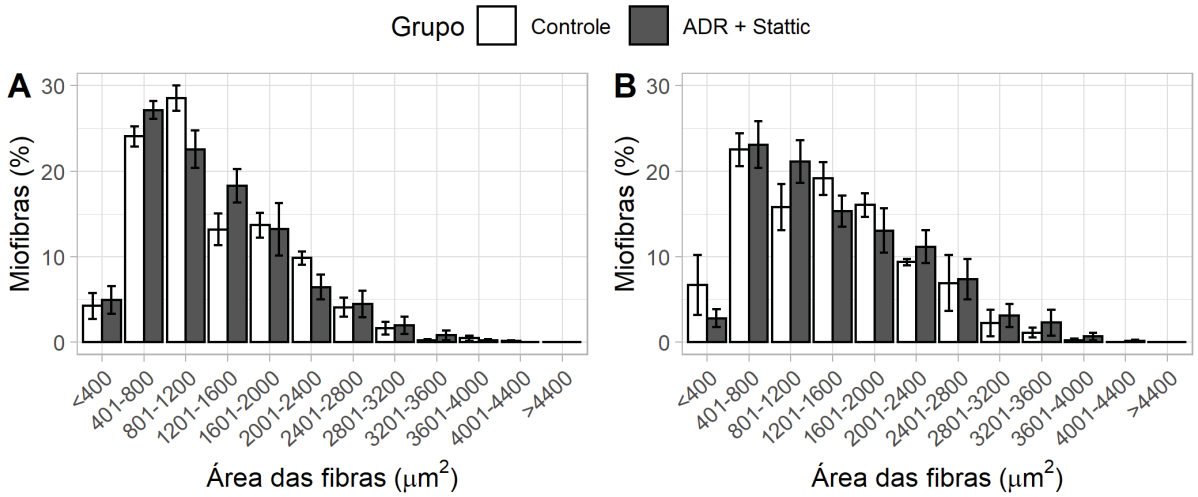


Figura 25 - Distribuição das fibras do gastrocnêmio por área de secção transversa do grupo ADR + Stattic. (A) Animais Sedentário e (B) animais do protocolo de exercício de resistência. n=3 a 5 animais por grupo. Média ± desvio padrão.

Em seu estudo, Tierney *et al*., (2014) obtiveram aumento da população de fibras de maior tamanho no período de 5 dias após o estimulo de lesão acompanhado com a inibição de STAT3. Porém, a análise de fibras de 25 dias após o estimulo de lesão revelou que, mesmo com a inibição de STAT3 ao decorrer da lesão, não havia alterações detectáveis no aumento de área das fibras. Desta forma, o período entre o estímulo de lesão e análise é fundamental para a observação de diferenças causadas pelo bloqueio da via de sinalização STAT3, podendo não ser possível observar estas alterações no período de 14 dias.

Para complementar estes achados, a mensuração dos diâmetros maiores e menores das fibras musculares resultou em uma redução dos diâmetros menor e maior para o grupo ADR, e aumento dos diâmetros menor e maior para o grupo Stattic dos animais sedentários, indicando a presença de uma lesão devido a administração de ADR, e um efeito modulatório da proliferação e expansão de fibras pela administração de Stattic. Esta modulação resultou em uma compensação para o grupo ADR + Stattic, que não apresentou diferenças em comparação ao grupo controle (Tabela 7).

Enquanto isso, para os grupos do protocolo de exercício de resistência, foi observado um aumento dos diâmetros maior e menor do grupo ADR + Stattic (Tabela 8).

Tabela 7 – Área e diâmetros das fibras musculares dos grupos sedentários.

Grupo	Área (μm²)	Diâmetro menor (μm)	Diâmetro maior (μm)
Controle	1416,2 (291,0)	30,0 (11,3)[a]	44,8 (18,9)[a]
Stattic	1360,8 (204,5)	31,0 (11,9)[b]	43,3 (17,8)[b]
ADR	1460,5 (18,2)	26,7 (10,9)[c]	40,3 (14,0)[c]
ADR + Stattic	1299,4 (385,3)	29,8 (10,9)[a]	45,6 (14,7)[a]

Mediana (Intervalo interquartil). Letras indicam diferença estatística, onde valores com letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Área e diâmetros das fibras musculares dos grupos de Exercício

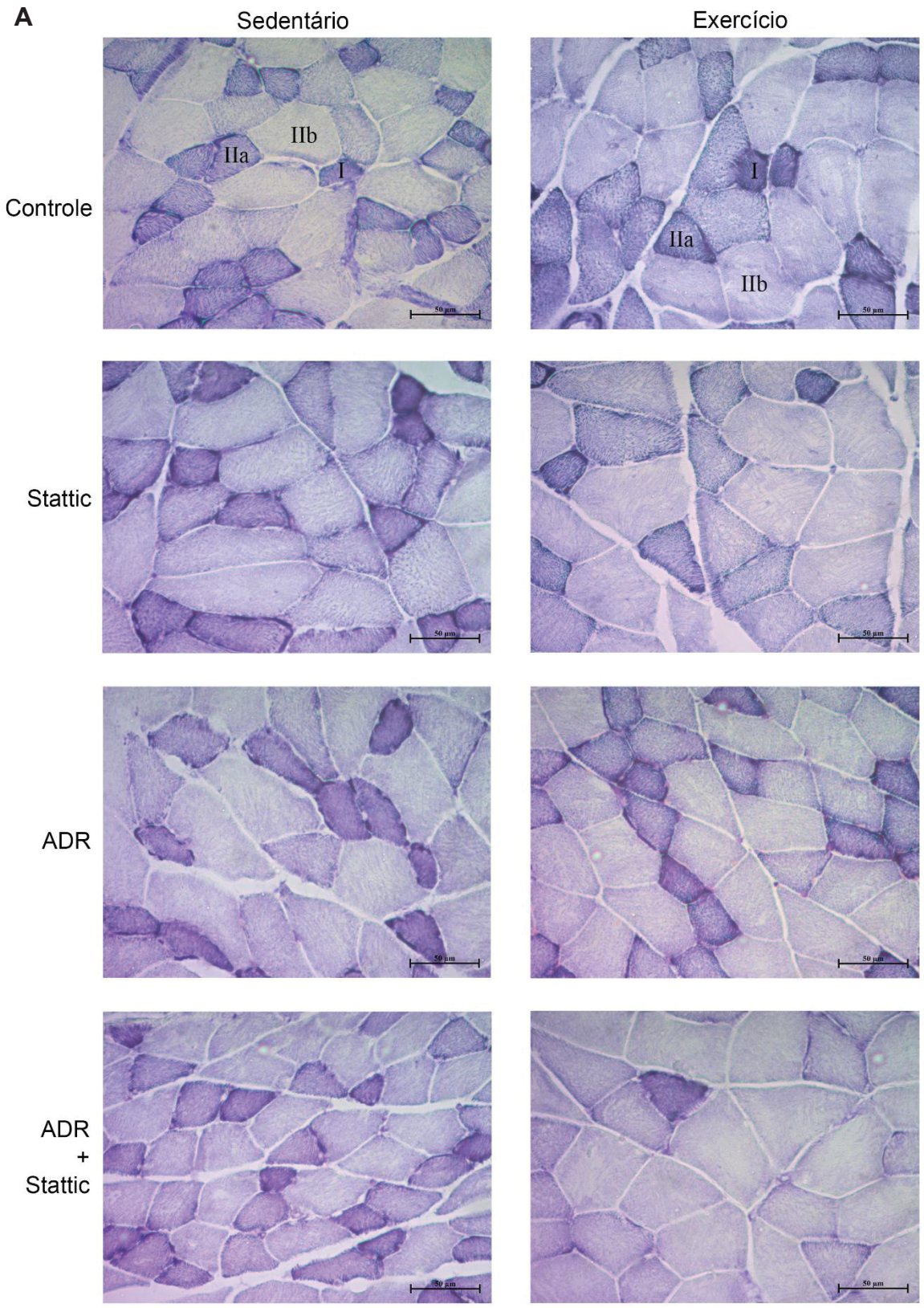
Grupo	Área (μm²)	Diâmetro menor (μm)	Diâmetro maior (μm)
Controle	1605,0 (344,5)	28,6 (9,2)[a]	42,4 (13,9)[a]
Stattic	1792,2 (134,4)	28,1 (9,7)[a]	42,0 (13,6)[a]
ADR	1602,6 (28,5)	27,5 (12,1)[a]	42,8 (18,4)[a]
ADR + Stattic	1924,3 (513,7)	30,9 (11,7)[b]	45,8 (16,3)[b]

Mediana (Intervalo interquartil). Letras indicam diferença estatística, onde valores com letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Desta forma, a redução dos diâmetros menor e maior para o grupo ADR dos animais sedentários sinaliza um processo de lesão capaz de levar a atrofia das fibras devido ADR. Por outro lado, o grupo ADR + Stattic dos animais submetido ao exercício de resistência demonstrou aumento dos diâmetros menor e maior, indicando ação do protocolo de exercício em conjunto com a inibição de STAT3 favorecendo o processo de regeneração das fibras lesionadas por ADR.

De mesmo modo, Tierney *et al*., (2014) observaram não um aumento da área de secção média das fibras, mas um aumento da área das fibras pela estratificação das fibras musculares por seu tamanho. Desta forma, apesar de não ter sido encontrado diferenças entre as áreas média das fibras por grupo, a análise por tamanho de diâmetros pode revelar um efeito da intervenção sobre o tecido muscular.

4.2.3.3 Tipagem de fibras e número de capilares


A
Sedentário
Exercício
Controle
Stattic
ADR
ADR
+
Stattic
IIb
IIa
I
I
IIa
IIb
50 µm

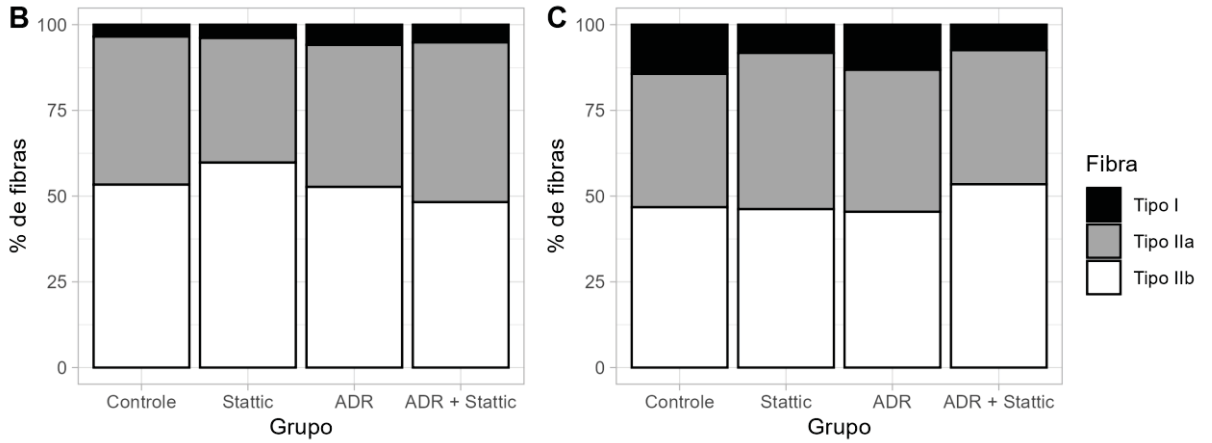


Figura 26 - Composição muscular por tipo de fibras. (A) Músculo gastrocnêmio corado pela técnica de NADH-TR, com fibras do tipo I, tipo IIa e tipo IIb em aumento de 400x; barra de escala: 50 µm. (B) Composição percentual de fibras dos grupos do protocolo sedentário. (C) Composição percentual de fibras dos grupos do protocolo de exercício. n=3 a 5 animais por grupo.

A composição muscular pelo tipo de fibra presente no tecido foi analisada pela técnica histoenzimática de NADH-TR. Não foi encontrado diferenças entre as populações de fibras do tipo I, tipo IIa e tipo IIb em relação ao protocolo de exercício ou sedentário, ou em relação as drogas administradas (Figura 26).

A mensuração da área de cada tipo de fibra resultou em uma redução da área de fibras do tipo I e IIa para o grupo Stattic, e redução da área de fibras do tipo IIb para o grupo ADR dos animais sedentário (Tabela 9).

Tabela 9 - Área média das fibras musculares por tipo de fibra dos animais sedentário

Protocolo	**Grupo**	**Área de fibras (µm²)**		
		Tipo I	**Tipo IIa**	**Tipo IIb**
Sedentário	Controle	661,2 ± 17,4^{a}	1016,4 ± 18,0^{a}	1989,2 ± 30,8^{b}
	Stattic	509,2 ± 13,2^{b}	853,7 ± 17,8^{b}	2006,4 ± 31,1^{b}
	ADR	656,3 ± 13,7^{a}	1018,7 ± 16,7^{a}	1839,9 ± 27,1^{a}
	ADR + Stattic	619,3 ± 14,9^{a}	1051,6 ± 19,3^{a}	1943,8 ± 32,3^{ab}

Área de secção transversa por tipo de fibra dos animais sedentários. n = de 3 a 5 animais por grupo. Média ± erro padrão da média. Letras indicam diferença estatística, onde valores com letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Conforme discutido, alterações na área das fibras pode refletir alterações metabólicas e processos danosos às fibras musculares, com favorecimento para atrofia das fibras do tipo IIb em resposta aos estímulos (SCHIAFFINO; REGGIANI,

2011), como observado pela redução da área das fibras IIb em resposta a ADR. Apesar da redução das áreas de fibras I e IIa para o grupo Stattic, fibras IIb não sofreram alterações por sua administração, sendo observado reversão da atrofia causada por ADR pela recuperação da área de fibras IIb do grupo ADR + Stattic.

Diferentemente, os grupos pertencentes ao protocolo de exercício demonstraram um aumento da área das fibras do tipo I sobre a inativação da via STAT3, sendo observado um aumento para os grupos Stattic e ADR + Stattic em comparação ao grupo controle. Já as fibras do tipo IIa sofreram efeito da ADR, sendo observado menores áreas de fibra para os grupos ADR e ADR + Stattic em relação aos grupos controle e Stattic. Enquanto isso, o grupo Stattic novamente apresentou aumento do tamanho das fibras IIa, e também das fibras IIb (Tabela 10).

Tabela 10 - Área média das fibras musculares por tipo de fibra dos animais de exercício de resistência

Protocolo	**Grupo**	**Área de fibras (μm²)**		
		Tipo I	**Tipo IIa**	**Tipo IIb**
Exercício de resistência	Controle	608,6 ± 17,8^{a}	1338,2 ± 25,0^{a}	2169,1 ± 45,9^{ab}
	Stattic	722,9 ± 20,3^{b}	1595,1 ± 37,0^{b}	2248,5 ± 36,0^{bc}
	ADR	680,5 ± 17,9^{ab}	1279,8 ± 24,6^{a}	2055,6 ± 31,8^{a}
	ADR + Stattic	704,9 ± 19,3^{b}	1328,2 ± 26,0^{a}	2311,2 ± 37,6^{c}

Área de secção transversa por tipo de fibra dos animais sedentários. n = de 3 a 5 animais por grupo. Média ± erro padrão da média. Letras indicam diferença estatística, onde valores com letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$).

Seguindo o modelo de inativação de STAT3 resultando em proliferação de células satélites (TIERNEY et al., 2014) e da capacidade do exercício levar a hipertrofia das fibras em razão do exercício através da participação de células satélites neste processo (SCHIAFFINO et al., 2013), este aumento da área de fibras em decorrência da inibição de STAT3 pode ser um reflexo do aumento da população de células satélites ativadas pelo exercício físico durante a ação do Stattic (inibidor de STAT3). Uma vez que cessa o efeito inibitório, a população em maior número de células satélites pode agir no processo de regeneração do tecido muscular, ocasionando aumento das áreas de fibras.

O conjunto de alterações de capilares e alterações nucleares encontradas podem ser observadas na figura 27.

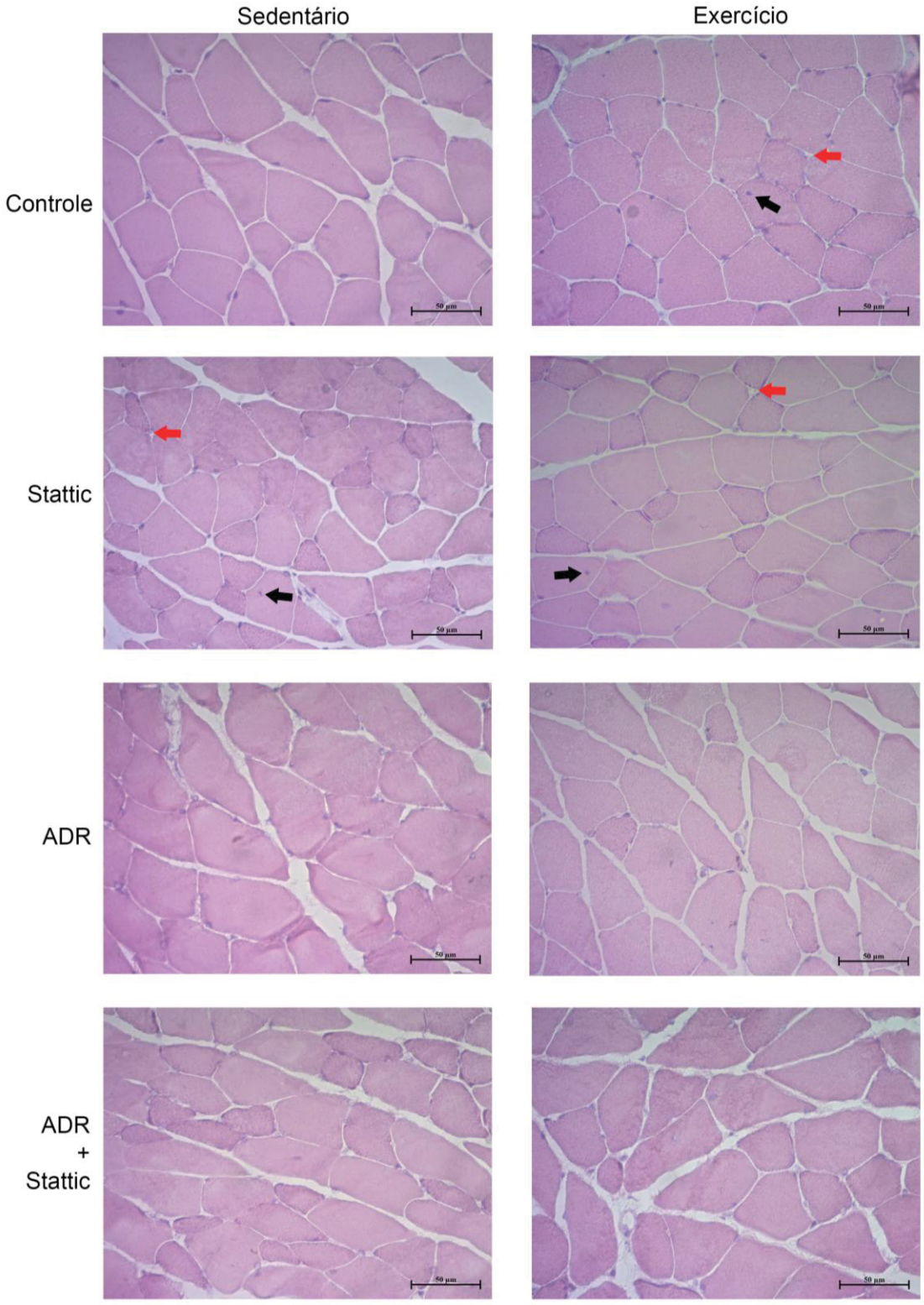


Figura 27 - Músculos gastrocnêmio corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x; barra de escala: 50 µm. Setas pretas indicam exemplos de núcleos centrais; setas vermelhas indicam exemplos de capilares.

Conforme discutido anteriormente e observado pela comparação entre grupos controle dos protocolos sedentário e EFR (Figura 29A), a prática de exercício físico promove o aumento de capilares da musculatura esquelética (GUO et al., 2020). Para os grupos sedentários, não houve diferenças em relação ao grupo controle com os outros grupos, havendo, porém, uma interação entre ADR + Stattic causando redução dos capilares presentes em relação aos grupos Stattic e ADR (Figura 29B). Para os grupos submetidos ao exercício, contudo, houve aumento do número de capilares/fibra para o grupo Stattic em relação ao controle. Além disto, o grupo ADR apresentou valores reduzidos em relação ao grupo Stattic, indicando uma ação deletéria da ADR sobre o conjunto de fatores que eleva a capilarização de animais previamente submetidos ao exercício que receberam Stattic. Por outro lado, a administração conjunta de ADR e Stattic (ADR + Stattic) revelou ser capaz de reverter a perda de capilares observada para o grupo ADR (Figura 28C).

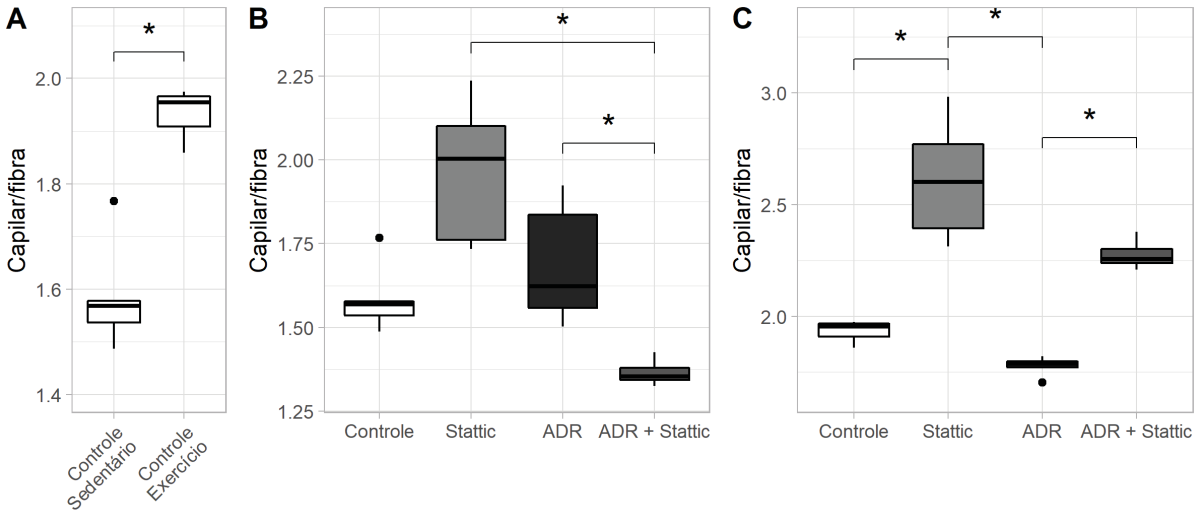


Figura 28 - Número de capilares por fibra muscular. (A) Comparação entre grupos controle sedentário e controle que foram submetidos ao exercício de resistência (dados representados em (B) e (C)). Resultado sinaliza ação do exercício sobre o parâmetro analisado. (B) Capilar/fibra dos animais do protocolo sedentário e, (C) dos animais do protocolo de exercício de resistência. n=5 a 6 por grupo, *p<0,05.

Em resposta a administração prolongada de ADR, D'Lugos *et al*. (2019) observaram uma redução da capilarização do músculo sóleo de ratos, enquanto não foi observada diferença na densidade de capilares para o músculo extensor digital longo. Interessantemente, os autores trazem a importância da manutenção de células satélites no músculo para preservar a capilarização em resposta a ADR, sendo que

as alterações de capilarização encontradas nos músculos sóleo e extensor digital longo podem estar relacionadas com a capacidade de proliferação das células satélites nestes músculos.

Desta forma, o aumento de capilar/fibra observado para o grupo Stattic do protocolo de EFR, e diferença encontrada entre os grupos ADR e ADR + Stattic, podem estar relacionadas com a ação da inibição da via STAT3 na proliferação de células satélites do tecido muscular.

4.2.3.4 Alterações nucleares

Semelhante aos achados para o número de capilares por fibra muscular, a análise de alterações relacionadas ao núcleo celular das fibras do músculo gastrocnêmio revelou um aumento da razão de núcleos por fibra, da presença de núcleos centrais e do domínio nuclear causados pelo exercício.

A razão de núcleos por fibra sofre efeito da administração de ADR, com redução do número de núcleos do grupo ADR + Stattic dos animais sedentário, e redução de núcleo/fibra do grupo ADR para os animais de EFR (Figura 29).

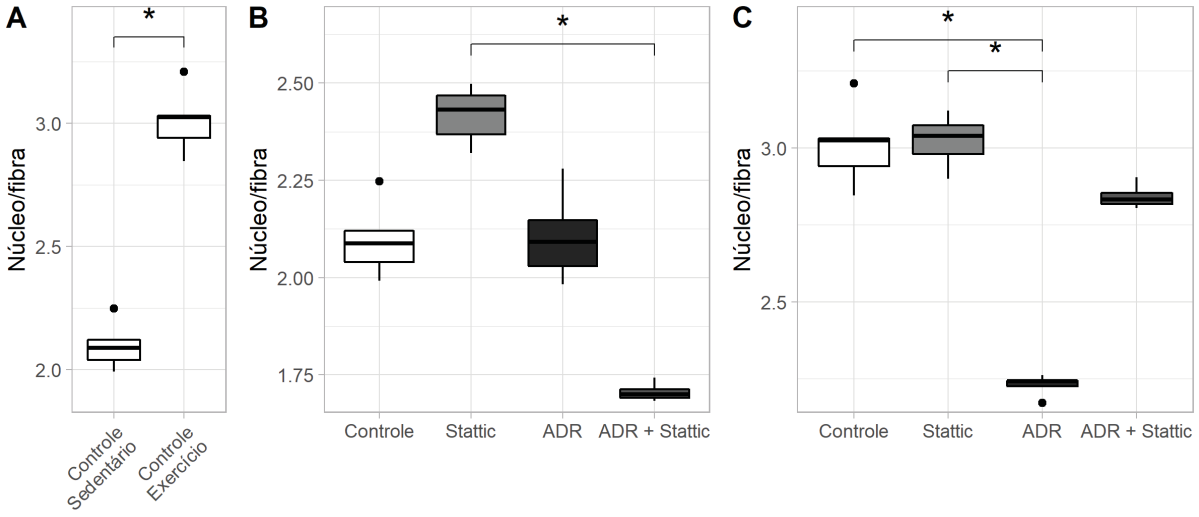


Figura 29 - Núcleo por fibra muscular. (A) Comparação entre controles sedentário e exercício (dados representados em (B) e (C)). (B) Grupos do protocolo sedentário e (C) Grupos do protocolo de exercício de resistência. n=5 a 6 por grupo. *p<0,05.

Conforme discutido, o aumento de núcleos nas fibras musculares está relacionado com o processo de proliferação e fusão de células satélites musculares, que agem como células tronco miogênicas em resposta a estímulos repetidos de

contração – como exercício de resistência – ocasionando hipertrofia muscular (SCHIAFFINO et al., 2013). Enquanto podemos observar um aumento do número de núcleo por fibras musculares em resposta ao modelo de EFR (Figura 29A), observamos que para animais sedentários o grupo ADR não obteve alterações do número de núcleos por fibra (Figura 29B). Por outro lado, é possível observar uma redução do aumento de núcleo/fibra promovido pelo exercício físico no grupo ADR de animais de exercício (Figura 29C).

O grupo ADR + Stattic do protocolo de EFR não demonstrou diferenças comparado aos grupos Controle ou Stattic. Este resultado reflete o efeito de aumento da expansão de células satélites favorecendo o aumento da disponibilidade destas células para o reparo tecidual em resposta ao estímulo danoso. Desta forma, a inibição da via STAT3, mesmo na presença de ADR, proporcionou manutenção do número de núcleos por fibra muscular nos animais do protocolo de EFR.

Em resposta ao estímulo do exercício sobre as fibras musculares, de acordo com a intensidade do exercício e estado de condicionamento físico do indivíduo (ou do modelo animal), pode ocorrer a lesão do músculo estimulado, em diferentes graus, e se instalar um processo de inflamação local. Em resposta a este estímulo, os níveis locais de IL-6 se elevam, ativando a via de sinalização STAT3. Como resultado, o mecanismo de proliferação e fusão de células satélites, assim como mecanismos de hipertrofia, estão relacionados com a ativação via IL-6 do tecido muscular (SCHIAFFINO et al., 2013).

O aumento da presença de núcleos centrais nos animais submetidos ao exercício (Figura 31A) pode indicar um aumento da capacidade adaptativa das células, além de sinalizar a ocorrência de um processo de regeneração das fibras. Como demonstrado por Kobayashi *et al*. (2016), esta relação de núcleos centrais e o processo regenerativo das fibras pode ser notada pelo aumento da presença fibras centronucleadas após se estabelecer uma lesão muscular e administrar ao tecido lesionado células tronco derivadas do tecido muscular, onde a presença de células tronco favorece o processo de regeneração e eleva o número de núcleos centrais observado.

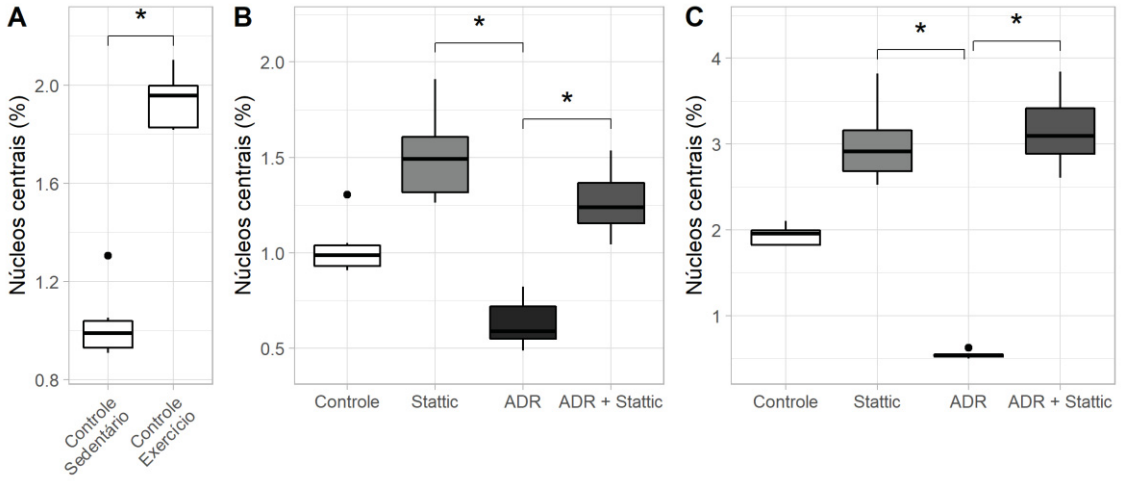


Figura 30 - Ação do exercício e drogas sobre a presença de núcleos centrais. (A) Comparação entre controles sedentário e exercício de resistência (dados representados em (B) e (C)). (B) Grupos sedentário e (C) grupos do protocolo de exercício de resistência. n= 5 a 6 por grupo, *p<0,05.

Para ambos os protocolos, sedentário e exercício, observa-se uma redução de núcleos centrais nos grupos ADR, indicando perda da capacidade adaptativa e de regeneração destas fibras. Em contraste, o grupo ADR + Stattic apresenta manutenção de núcleos centrais, indicando um efeito favorável da inativação da via STAT3 sobre a lesão causada por ADR (Figura 30).

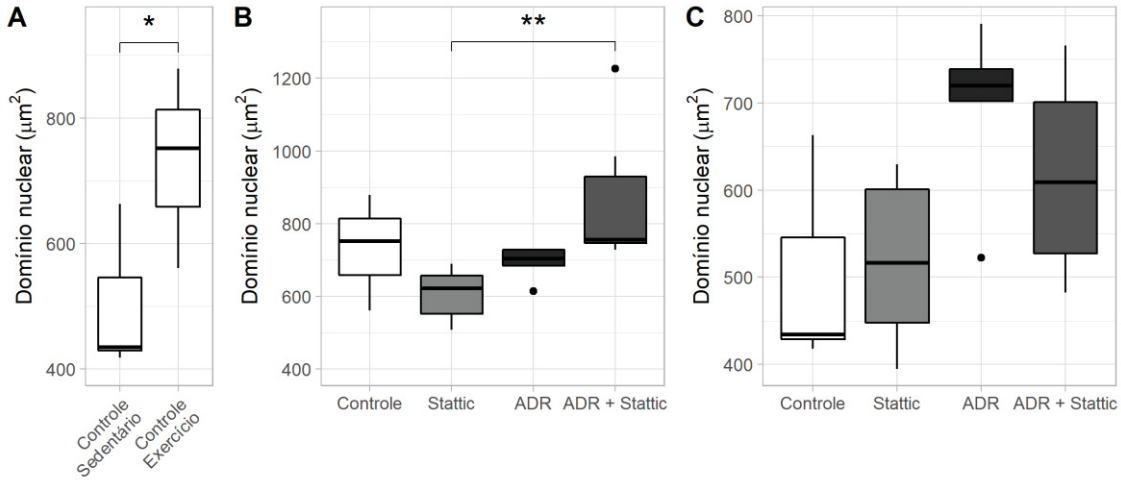


Figura 31 - Alterações no domínio nuclear dos grupos ADR e ADR + Stattic. (A) Comparação entre controles sedentário e exercício de resistência (dados representados em (B) e (C)). (B) Grupos sedentário e (C) grupos do protocolo de exercício de resistência. n= 5 a 6 por grupo, *p<0,05, **p<0,01.

Em relação a capacidade de atividade no núcleo das miofibras, foi observado um aumento do domínio nuclear em razão do protocolo de exercício, onde a

comparação entre grupos controle dos dois protocolos apresentou diferença (Figura 31).

Este aumento do domínio nuclear proporcionado pelo exercício pode refletir uma ação do exercício em causar hipertrofia das fibras, aumentando seu volume citosólico mesmo em razão da inclusão de novos núcleos, como observado pelo aumento de núcleo/fibra (Figura 29A).

Em resumo, as alterações encontradas sobre as análises de fibras musculares refletem uma capacidade da ADR causar atrofia das fibras, uma vez que foi detectado redução dos diâmetros e redução da área das fibras do tipo IIb nos animais sedentários do grupo ADR. Por outro lado, o exercício prévio em conjunto com a inibição da via STAT3 favorecem mecanismos de hipertrofia e regeneração de fibras musculares, uma vez que o exercício induziu aumento dos núcleos centrais, indicando presença de fibras em processo regenerativo, de modo que células satélites ativadas pelo exercício sofressem ação da inibição transitória de STAT3 e favorecessem o processo de proliferação celular, aumentando a população de células capazes de contribuir em processos de hipertrofia e regeneração do tecido muscular afetado pelo exercício e ADR, conforme observado pelo aumento dos diâmetros de fibras do grupo ADR + Stattic, e aumento das áreas das fibras do tipo I, IIa e IIb para o grupo Stattic.

4.2.3.5 Análise de componentes principais de parâmetros morfométricos musculares

Para avaliar o conjunto de alterações observadas nos parâmetros musculares analisados em relação aos protocolos de exercício de resistência e sedentário, e a ação das drogas sobre estes parâmetros, foi realizado a análise de componentes principais (PCA; *Principal componente analysis*).

A técnica de PCA permite a redução de dimensões de um conjunto de variáveis e permite a interpretação dos dados pela disposição bidimensional de pontos derivados dos dados originais, mantendo seu valor estatístico e de variabilidade, pela obtenção de componentes principais capazes de explicar a variância entre indivíduos e variáveis (JOLLIFFE; CADIMA, 2016). Dados complementares da análise de PCA realizada estão disponíveis no apêndice 2.

Pela análise de componentes principais é possível observar o agrupamento de dados que compartilham correlação com as variáveis de origem em diferentes

pontos do gráfico. Primeiramente, é possível observar a disposição de indivíduos do protocolo sedentário (círculos) à parte esquerda do gráfico, enquanto indivíduos do protocolo de exercício (triângulo) se concentram ao lado direito do gráfico. Esta diferenciação entre protocolos corresponde a capacidade de alterações relacionadas as capacidades de alteração da distribuição nuclear e da capilarização (componente principal 1; 46,6% de variação amostral representada; ver apêndice 2) diferencial encontradas para o protocolo de exercício físico em relação aos animais sedentários (Figura 32).

Enquanto isto é verdade para maioria dos grupos, é possível observar que ambos os grupos ADR (vermelhos), tanto de animais sedentários quanto animais de EFR, se concentram próximos um ao outro. Desta maneira, indica-se a ação da ADR como capaz de reverter os efeitos observados pela prática de exercício físico prévio na musculatura esquelética, conforme indicam as análises realizadas sobre o músculo gastrocnêmio.

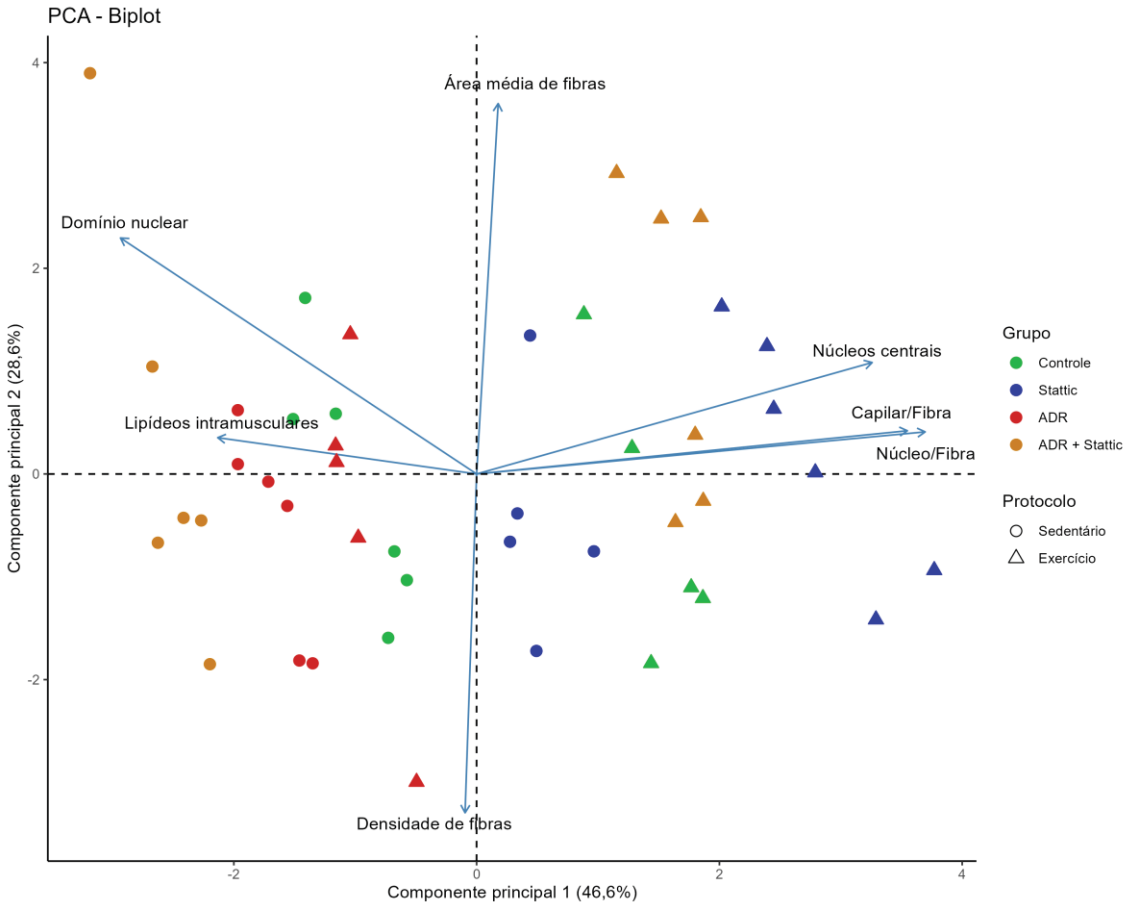


Figura 32 - Análise de componentes principais dos parâmetros musculares. Diferentes grupos estão representados por diferentes cores. Eixo x: componente principal 1, eixo y: componente principal 2. n=6 por grupo.

Interessantemente, ao observar o grupo ADR + Stattic (laranja) é possível diferenciar a região de agrupamento em relação ao protocolo utilizado. Animais do grupo ADR + Stattic sedentários (círculos laranjas) se encontram ao ponto mais a esquerda do gráfico, próximos aos grupos ADR, indicando a presença de variações semelhantes entre estes grupos em relação aos parâmetros incluídos. Diferentemente disto, animais do grupo ADR + Stattic do protocolo de EFR (triângulos laranjas) se encontram dispostos na região a direita do gráfico, distantes dos grupos ADR, indicando que o conjunto exercício e inativação da via STAT3 foi capaz de sobrepor os efeitos observados pela administração de ADR.

Por outro lado, o segundo componente principal obtido diz respeito a variação encontrada para o tamanho das fibras, correspondendo a 28,6% da variância observada, e não apresentou grande distinção entre os indivíduos.

Em conclusão, podemos afirmar que a prática de exercício de resistência conforme estabelecido pelo modelo experimental foi capaz de gerar alterações em componentes histomorfométricos do tecido muscular. Este efeito, porém, foi revertido pela administração de ADR. Contudo, a inibição da via STAT3 possibilitou a manutenção dos efeitos promovidos pelo exercício no tecido muscular mesmo após a administração de ADR.

Utilizando o modelo experimental de nefrectomia 5/6 em ratos, Souza *et al*. (2018) demonstraram que o exercício de resistência promoveu reversão do quadro de fibrose renal, junto da melhora dos níveis de creatina quinase sérica e de citocinas inflamatórias elevadas no quadro de lesão renal. Estas melhoras do quadro de lesão renal foram acompanhadas de aumento da força muscular dos animais treinados em resposta ao exercício físico.

De modo semelhante, ratos submetidos a exercício aeróbico prévio a indução de nefropatia por ADR apresentaram redução da albuminúria nos períodos de 7, 30 e 60 dias após a administração de ADR em relação a animais sedentários. Marcadores inflamatórios e de lesão tecidual analisados também foram atenuados pela prática de exercício físico (FALEIROS et al., 2017).

Da mesma forma, a via de sinalização STAT3 tem sido analisada na progressão da lesão renal na GESF e outros quadros de lesão em pacientes e modelos experimentais (DAI et al., 2013; EDWARDS; MIZUI; KYTTARIS, 2015; LI et al., 2007; PACE et al., 2019; SHARMA et al., 2015; TAO et al., 2018), além de estar envolvida em processos de lesão e função muscular (GUADAGNIN; MÁZALA; CHEN, 2018;

KROLOPP; THORNTON; ABBOTT, 2016; TIERNEY et al., 2014). Além de constituir um modelo de lesão renal amplamente utilizado, a ADR é capaz de ocasionar danos ao tecido muscular (D'LUGOS et al., 2019; HIENSCH et al., 2020; POWERS et al., 2019).

A relação entre o tecido muscular e a função renal é um importante fator para quadros de lesão renal e de lesão muscular. Assim como a redução da massa muscular é um fator importante para morbidade e mortalidade na DRC, o quadro de Doença Arterial Periférica (DAP) é agravado na presença de DRC. Entre outros fatores, como aumento da predisposição para formação de trombos, o declínio da função renal ocasiona a retenção de solutos e metabólitos urêmicos prejudiciais a função de células musculares, ocasionando aumento da mortalidade e da taxa de amputação de membros de pacientes com DAP (BERRU et al., 2019).

Entendendo que pacientes acometidos com lesão renal apresentam redução da massa muscular, que a via de sinalização STAT3 está envolvida nos processos de lesão renal e muscular, e que o exercício físico de resistência promove a melhora do quadro renal e oferece meios de manutenção do tecido muscular, os resultados obtidos neste trabalho indicam que o exercício físico de resistência prévio e a inibição da via de sinalização STAT3 promovem melhora do quadro de lesão renal e estão relacionados com alterações musculares na glomeruloesclerose experimental induzida por ADR.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A via de sinalização STAT3 pode estar relacionada com piora do quadro de lesão renal no modelo experimental e nos casos de GESF, sendo que alternativas para modulação desse perfil de ativação podem ser benéficos. Explorar o exercício físico como um protetor para doenças de caráter inflamatório pode trazer benefícios a saúde dos pacientes e oferecer alternativas ao manejo clínico das doenças.

Conforme observado, o modelo experimental de GESF utilizado ocasiona a redução do peso corporal, alterações do tecido muscular e proteinúria. Apesar de não ter sido encontrado efeito sobre a queda do peso corporal causado pela adriamicina, o exercício físico prévio a lesão por adriamicina foi capaz de causar alteração da manifestação da lesão renal pelo adiamento do pico de albuminúria encontrado no modelo experimental, além de promover redução da deposição lipídica no músculo gastrocnêmio causada pela adriamicina. Outras alterações musculares foram observadas para a ação da adriamicina sobre o músculo pré-condicionado pelo exercício físico, como reduções em núcleos centrais, núcleos por fibra e número de capilares.

A administração de Stattic, inibidor da via de STAT3, em animais que receberam adriamicina resultou na ausência de proteinúria detectada no período de 7 e 14 dias, enquanto a administração de Stattic em animais que realizaram o protocolo de exercício físico e receberam adriamicina resultou em menores níveis de albuminúria/creatininúria, indicando um efeito conjunto da inibição de STAT3 e prática de exercício físico. O conjunto inibição da via STAT3 e exercício físico prévio foi capaz de promover proteção ao tecido muscular, observado pela melhora da resposta a adriamicina nos parâmetros nucleares e de capilarização das fibras musculares.

Desta forma, foi observado que a prática de exercício anterior a indução do modelo de glomeruloesclerose experimental em conjunto com a inibição da via de sinalização STAT3 durante a progressão da lesão atenuou a lesão renal, reduzindo os níveis de albumina/creatinina urinária e promoveu proteção da lesão muscular observada no modelo experimental.

REFERÊNCIAS

BERGGREN, J. R. et al. Skeletal muscle lipid oxidation and obesity: influence of weight loss and exercise. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 4, p. E726–E732, abr. 2008.

BERRU, F. N. et al. Chronic kidney disease exacerbates ischemic limb myopathy in mice via altered mitochondrial energetics. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15547, dez. 2019.

BIENAIME, F. et al. Stat3 Controls Tubulointerstitial Communication during CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 12, p. 3690–3705, 1 dez. 2016.

BONETTO, A. et al. JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 3, p. E410–E421, 1 ago. 2012.

CAMPBELL, J. P.; TURNER, J. E. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 16 abr. 2018.

CASSILHAS, R. C. et al. Animal model for progressive resistance exercise: a detailed description of model and its implications for basic research in exercise. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 19, n. 1, p. 178–184, mar. 2013.

CHEEMA, B. S. et al. Effect of Progressive Resistance Training on Measures of Skeletal Muscle Hypertrophy, Muscular Strength and Health-Related Quality of Life in Patients with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1125–1138, ago. 2014.

CHEN, W. et al. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation. **Theranostics**, v. 9, n. 14, p. 3980–3991, 2019.

CHURG, J.; HABIB, R.; WHITE, RICHARDH. R. PATHOLOGY OF THE NEPHROTIC SYNDROME IN CHILDREN. **The Lancet**, v. 295, n. 7660, p. 1299–1302, jun. 1970.

CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S. Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanisms and Clinical Implications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 8, p. 906–914, 1 mar. 2010.

D'AGATI, V. D. et al. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 43, n. 2, p. 368–382, fev. 2004.

DAI, Y. et al. Podocyte-specific deletion of signal transducer and activator of transcription 3 attenuates nephrotoxic serum–induced glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 84, n. 5, p. 950–961, nov. 2013.

D'LUGOS, A. C. et al. Chronic doxorubicin administration impacts satellite cell and capillary abundance in a muscle-specific manner. **Physiological Reports**, v. 7, n. 7, p. e14052, 8 abr. 2019.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. **Muscle biopsy: a mordern approach**. 1. ed. London: Saunders College Publishing, 1973.

EDWARDS, L. J.; MIZUI, M.; KYTTARIS, V. Signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibition delays the onset of lupus nephritis in MRL/lpr mice. **Clinical Immunology**, v. 158, n. 2, p. 221–230, jun. 2015.

FALEIROS, C. M. et al. Effects of previous physical training on adriamycin nephropathy and its relationship with endothelial lesions and angiogenesis in the renal cortex. **Life Sciences**, v. 169, p. 43–51, jan. 2017.

FOGO, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 76–87, fev. 2015.

GARBERS, C.; APARICIO-SIEGMUND, S.; ROSE-JOHN, S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. **Current Opinion in Immunology**, v. 34, p. 75–82, jun. 2015.

GUADAGNIN, E.; MÁZALA, D.; CHEN, Y.-W. STAT3 in Skeletal Muscle Function and Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2265, 2 ago. 2018.

GUADALUPE-GRAU, A. et al. Influence of age on leptin induced skeletal muscle signalling. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 1, p. 214–228, maio 2014.

GUO, S. et al. Impacts of exercise interventions on different diseases and organ functions in mice. **Journal of Sport and Health Science**, v. 9, n. 1, p. 53–73, 2020.

HIENSCH, A. E. et al. Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 229, n. 2, p. e13400, jun. 2020.

HORNBERGER JR., T. A.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n. 1, p. 16–31, fev. 2004.

HUANG, S.-C. et al. Doxorubicin inhibits muscle inflammation after eccentric exercise. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 2, p. 277–284, abr. 2017.

JEANSSON, M. et al. Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 1, p. 114–122, 1 jan. 2009.

JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J. The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 21, n. 5, p. 408–416, set. 2014.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 13 abr. 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. **Técnicas Básicas de Histologia e Citologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Santos, 1983.

KDIGO. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. **Kidney International**, v. 100, n. 4, p. S1–S276, out. 2021.

KEDDAR, M. et al. Non-invasive Quantification of Fat Deposits in Skeletal Muscle Predicts Cardiovascular Outcome in Kidney Failure. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 130, 2020.

KOBAYASHI, M. et al. The Combined Use of Losartan and Muscle-Derived Stem Cells Significantly Improves the Functional Recovery of Muscle in a Young Mouse Model of Contusion Injuries. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 12, p. 3252–3261, dez. 2016.

KOH, J.-H. et al. AMPK and PPARβ positive feedback loop regulates endurance exercise training-mediated GLUT4 expression in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 316, n. 5, p. E931–E939, 1 maio 2019.

KOUFAKI, P. et al. The BASES expert statement on exercise therapy for people with chronic kidney disease. **Journal of Sports Sciences**, v. 33, n. 18, p. 1902–1907, 8 nov. 2015.

KOVES, T. R. et al. PPARγ coactivator-1α contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming in mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 2, p. 522–534, fev. 2013.

KROLOPP, J. E.; THORNTON, S. M.; ABBOTT, M. J. IL-15 Activates the Jak3/STAT3 Signaling Pathway to Mediate Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 20 dez. 2016.

KWON, I. Protective effects of endurance exercise on skeletal muscle remodeling against doxorubicin-induced myotoxicity in mice. **Physical Activity and Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 11–21, 30 jun. 2020.

LEACH, E. H. Fat staining with sudan black B. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 635–637, nov. 1938.

LEE, S.-H. et al. Exercise induces muscle fiber type switching via transient receptor potential melastatin 2-dependent Ca^{2+} signaling. **Journal of Applied Physiology**, v. 124, n. 2, p. 364–373, 1 fev. 2018.

LEE, V. W.; HARRIS, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis: Adriamycin nephropathy. **Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 30–38, jan. 2011.

LI, R. et al. Inhibition of JAK/STAT Signaling Ameliorates Mice Experimental Nephrotic Syndrome. **American Journal of Nephrology**, v. 27, n. 6, p. 580–589, 2007.

LIM, B. J. et al. Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, n. 6, p. 405–410, 15 nov. 2016.

MARQUES-ALEIXO, I. et al. The beneficial role of exercise in mitigating doxorubicin-induced Mitochondrionopathy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1869, n. 2, p. 189–199, abr. 2018.

NETO, W. K. Vertical Climbing for Rodent Resistance Training: a Discussion about Training Parameters. **International Journal of Sports Science**, p. 14, 2016.

NEVES, P. D. M. DE M. et al. Brazilian dialysis survey 2019. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 43, n. 2, p. 217–227, jun. 2021.

OKUDA, S. et al. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. **Kidney International**, v. 29, n. 2, p. 502–510, fev. 1986.

OLIVEIRA, E. A. et al. Cachexia/Protein energy wasting syndrome in CKD: Causation and treatment. **Seminars in Dialysis**, v. 32, n. 6, p. 493–499, nov. 2019.

PACE, J. et al. Targeting STAT3 signaling in kidney disease. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 316, n. 6, p. F1151–F1161, 1 jun. 2019.

PEDRANZINI, L.; LEITCH, A.; BROMBERG, J. Stat3 is required for the development of skin cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 5, p. 619–622, 1 set. 2004.

PEDROSO, J. A. B. et al. SOCS3 expression in SF1 cells regulates adrenal differentiation and exercise performance. **Journal of Endocrinology**, v. 235, n. 3, p. 207–222, dez. 2017.

PÉREZ-LÓPEZ, A. et al. Antioxidants Facilitate High–intensity Exercise IL–15 Expression in Skeletal Muscle. **International Journal of Sports Medicine**, v. 40, n. 01, p. 16–22, jan. 2019.

POWERS, S. K. et al. Endurance exercise protects skeletal muscle against both doxorubicin-induced and inactivity-induced muscle wasting. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 471, n. 3, p. 441–453, mar. 2019.

PUDUR, S. et al. Serum glomerular albumin permeability activity: association with rapid progression to end-stage renal disease in focal segmental glomerulosclerosis. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, dez. 2016.

ROMAN, W.; GOMES, E. R. Nuclear positioning in skeletal muscle. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 82, p. 51–56, out. 2018.

ROSENBERG, A. Z.; KOPP, J. B. Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 3, p. 502–517, 7 mar. 2017.

SANCHES, I. et al. Standardization of Resistance Exercise Training: Effects in Diabetic Ovariectomized Rats. **International Journal of Sports Medicine**, v. 35, n. 04, p. 323–329, 10 set. 2013.

SAVIN, V. J. et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 14, p. 878–883, 4 abr. 1996.

SCARFE, L. et al. Measures of kidney function by minimally invasive techniques correlate with histological glomerular damage in SCID mice with adriamycin-induced nephropathy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 13601, out. 2015.

SCHEFFER, D. L. et al. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 37, n. 6, p. 1239–1246, dez. 2012.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, maio 2011.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 17, p. 4294–4314, 2013.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, out. 2011.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SHARMA, M. et al. Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier. **Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 166, n. 4, p. 384–398, out. 2015.

SHEN, F. et al. Autonomous climbing: An effective exercise mode with beneficial outcomes of aerobic exercise and resistance training. **Life Sciences**, v. 265, p. 118786, jan. 2021.

SNIJDERS, T. et al. The concept of skeletal muscle memory: Evidence from animal and human studies. **Acta Physiologica**, v. 229, n. 3, p. e13465, 2020.

SOUZA, M. K. et al. Resistance training attenuates inflammation and the progression of renal fibrosis in chronic renal disease. **Life Sciences**, v. 206, p. 93–97, ago. 2018.

STOYELL-CONTI, F. F. et al. Aerobic Training Is Better Than Resistance Training on Cardiac Function and Autonomic Modulation in Female ob/ob Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 2019.

SU, H.; LEI, C.-T.; ZHANG, C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 21 abr. 2017.

TAO, J. et al. JAK-STAT signaling is activated in the kidney and peripheral blood cells of patients with focal segmental glomerulosclerosis. **Kidney International**, v. 94, n. 4, p. 795–808, out. 2018.

TIERNEY, M. T. et al. STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. **Nature Medicine**, v. 20, n. 10, p. 1182–1186, out. 2014.

TSUCHIMOTO, A. et al. Utility of Columbia classification in focal segmental glomerulosclerosis: renal prognosis and treatment response among the pathological variants. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 35, n. 7, p. 1219–1227, 1 jul. 2020.

VIANA, J. L. et al. Evidence for Anti-Inflammatory Effects of Exercise in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 9, p. 2121–2130, 1 set. 2014.

WANG, Y. M. et al. Adriamycin Nephropathy in BALB/c Mice. **Current Protocols in Immunology**, v. 108, n. 1, fev. 2015.

WATSON, E. L. et al. Progressive Resistance Exercise Training in CKD: A Feasibility Study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 66, n. 2, p. 249–257, ago. 2015.

WATSON, E. L. et al. The Effect of Resistance Exercise on Inflammatory and Myogenic Markers in Patients with Chronic Kidney Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 28 jul. 2017.

WEN, Y.; SHAH, S.; CAMPBELL, K. N. Molecular Mechanisms of Proteinuria in Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 16 abr. 2018.

WOLSK, E. et al. The role of leptin in human lipid and glucose metabolism: the effects of acute recombinant human leptin infusion in young healthy males. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 6, p. 1533–1544, 1 dez. 2011.

YAMAGUCHI, K. et al. Blockade of interleukin 6 signalling ameliorates systemic insulin resistance through upregulation of glucose uptake in skeletal muscle and improves hepatic steatosis in high-fat diet fed mice. **Liver International**, v. 35, n. 2, p. 550–561, fev. 2015.

YU, A. P. et al. Acylated and unacylated ghrelin inhibit doxorubicin-induced apoptosis in skeletal muscle. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 1, p. 201–213, maio 2014.

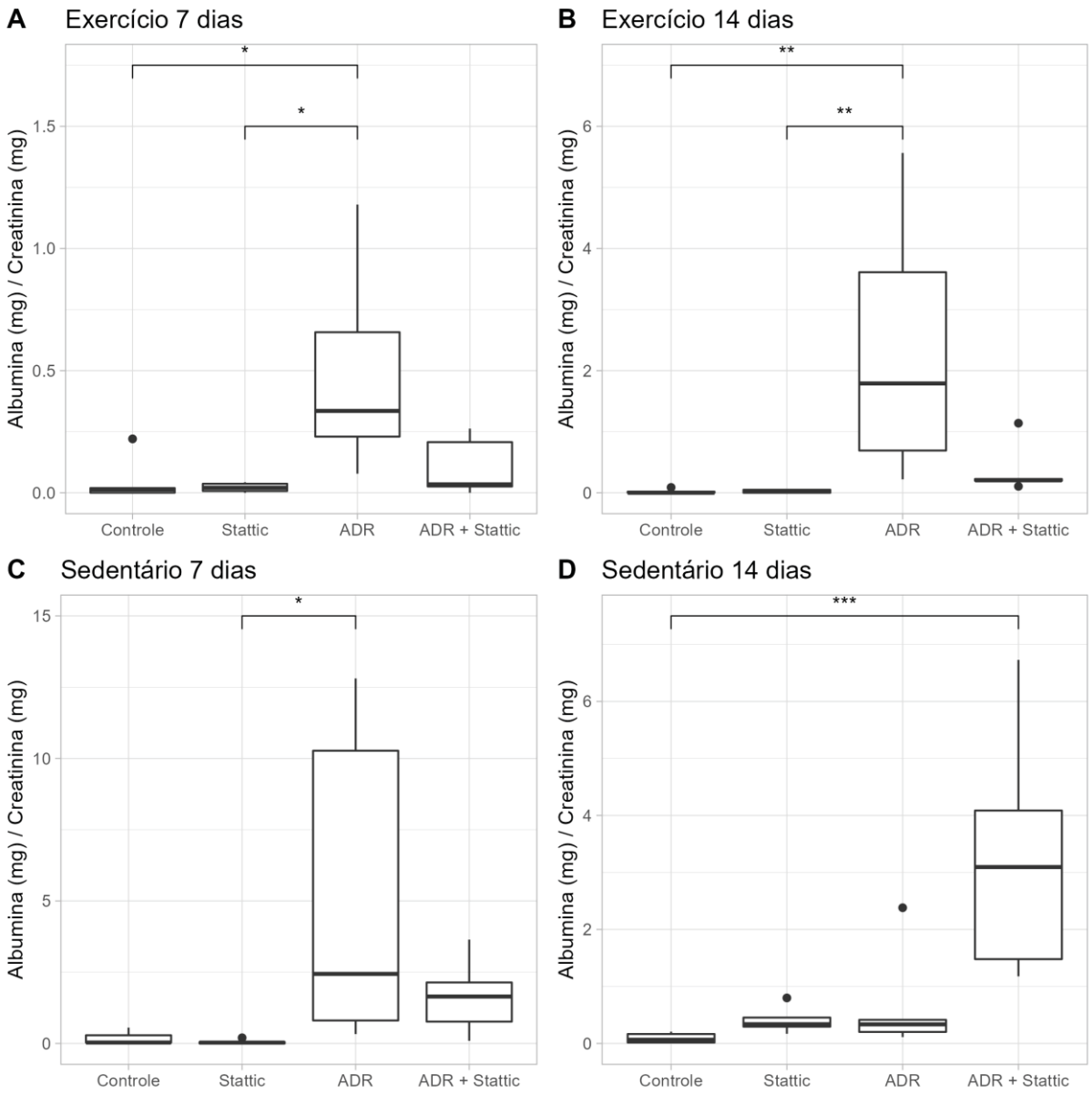
YU, A. P. et al. [D-Lys3]-GHRP-6 exhibits pro-autophagic effects on skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 401, p. 155–164, fev. 2015.

ZHANG, H. et al. Podocyte-specific JAK2 overexpression worsens diabetic kidney disease in mice. **Kidney International**, v. 92, n. 4, p. 909–921, out. 2017.

ZHANG, J. et al. A two-stage bilateral ischemia-reperfusion injury-induced AKI to CKD transition model in mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 319, n. 2, p. F304–F311, 1 ago. 2020.

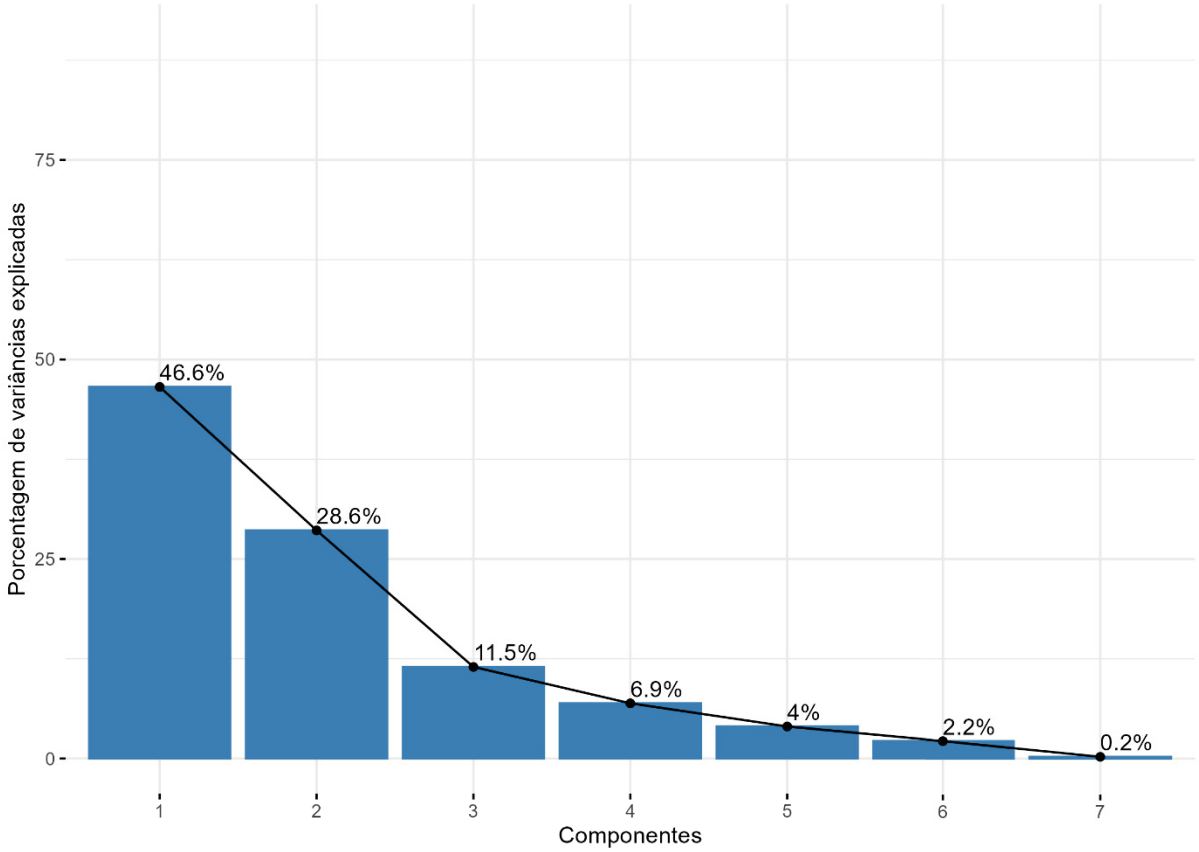
ZHENG, C. et al. Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 11, p. 848, nov. 2019.

APÊNDICE 1 – RAZÃO ALBUMINA/CREATININA URINÁRIA DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMETAIS

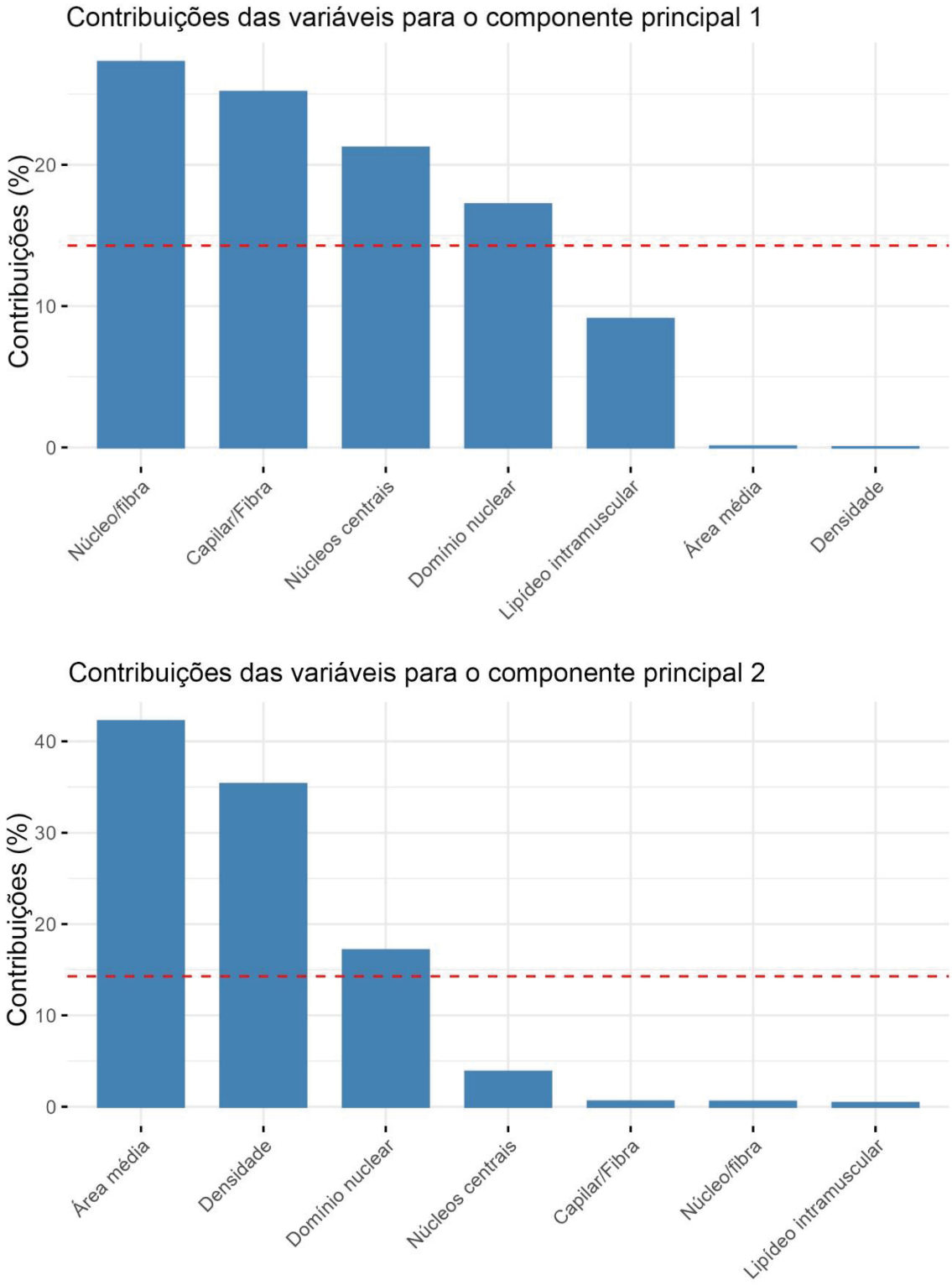


Comparação de valores obtidos para razão albumina/creatinina urinária entre os diferentes grupos experimentais. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

APÊNDICE 2 – CONTRIBUIÇÕES DE COMPONENTES PRINCIPAIS



(A) Porcentagem da variação explicada por cada componente principal gerado pela análise de PCA. Componentes 1 e 2 representam uma variância cumulativa de 75,15%.



(B) Contribuições das variáveis para cada componente principal. A linha tracejada representa o valor esperado caso cada variável contribuísse uniformemente para o componente principal.