



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS

O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NA MODULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT-3 E SEUS EFEITOS NAS LESÕES RENAI, MUSCULARES E ÓSSEAS RELACIONADAS AO MODELO DE NEFROPATIA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

CURITIBA

2024

THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS

**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NA MODULAÇÃO DA VIA DE
SINALIZAÇÃO STAT-3 E SEUS EFEITOS NAS LESÕES RENAI, MUSCULARES
E ÓSSEAS RELACIONADAS AO MODELO DE NEFROPATIA INDUZIDA POR
DOXORRUBICINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de doutora em fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira

Curitiba

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Santos, Thabata Caroline de Oliveira

O papel do exercício resistido na modulação da via de sinalização STAT-3 e seus efeitos nas lesões renais, musculares e ósseas relacionadas ao modelo de nefropatia induzida por doxorubicina / Thabata Caroline de Oliveira Santos. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira.

1. Insuficiência renal crônica. 2. Distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica. 3. Sarcopenia. 4. Treinamento resistido. 5. Aumento do músculo esquelético. 6. Fator de transcrição STAT3. 7. Doxorubicina. I. Pereira, Rafael Luiz. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM FISILOGIA

No dia seis de setembro de dois mil e vinte e quatro às 08:30 horas, na sala 103, Auditório do Departamento de Fisiologia (Defesa Híbrida), foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS**, intitulada: "**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NA MODULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT-3 E SEUS EFEITOS NAS LESÕES, RENAS MUSCULARES E ÓSSEAS RELACIONADAS AO MODELO DE NEFROPATIA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA.**", sob orientação do Prof. Dr. RAFAEL LUIZ PEREIRA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: RAFAEL LUIZ PEREIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), RAPHAEL JOSÉ FERREIRA FELIZARDO (UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA), DANILO CANDIDO DE ALMEIDA (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO), JUAN SEBASTIAN HENAO AGUDELO (UNIDAD CENTRAL DEL VALLE DEL CAUCA). 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 doutora 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, 06 de Setembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 16:56:02.0
RAFAEL LUIZ PEREIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 15:52:02.0
RAPHAEL JOSÉ FERREIRA FELIZARDO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA)

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 18:08:44.0
DANILO CANDIDO DE ALMEIDA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica
11/09/2024 13:45:51.0
JUAN SEBASTIAN HENAO AGUDELO
Avaliador Externo (UNIDAD CENTRAL DEL VALLE DEL CAUCA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS** intitulada: "**O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NA MODULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT-3 E SEUS EFEITOS NAS LESÕES, RENAI MUSCULARES E ÓSSEAS RELACIONADAS AO MODELO DE NEFROPATIA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA.**", sob orientação do Prof. Dr. RAFAEL LUIZ PEREIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 06 de Setembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 16:56:02.0
RAFAEL LUIZ PEREIRA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 15:52:02.0
RAPHAEL JOSÉ FERREIRA FELIZARDO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA)

Assinatura Eletrônica
06/09/2024 18:08:44.0
DANILO CANDIDO DE ALMEIDA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica
11/09/2024 13:45:51.0
JUAN SEBASTIAN HENAO AGUDELO
Avaliador Externo (UNIDAD CENTRAL DEL VALLE DEL CAUCA)

*Dedico esse trabalho a minha mãe, Mari e
ao meu companheiro, Bruno, os quais
sempre acreditaram nos meus sonhos e me
apoiaram em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese de doutorado representa não apenas o término de uma etapa acadêmica, mas também a realização de um sonho que só foi possível graças ao apoio de pessoas muito especiais. Não posso deixar de expressar minha profunda gratidão a todos que fizeram parte dessa jornada desafiadora e transformadora.

À minha mãe **Mari Oleni de Oliveira**, por ter me proporcionado as bases necessárias para que eu chegasse até aqui. Você sempre acreditou em mim e me incentivou a buscar meus sonhos, fazendo o duplo papel de mãe e pai. Suas palavras de encorajamento e amor foram fundamentais para me manter firme e perseverante.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, compartilhando momentos de alegria e superação. Em especial ao meu grande amigo **Gabriel Pereira**, pela parceria e ajuda nos experimentos e análises estatísticas, além das conversas e risos que deixaram esse tempo que levei para concluir o doutorado mais leve. Também às minhas queridas amigas e orientadas de iniciação científica **Pietra Seibt**, **Luana Fortuna** e **Nicole Carvalho** por todo auxílio que me deram nos experimentos. Obrigada pela responsabilidade e comprometimento em executar as atividades. Sem vocês eu não teria conseguido terminar esse trabalho com a mesma efetividade.

Aos meus colegas de departamento, **Rafaella Angeli**, **Franco Souza** e **Maria Carolina Michalak**. A companhia nos momentos de lazer e suas palavras de apoio durante os períodos mais difíceis foram essenciais para que eu mantivesse o equilíbrio e a motivação.

Ao meu companheiro, **Bruno Decontti**, por seu amor incondicional e paciência. Você esteve presente em todas as etapas dessa jornada, oferecendo apoio emocional e suporte nos momentos mais desafiadores. Sua compreensão e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse me dedicar a esta pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Rafael Luiz Pereira**, por sua orientação e suporte durante todo o processo. Sua expertise, conselhos e críticas construtivas foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela confiança depositada em mim e por ter me guiado com tanto comprometimento e dedicação.

Aos professores e colegas do laboratório de Fisiologia Renal Prof^ª. Dra. **Ana Lucia Taratuch**, Prof. Dr. **Ricardo Perez** e Ma. **Sofia Arioni** pelo apoio e colaboração

através de conselhos que me permitiram desenvolver meus experimentos de maneira mais acertada.

À minha colega **Suelen Baal**, do departamento de genética, por sua valiosa ajuda na padronização das análises de PCR. Sua colaboração foi crucial para o andamento dos meus experimentos e para a obtenção de resultados consistentes. Agradeço pela disposição e competência com que contribuiu para este trabalho.

À Prof^a. Dra. **Débora Tavares** da Universidade Federal da Fronteira Sul, pela colaboração na realização das análises histológicas do tecido renal e também ao Prof. Dr. **Danilo Candido de Almeida** da Universidade Federal de São Paulo pela colobaração no fornecimento de insumos e reagentes. E ao Me. **André Lass** pelo auxílio na revisão.

Agradeço ao **Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da Universidade Federal do Paraná**, por ceder o uso dos microscópios para a análises das lâminas e à **Fundação Pro Renal** pela imprescindível ajuda nas análises ósseas, em especial a Ma. **Rafaela Ceron** e Dra. **Carolina Moreira**. Agradeço também a **CAPES** pelo financiamento de minha bolsa de doutorado.

Agradeço aos técnicos do departamento de fisiologia da Universidade Federal do Paraná por me auxiliarem nos momentos necessários para a realização dos experimentos.

Esta caminhada não foi fácil, enfrentei muitos desafios, dúvidas e noites mal dormidas. No entanto, cada obstáculo superado trouxe um aprendizado valioso e me fez crescer como pessoa e profissional. Sinto-me profundamente grata por ter chegado à defesa desta tese com a certeza de que todo o esforço valeu a pena.

A todos, meu sincero agradecimento por terem feito parte desta importante etapa da minha vida. Sem o apoio de cada um de vocês, nada disso teria sido possível.

“Não é no silêncio que os homens se fazem,
mas na palavra, no trabalho, na ação-
reflexão. Dizer a palavra não é privilégio de
alguns homens, mas direito de todos os
homens”.

(FREIRE, P. 1970, p.158)

RESUMO

Além das lesões renais, os pacientes com doença renal crônica (DRC) também são frequentemente acometidos com sarcopenia. Nesse sentido, a via de sinalização STAT-3 se destaca por atuar tanto na progressão da DRC quanto na perda muscular. Em contrapartida, o exercício físico resistido (EFR) age na hipertrofia muscular e melhora do prognóstico geral dos pacientes. Por isso, este trabalho teve como objetivo compreender o papel do EFR em uma possível modulação da via STAT-3 e os efeitos nas lesões associadas ao modelo de nefropatia induzida pelo cloridrato de doxorubicina, vendido comercialmente sob o nome de adriamicina (ADM). Para tanto, camundongos BALB/c foram divididos nos grupos sedentário e EFR, os quais foram subdivididos nos grupos controle, ADM, ADM+ST e ST. O grupo EFR realizou 12 semanas de treinos, enquanto que os grupos ST receberam o inibidor statin. Ao longo do experimento, os animais foram pesados e sua urina foi coletada e ao final foi realizada a coleta dos tecidos. Foram quantificados marcadores relacionados à lesão renal característica do modelo, tais como a proteinúria, perda de peso e fibrose túbulointersticial. Além disso, foram realizadas análises bioquímicas e o músculo gastrocnêmio foi pesado para, em conjunto ao teste de força, determinar a sarcopenia. Ademais, foram realizadas análises moleculares para determinar a expressão de genes ligados ao crescimento e atrofia muscular e de marcadores de lesão renal, bem como análises histomorfométricas do tecido muscular e ósseo. A proteinúria foi quantificada pela relação albuminúria/creatininúria, sendo observado que o grupo ADM sedentário teve aumento desta razão em todos os pontos analisados quando comparados aos grupos que não receberam a droga. Além disso, no sétimo dia após a indução da lesão o grupo sedentário teve proteinúria significativamente mais alta do que o EFR. Ademais, foi constatado que os animais sedentários tiveram maior perda de peso do que o EFR e que este apresentou aumento da capacidade de suporte de carga, mesmo na presença da nefropatia. Também foi verificado que os animais que receberam ADM e realizaram o EFR apresentaram músculos significativamente mais pesados do que o grupo ADM sedentário e que a administração da droga prejudicou a transição de fibras musculares em resposta ao EFR. Verificou-se que o grupo ADM sedentário teve fibrose tubulointersticial significativamente maior do que o controle, fato que não foi observado quando os animais realizaram o EFR. Por fim, as análises moleculares evidenciaram que a administração de ADM na ausência de exercício físico levou ao aumento da expressão de IL-6 renal, bem como o tratamento com ADM+ST em animais sedentários causou o aumento da expressão de TRIM63 e que ambas as situações são mitigadas pela realização do EFR. Assim, podemos concluir que o EFR possui papel relevante na manutenção da massa muscular, além de ser capaz de minimizar as lesões renais causadas pela administração da ADM. Também foi possível inferir que a sarcopenia do modelo se relaciona com a via de sinalização STAT-3 e que esta, por sua vez, pode ser modulada pelo EFR. Desta maneira, a via de sinalização STAT-3 se mostra como um alvo terapêutico em potencial no que se refere ao tratamento da DRC, bem como o EFR pode ser um excelente aliado na atenuação da progressão das lesões associadas à doença.

Palavras-chave: exercício físico; adriamicina; STAT-3

ABSTRACT

In addition to kidney injuries, patients with chronic kidney disease (CKD) are also frequently affected by sarcopenia. In this sense, the STAT-3 signaling pathway stands out for acting both in the progression of CKD and in muscle loss. In contrast, resistance exercise (RE) acts on muscle hypertrophy and improves the general prognosis of patients. Therefore, this study aimed to understand the role of EFR in a possible modulation of the STAT-3 pathway and the effects on lesions associated with the model of nephropathy induced by doxorubicin hydrochloride, commercially sold under the name Adriamycin (ADM). For this purpose, BALB/c mice were divided into sedentary and EFR groups, which were subdivided into control, ADM, ADM+ST and ST groups. The EFR group performed 12 weeks of training, while the ST groups received the static inhibitor. Throughout the experiment, the animals were weighed and their urine was collected, and at the end, tissue collection was performed. Markers related to the renal injury characteristic of the model were quantified, such as proteinuria, weight loss and tubulointerstitial fibrosis. In addition, biochemical analyses were performed and the gastrocnemius muscle was weighed to determine sarcopenia in conjunction with the strength test. Furthermore, molecular analyses were performed to determine the expression of genes linked to muscle growth and atrophy and markers of kidney injury, as well as histomorphometric analyses of muscle and bone tissue. Proteinuria was quantified by the albuminuria/creatinine ratio, and it was observed that the sedentary ADM group had an increase in this ratio at all points analyzed when compared to the groups that did not receive the drug. Furthermore, on the seventh day after injury induction, the sedentary group had significantly higher proteinuria than the EFR. Furthermore, it was found that the sedentary animals had greater weight loss than the EFR and that the latter showed increased load-bearing capacity, even in the presence of nephropathy. It was also found that animals that received ADM and performed EFR had significantly heavier muscles than the sedentary ADM group and that drug administration impaired the transition of muscle fibers in response to EFR. It was found that the sedentary ADM group had significantly greater tubulointerstitial fibrosis than the control, a fact that was not observed when the animals performed EFR. Finally, molecular analyses showed that the administration of ADM in the absence of physical exercise led to an increase in the expression of renal IL-6, as well as the treatment with ADM+ST in sedentary animals caused an increase in the expression of TRIM63 and that both situations are mitigated by performing EFR. Thus, we can conclude that EFR plays a relevant role in maintaining muscle mass, in addition to being able to minimize kidney damage caused by ADM administration. It was also possible to infer that the sarcopenia in the model is related to the STAT-3 signaling pathway and that this, in turn, can be modulated by EFR. Thus, the STAT-3 signaling pathway appears to be a potential therapeutic target for the treatment of CKD, and EFR may be an excellent ally in attenuating the progression of lesions associated with the disease.

Keywords: physical exercise; adriamycin; STAT-3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais eventos na fibrogênese e inflamação intersticial renal... ..	23
Figura 2: Ativação de vias inflamatórias e fibrogênicas nas células epiteliais tubulares proximais em decorrência da proteinúria.. ..	25
Figura 3: Vias de sinalização envolvidas no crescimento e atrofia muscular	28
Figura 4: Estrutura do sarcômeros	31
Figura 5: Complexo receptor de IL-6.....	33
Figura 6: Modelo de sinalização da via STAT-3.....	34
Figura 7: Secreção de IL-6 como miocina em resposta ao exercício físico.....	36
Figura 8: Fisiopatologia do distúrbio mineral ósseo relacionado a doença renal crônica	40
Figura 9: Desenho experimental.	45
Figura 10: Contagem de sarcômeros em série	51
Figura 11: Corte realizado com lamina de bisturi	52
Figura 12: Fêmur de camundongo em bloco de metacrilato.	54
Figura 13: O EFR protege contra a proteinúria causada pela injeção de ADM.	57
Figura 14: Variação do peso corporal dos animais ao longo dos protocolos.	58
Figura 15: Área abaixo da curva.	59
Figura 16: A inibição da via STAT-3 na ausência de atividade física resulta em aumento da perda de peso acarretada pela ADM.....	60
Figura 17: Níveis de creatinina sérica. Não houve aumento significativo dos níveis de creatinina sérica nos grupos de animais estudados.....	61
Figura 18: Níveis de ureia sérica. Não houve aumento significativos nos níveis de ureia sérica nos grupos de animais estudados.	62
Figura 19: Níveis de fosfato.....	63
Figura 20: O EFR levou ao aumento do suporte de carga máxima, mesmo sob a ação da ADM.	64
Figura 21: Peso do músculo sóleo	66
Figura 22: A realização do protocolo de EFR e a inibição da via STAT-3 não causaram aumento do número de sarcômeros em série	67
Figura 23: O exercício físico de resistência protege contra os efeitos deletérios no tecido muscular causado pela ADM	69
Figura 24: Densidade de fibras musculares	70

Figura 25: Tipos de fibras musculares.	71
Figura 26: A distribuição da população de fibras categorizadas em fibras dos tipos I, IIa e IIb apresentou alterações devido à administração de drogas e pelo protocolo de exercício.....	72
Figura 27: Número de núcleos celulares e valor de lipídio intramuscular.	75
Figura 28: A realização do EFR leva a diminuição da fibrose renal causada pela ADM	78
Figura 29: Expressão de genes no tecido muscular.....	80
Figura 30: Expressão de genes no tecido renal	82
Figura 31: O tratamento com ADM leva à perda de massa óssea que não é revertida pelo EFR	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento (seis estágios) com base no nível de função renal, independente do diagnóstico e classificação da DRC.....	21
Tabela 2: Grupos experimentais	43
Tabela 3: Soluções utilizadas no emblocamento das amostras de tecido ósseo.....	53
Tabela 4: Sequência de primers utilizados na realização da qPCR	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRC: Doença Renal Crônica

TFG: Taxa de Filtração Glomerular

TRS: Terapia Renal Substitutiva

HD: Hemodiálise

IL-6: Interleucina 6

IL-1: Interleucina 1

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador β

DPC: Depressão proteico calórica

STAT: Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição.

MAFbx: Gene F-box da atrofia muscular

MURF: proteínas do dedo de zinco

ActRIIA: Receptor de Ativina A tipo IIA

SOCS: Supressores da Sinalização de Citocinas

DMO: Distúrbio Mineral Ósseo

ADM: Adriamicina

Stattic: Inibidor de molécula pequena da ativação e dimerização de STAT3

DMSO: dimetilsulfóxido

IV: Via intravenosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 Objetivos gerais	19
1.1.2 Objetivos específicos	19
1.2 JUSTIFICATIVAS	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 ESTÁGIOS DA DRC	21
2.1.1 O papel da inflamação na progressão da DRC	22
2.1.2 O papel da proteinúria na progressão da DRC	24
2.2 A PERDA DE MASSA MUSCULAR NA DRC	26
2.2.1 Mecanismos de perda de massa muscular	27
2.3 A ESTRUTURA DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO E MECANISMOS DE HIPERTROFIA MUSCULAR	30
2.4 A VIA DE SINALIZAÇÃO STAT-3	32
2.4.1 O papel do STAT-3 no tecido muscular	35
2.5 O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DRC	37
2.6 ALTERAÇÕES ÓSSEAS NA DRC	38
2.7 O MODELO DE NEFROPATIA INDUZIDO POR ADRIAMICINA	41
3. MATERIAIS E MÉTODO	42
3.1 ANIMAIS	42
3.2 DROGAS	42
3.2.1 Indução da nefropatia	42
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	43
3.3.1 Eutanásia e coleta dos tecidos	45
3.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO	46
3.4.1 Período de adaptação	47

3.5	MENSURAÇÃO DA PROTEINÚRIA.....	47
3.5.1	Mensuração da albuminúria.....	48
3.7	ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS DO TECIDO MUSCULAR.....	49
3.7.1	Secção e preparação de lâminas histológicas.....	49
3.7.2	Tipagem e contagem de fibras musculares pela técnica de NADH-TR.....	49
3.7.3	Deposição de lipídeos intramusculares pela técnica de Sudan black.....	50
3.8	CONTAGEM DE SARCÔMEROS EM SÉRIE.....	50
3.9	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL.....	51
3.10	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO TECIDO ÓSSEO.....	52
3.11	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL.....	54
3.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1	ALBUMINÚRIA.....	56
4.2	PESO CORPORAL.....	58
4.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	60
4.3.1	Creatinina sérica.....	60
4.3.2	Ureia sérica.....	62
4.4	TESTE DE CARGA MÁXIMA.....	63
4.5.1	Peso muscular.....	65
4.5.2	Avaliação do número de sarcômeros em série.....	66
4.6	ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO.....	67
4.6.1	Peso do músculo gastrocnêmio.....	68
4.6.2	Densidade de fibras musculares.....	69
4.6.3	Tipos de fibras musculares.....	70
4.6.4	Núcleos celulares e lipídio intramuscular.....	74
4.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL.....	76
4.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO MUSCULAR.....	79

4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO RENAL.....	81
4.10	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO TECIDO ÓSSEO	84
5.	CONCLUSÃO.....	88
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é considerada um grave problema de saúde pública e sua prevalência tem aumentado globalmente (FENG *et al.*, 2023), sendo considerada atualmente uma das principais causas de mortalidade mundial (KOVESDY, 2022). A prevalência global média da doença é de 13,4% (HILL *et al.*, 2016), atingindo assim, mais de 850 milhões de pessoas no mundo (JAGER *et al.*, 2019). No Brasil, estima-se que 3 a 6 milhões de pessoas tenham DRC, sendo que essa doença tem como agravante o fato de ser desconhecida por muitas pessoas acometidas (de SOUSA *et al.*, 2023).

A DRC é caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função dos rins, podendo ser causada por diferentes fatores (WEBSTER, *et al* 2017), sendo que os pacientes que se encontram em seus estágios finais apresentam quadros graves de insuficiência renal e necessitam de terapias renais substitutivas (TRS). Existem múltiplas modalidades de TRS que podem ser utilizadas no manejo do paciente gravemente enfermo com insuficiência renal (TANDUKAR; PALEVSKY, 2019), incluindo a hemodiálise (HD), a diálise peritoneal e o transplante renal. A HD é o primeiro tipo de TRS para a maioria dos pacientes, sendo globalmente a mais comumente utilizada (ROMAGNANI *et al.*, 2017). Estima-se que cerca de 150 mil brasileiros estavam em tratamento dialítico crônico em 2021, e destes, 94,2% em hemodiálise (NERBASS *et al.*, 2023).

Diversas complicações podem ocorrer em decorrência a DRC, tais como anemia, distúrbios minerais e ósseas, disfunções cognitivas e problemas relacionados à diminuição da massa muscular como a sarcopenia e a caquexia (CHENG *et al.*, 2022), levando a diminuição da qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes com DRC.

Como medida para mitigar a perda de massa muscular característica da DRC, a realização de exercício físico vem se destacando, por melhorar o quadro geral do paciente renal crônico, aumentando a absorção de proteínas pelo músculo, reduzindo a inflamação, melhorando o desempenho da diálise e a qualidade de vida (WATSON *et al.*, 2017). Sendo assim, é uma prática que pode ser implementada de forma segura junto ao tratamento terapêutico do paciente (ANDERSON *et al.*, 2009).

Além disso, outro importante mecanismo na progressão da DRC, o qual tem sido indicado por diversos estudos é a via de sinalização STAT-3, responsável por atuar diretamente na inflamação e fibrose renal, sendo que a sua inibição leva à melhora do quadro crônico da lesão renal em diferentes modelos de DRC (BIENAIMÉ *et al.*, 2016; PANG *et al.*, 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Avaliar a interação entre a ação do exercício físico resistido (EFR) na modulação da via de sinalização STAT-3 e sua relação com as lesões renais, musculares e ósseas associadas ao modelo animal de nefropatia induzido por adriamicina (ADM).

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do EFR e da via de sinalização STAT-3 nas lesões renais associadas ao modelo de nefropatia induzido por ADM.
- Avaliar o efeito do EFR e da via de sinalização STAT-3 nas lesões musculares e na sarcopenia associadas ao modelo de nefropatia induzido por ADM.
- Avaliar o efeito do EFR e da via de sinalização STAT-3 no número de sarcômeros em série do músculo sóleo em modelo de nefropatia induzido por ADM.

1.2 JUSTIFICATIVAS

A grande prevalência da DRC acarreta gastos de mais de 2 bilhões de reais anuais aos cofres públicos, uma vez que o Sistema Único de Saúde tem um papel importante no atendimento ao paciente renal crônico e, atualmente, é o responsável pelo financiamento de 90% dos tratamentos de TRS no país (ALCALDE; KIRSZTAJN, 2018). Além disso, os tratamentos disponíveis são escassos e possuem eficácia

limitada, apenas retardando a progressão da doença, demonstrando-se assim, a necessidade de tratamentos mais eficientes (LIU, 2011; TANG, 2021).

É de grande importância também o estabelecimento de protocolos que visem melhorar a vida do paciente renal crônico, o qual está sujeito a diversas comorbidades que impactam diretamente na sua qualidade de vida, levando ao aumento da morbidade e mortalidade nesta parcela da população.

A progressão da DRC se dá principalmente devido à persistência de estímulos inflamatórios, resultando em fibrose e disfunção do tecido renal (LIU, 2011). Muitos fatores contribuem para o estado inflamatório crônico, incluindo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e o estresse oxidativo (AKCHURIN; KASKEL, 2015). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destaca-se a interleucina-6 (IL-6), responsável pela ativação da via STAT-3, cujo papel nas lesões renais associadas à DRC tem sido largamente reportado na literatura.

Estudos recentes têm demonstrado que a via STAT-3 possui importante atuação na progressão da DRC, sendo que sua inativação leva à diminuição da lesão renal e fibrose tubulointersticial (BIENAIMÉ *et al.*, 2016). Sabe-se também que a ativação da via está envolvida com a progressão da caquexia, levando à perda de massa muscular (MILLER *et al.*, 2017; SALA; SACCO, 2016) em diferentes modelos de patologias, incluindo a DRC.

Desta maneira, observamos que a via de sinalização STAT-3 atua no sentido de promover as lesões renais e a perda de massa muscular, enquanto que o exercício físico, principalmente aquele que promove o ganho de força muscular, atua no sentido oposto, ou seja, promovendo o aumento da massa muscular e melhorando o quadro clínico do paciente renal crônico. No entanto, não há trabalhos que relacionem estes dois atores na progressão da DRC e em seus efeitos no tecido renal e muscular.

Sendo assim, este trabalho visa estudar uma possível relação entre o EFR e a via de sinalização STAT-3 e seus efeitos no tecido renal, muscular e ósseo de animais submetidos ao protocolo de nefropatia induzido por ADM, buscando a compreensão dos mecanismos envolvidas em tal relação, bem como as bases teóricas para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos na DRC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTÁGIOS DA DRC

A doença renal crônica (DRC) é definida como anormalidades da estrutura ou função renal, presentes por mais de três meses, com implicações para a saúde (KDIGO, 2022). A função renal é determinada pela taxa de filtração glomerular (TFG), sendo a DRC caracterizada por uma TFG inferior a 60 mL/min por 1,73 m², bem como marcadores de dano renal ou ambos, independentemente de causa (WEBSTER *et al.*, 2017).

Existem diversos fatores de risco relacionados à DRC, os quais podem ser divididos em fatores iniciadores (que aumentam o risco de desenvolver DRC) e os fatores perpetuantes, responsáveis por aumentar o risco de progressão da DRC para os estágios terminais (NOBLE; TAAL, 2019). As causas da DRC variam de acordo com o país, entretanto, o diabetes e a hipertensão são as principais patologias que levam à DRC em todos os países desenvolvidos e em muitos países em desenvolvimento (WEBSTER *et al.*, 2017). No Brasil, estas doenças representaram quase um terço de todos os casos de DRC, segundo o Censo Brasileiro de Diálise de 2021 (NERBASS *et al.*, 2023).

A DRC é classificada em seis estágios de acordo com a TFG (Tabela 1). Pacientes com início precoce da doença (estágio 1 e 2), apresentam uma diminuição normal a leve da TFG, variando de 60 a 90 mL/min por 1,73 m². Pacientes com estágio 3a e 3b apresentam diminuição leve a moderada (45 a 59 e 30 a 44 mL/min por 1,73 m², respectivamente). Níveis gravemente diminuídos de TFG caracterizam os estágios 4 e 5, com TFG de 15 a 29 e <15 mL/min por 1,73 m², respectivamente (EVANS *et al.*, 2022).

Tabela 1: Estadiamento (seis estágios) com base no nível de função renal, independente do diagnóstico e classificação da DRC. Fonte: KDIGO, 2017.

G1	Normal ou alta	≥ 90
G2	Levemente diminuída	60-90

Categorias de TFG (mL/min/1,73m²)	G3a	Leve/moderadamente diminuída	45-59
	G3b	Moderadamente diminuída	30-44
	G4	Muito diminuída	15-29
	G5	Falência renal	<15

2.1.1 O papel da inflamação na progressão da DRC

O papel da inflamação na progressão da DRC tem sido largamente demonstrado na literatura, havendo muitos fatores que contribuem para o estado inflamatório crônico desta patologia, incluindo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e acidose, infecções crônicas e recorrentes, metabolismo alterado do tecido adiposo e disbiose intestinal (AKCHURIN; KASKEL, 2015).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destacam-se a IL-6, IL-1 e TNF- α , as quais têm sido positivamente associadas à gravidade da DRC (RAPA *et al.*, 2019). O microambiente inflamatório, mediado pelas citocinas, induz a superexpressão de espécies reativas de oxigênio (ROS), lipídios bioativos e moléculas de adesão. As citocinas também são responsáveis pela deposição de matriz e fibrose, bem como pela proliferação de células residentes e da atividade pró-coagulante do endotélio no rim (Figura 1). As citocinas controlam a resposta inflamatória e medeiam alguns de seus efeitos a jusante através de proteínas positivas de fase aguda, como proteína C reativa, fibrinogênio e albumina (MIHAL *et al.*, 2018).

Trabalhos vêm demonstrando que os aumentos das citocinas circulantes em pacientes com DRC podem ser explicados pela combinação do aumento da produção sistêmica, diminuição da sua degradação renal e sua produção no tecido adiposo subcutâneo e visceral (ROUBICEK *et al.*, 2009).

O acúmulo de toxinas urêmicas é outro mecanismo importante na manutenção da inflamação presente na DRC. Stockler-Pinto *et al.*, (2016), por exemplo, demonstrou, a partir de um estudo *in vitro*, que o indoxil sulfato, uma importante toxina urêmica ligada à proteína, na concentração encontrada em pacientes com DRC, induz estresse oxidativo e promove a secreção de citocinas inflamatórias em células

adiposas cultivadas. Enquanto Shimizu *et al.* (2013) observou que esta mesma toxina urêmica também aumenta a expressão de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) em células tubulares proximais humanas através da produção de ROS e ativação de NF- κ B e p53.

No que se refere as citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 possui papel especial na progressão da DRC, sendo grande preditor de mortalidade em pacientes com doença renal terminal (ROUBICEK *et al.*, 2009). A IL-6 também contribui para o desenvolvimento da aterosclerose por ativar mecanismos metabólicos, endoteliais e pró-coagulantes, além de estar associada a depressão e a supressão da secreção do paratormônio (PTH) (RAPA *et al.*, 2019).

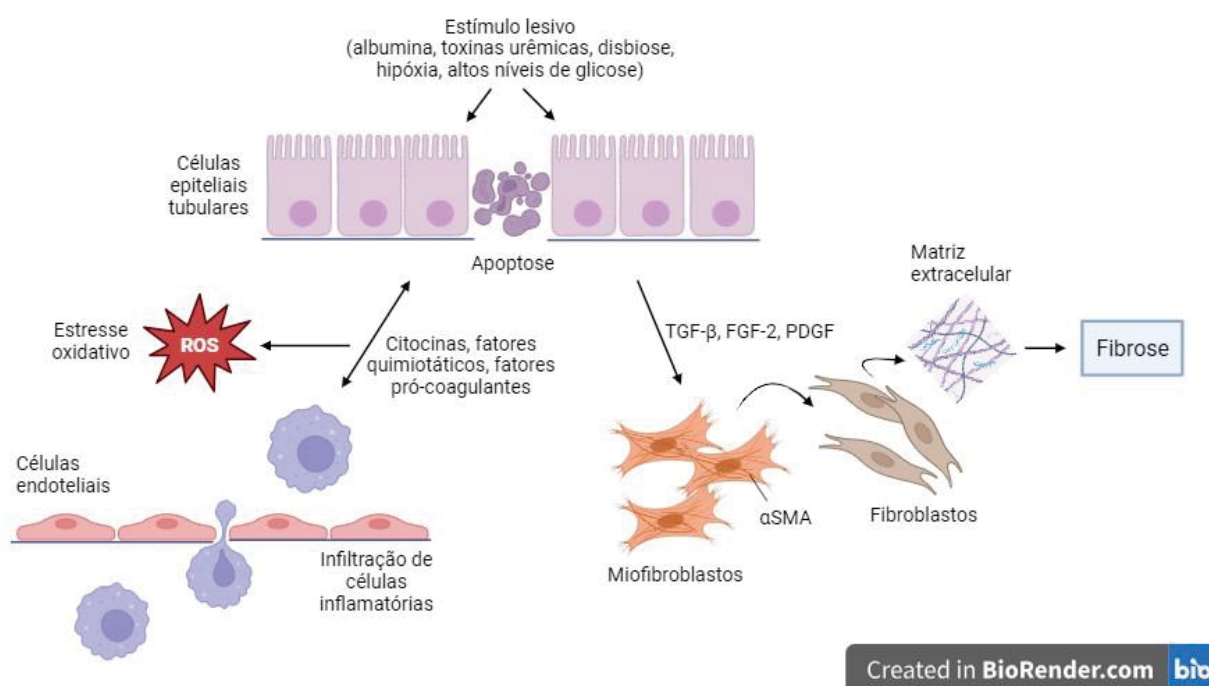


Figura 1: **Principais eventos na fibrogênese e inflamação intersticial renal.** O estímulo lesivo nas células tubulares, levam à sua apoptose e produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como fatores pró-coagulantes e quimiotáticos. Ocorre então, a infiltração peritubular de células inflamatórias, particularmente células T e macrófagos, o qual é um evento precoce que configura um estágio fibrogênico. Além disso, ocorre a ativação e expansão de miofibroblastos, seguido da produção de matriz extracelular gerada a partir da ativação local de fibroblastos intersticiais. As citocinas também atuam aumentando a síntese de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.

2.1.2 O papel da proteinúria na progressão da DRC

A maioria das doenças que conduzem à insuficiência renal em estágio final estão associadas à proteinúria (REISER; GUPTA; KISTLER, 2010). A proteinúria acelera a progressão da DRC através de várias vias, incluindo a indução da expressão de quimiocinas tubulares e a ativação do sistema complemento, acarretando na infiltração de células inflamatórias como macrófagos e em fibrose (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006).

A perda de proteínas na urina contribui para a patologia da DRC ao induzir alterações adversas na função glomerular como a hipertrofia glomerular e dano direto às células tubulares, além de promover a inflamação crônica (STENVINKEL *et al.*, 2021). A proteinúria, desta maneira, além de atuar como marcador de dano renal, também tem um efeito tóxico direto aos rins, levando à perda progressiva da sua função e sendo preditor de risco de progressão da lesão renal (LAMBERS HEERSPINK; GANSEVOORT, 2015).

As proteínas filtradas para o túbulo podem formar aglomerados que o obstruem fisicamente, como demonstrado pelo trabalho de Bertani *et al.*, (1986), o qual evidenciou que a entrada maciça de proteínas circulantes no túbulo conduz à formação de aglomerados proteicos no lúmen dos túbulos distais que aumentam progressivamente de tamanho, causando obstrução seguida de rompimento da membrana tubular. Os túbulos proximais obstruídos por aglomerados proteicos sofrem necrose seguida de atrofia, ocorrendo, posteriormente, o encolhimento e colapso do glomérulo ligado àquele túbulo (TANNER *et al.*, 1989). Além da lesão devido à obstrução física que os aglomerados proteicos causam, a proteinúria tem papel fundamental na lesão tubular por reação inflamatória acompanhada de fibrose intersticial (MEYER, 2003).

Estudos tem mostrado que a captação de altas concentrações de albumina exerce efeitos citotóxicos nas células tubulares proximais e distais, ativando uma ampla gama de vias de sinalização intracelular que induzem a liberação de fatores pró-inflamatórios, vasoativos e fibróticos, os quais causam danos intersticiais, disfunção tubulointersticial e fibrose (LAMBERS HEERSPINK; GANSEVOORT, 2015), acarretando na lesão irreversível e no caráter crônico da DRC. Estes processos se dão por meio da regulação positiva de genes relacionados com a síntese de quimiocinas e citocinas, como o NF-Kb e o fator de transcrição STAT (signal

transducer and activator of transcription) (LAMBERS HEERSPINK; GANSEVOORT, 2015).

A fibrose consequente à albuminúria advém da ativação e síntese de sinais quimiotáticos pelas células do túbulo proximal, os quais atraem linfócitos e macrófagos para o interstício (MEZZANO *et al.*, 2000). O recrutamento de macrófagos pelas células tubulares contribui para o surgimento de fibrose, uma vez que, como apontado no trabalho de Abbate *et al.*, (2002), o aumento da infiltração de macrófagos é seguido de um aumento da expressão de TGF- β , o qual induz a proliferação celular, migração, ativação e transcrição de moléculas pró-fibróticas, incluindo colágeno, fibronectina e inibidor do ativador do plasminogênio-1, promovendo a proliferação dos fibroblastos e células mesangiais no tecido renal (MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016) (Figura 2).

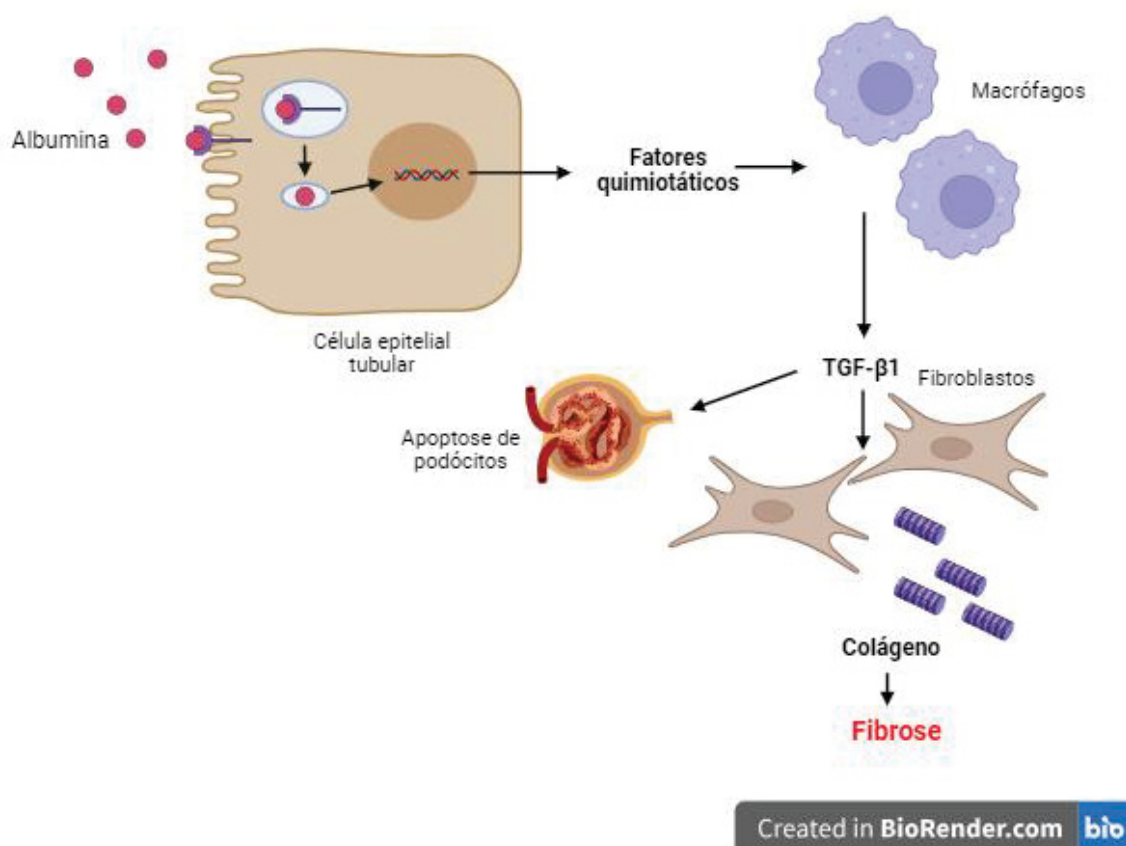


Figura 2: **Ativação de vias inflamatórias e fibrogênicas nas células epiteliais tubulares proximais em decorrência da proteinúria.** A perda da barreira de filtração glomerular acarreta em um grande aporte de albumina no lúmen do túbulo renal. A absorção da albumina pelas células epiteliais tubulares ativa vias de sinalização celular que levam ao aumento da transcrição de genes que codificam para fatores quimiotáticos, células inflamatórias (principalmente macrófagos). Os macrófagos contribuem para a fibrose pela liberação de TGF- β , o que estimula a formação de miofibroblastos e deposição de colágeno e transformação mesenquimal epitelial.

Além da ação direta TGF- β sobre o fibroblasto, este fator de transcrição também pode induzir a apoptose dos podócitos, como demonstrado por Das *et al.*, (2014), o qual observou, a partir de um estudo *in vitro*, que o tratamento de podócitos com TGF- β leva à produção de ROS, causando estresse oxidativo e morte destas células. Outros estudos também evidenciaram que o TGF- β é um potente indutor da transição de células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos renais intrínsecos em miofibroblastos que expressam α -actina do músculo liso (MENG; NIKOLIC-PATERSON; LAN, 2016).

Outro mecanismo que pode levar à lesão tubular inflamatória é a ativação do sistema complemento, o qual pode ocorrer quando proteínas circulantes como a C3, são filtradas para o túbulo (ABBATE; ZOJA; REMUZZI, 2006).

Dentre as vias de sinalização ativadas pela proteinúria, destaca-se a STAT, como demonstrado por Nakajima *et al.*, (2002), o qual, após tratamento de culturas de células tubulares com albumina, evidenciou que a presença desta proteína, assim como algumas citocinas, induz a ativação de proteínas STAT, mediante a via de sinalização da Jak-2 pelas células do túbulo proximal.

2.2 A PERDA DE MASSA MUSCULAR NA DRC

Dentre os muitos fatores de risco que afetam o prognóstico dos pacientes com DRC, especialmente aqueles em estágio terminal e em diálise, um estado caracterizado por distúrbios metabólicos e nutricionais, que levam à perda dos estoques de proteína e energia, conhecido como desnutrição proteico energética (DPC), o qual desempenha um papel importante, atuando como grande preditor de morbimortalidade (ALP IKIZLER *et al.*, 2013).

Vários fatores metabólicos e clínicos podem afetar negativamente o estado nutricional e a massa muscular, contribuindo com o desenvolvimento da DPC. Dentre eles, destacam-se a restrição de nutrientes, acidose metabólica, resistência à insulina, inflamação crônica, disbiose intestinal, infecção e estresse oxidativo, além de fatores relacionados com o tratamento da DRC como o procedimento de hemodiálise (SABATINO *et al.*, 2017).

A DPC afeta grande parcela da população em diálise. Gracia-Iguacel *et al.*, (2019), por exemplo, avaliou a prevalência desse distúrbio em pacientes dialíticos, a partir de dois critérios diferentes, observando que esta atinge entre 41% e 63% dos pacientes em HD. Em outro estudo, Carrero *et al.*, (2008), analisou pacientes incidentes e prevalentes no tratamento de hemodiálise, constatando que a atrofia muscular, um dos principais marcadores de DPC, atinge um terço de ambos os grupos.

Além da DPC, outras síndromes muito prevalentes na DRC são a sarcopenia e caquexia. A caquexia é uma síndrome multifatorial definida por significativa perda de peso corporal, redução de gordura e massa muscular e aumento do catabolismo proteico, a qual é altamente prevalente na DRC, estando associada ao declínio da função renal e, portanto, proeminente durante os últimos estágios da doença (O'SULLIVAN; SMITH; WATSON, 2018). Por outro lado, a sarcopenia, é uma síndrome comumente relacionada à idade, sendo caracterizada pelo declínio progressivo da massa muscular, associando-se à fragilidade e incapacidade motora (MORLEY *et al.*, 2011). A sarcopenia, como apontada por Fahal, (2014), é um poderoso preditor de morbimortalidade em pacientes em diálise, apresentando prevalência global de 24,5% na população em tratamento de HD, segundo Duarte *et al.*, (2024).

Diversos mecanismos podem levar a diminuição da massa muscular característica da caquexia e sarcopenia, sendo que a perda de reservas de proteína muscular pode resultar de três respostas: 1) o crescimento prejudicado de novas fibras musculares; (2) a supressão da síntese proteica e (3) a estimulação da degradação proteica (WANG; MITCH, 2014).

2.2.1 Mecanismos de perda de massa muscular

Diversos mecanismos moleculares relacionados à atrofia muscular induzida pela DRC já foram propostos, sendo que muitas das vias estudadas levam ao aumento da expressão de atrogenes, como a atrogina-1 (MAFbx) e o fator 1 do anel muscular (MuRF-1), bem como genes relacionados à autofagia (WATANABE *et al.*, 2019).

A principal via de sinalização que leva à atrofia muscular é ativada pela miostatina, uma proteína altamente conservada pertencente à superfamília do fator

de crescimento transformador β (TGF- β) e que age como regulador parácrino do crescimento muscular, sendo produzida principalmente no músculo esquelético (CHEN *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2023). A ligação da miostatina ao receptor de ativina A (ActRIIA) na superfície da célula muscular promove a fosforilação das proteínas Smad 2 e 3 e a formação de um complexo entre estas e a Smad 4. Tal complexo se transloca para o núcleo celular, onde regula a transcrição de genes envolvidos na proliferação e diferenciação de células precursoras do músculo esquelético e nas vias de degradação de proteínas (WHITE; LEBRASSEUR, 2014) (Figura 3).

Dentre os genes que são ativados pelo complexo formado pelas Smads está o MuRF-1 e a MAFbx. O MuRF-1 age como uma ligase de ubiquitina E3, estimulando a quebra de proteínas através do sistema ubiquitina proteossoma (UPS) (BATAILLE *et al.*, 2021), o principal sistema de hidrólise intracelular de proteínas e responsável pela degradação de proteínas mal dobradas ou danificadas no músculo esquelético (HABERECHT-MÜLLER *et al.*, 2021). Já os alvos de MAFbx são principalmente proteínas envolvidas na síntese e regeneração muscular como o MyoD e a miogenina (ROM; REZNICK, 2016).

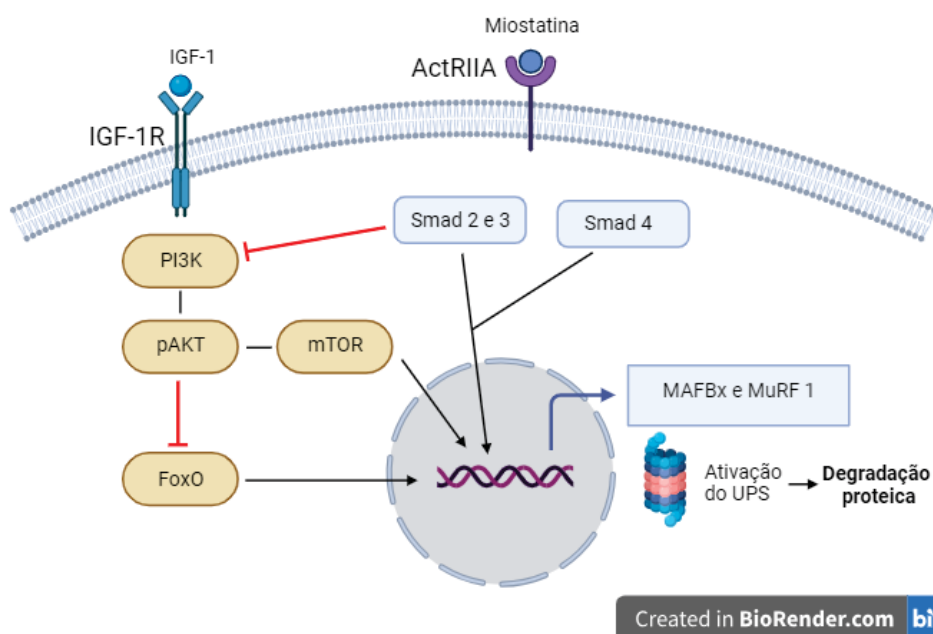


Figura 3: **Vias de sinalização envolvidas no crescimento e atrofia muscular.** A ligação da miostatina ao receptor ActRIIA, leva à fosforilação da Smad 2 e 3 e formação do complexo com a Smad 4, o qual se transloca para núcleo e promove a transcrição dos genes que codificam MAFbx e MuRF1, acarretando na ativação do UPS e degradação proteica. Em contrapartida, a ligação do IGF-1, leva à ativação do PI3K, que fosforila os fosfolipídios da membrana, gerando PIP3, o qual, por sua vez, ativa a PDK1 e Akt. A Akt inibe FoxO e ativa a via mTOR, levando ao aumento da síntese proteica.

A atrofia muscular em pacientes com DRC está relacionada, principalmente, à proteólise muscular acelerada pelo UPS ativado (WANG *et al.*, 2023). Para a degradação pelo UPS, as proteínas precisam ser marcadas pós-tradução com o pequeno modificador ubiquitina (HABERECHT-MÜLLER; KRÜGER; FIELITZ, 2021). Esta modificação ocorre através de uma cascata enzimática de três etapas, composta pela enzima ativadora da ubiquitina (E1), enzima conjugadora da ubiquitina (E2) e a ubiquitina ligase (E3) (XIONG; YU; ZHANG, 2022). A enzima E1 ativa a ubiquitina de maneira dependente de ATP formando um tioéster e a transfere para a E2 que, por sua vez, interage com a E3, a qual a liga covalentemente a uma proteína substrato por meio de uma ligação isopeptídica (HABERECHT-MÜLLER; KRÜGER; FIELITZ, 2021).

Além da indução da degradação proteica e atrofia muscular, a ligação da miostatina ao receptor ActRIIA também leva à diminuição da síntese de proteínas musculares através da inibição da miogênese durante o desenvolvimento e pela regulação negativa da ativação e renovação de células satélites (VERZOLA *et al.*, 2019).

Para serem ativadas é essencial que as células satélites quiescentes entrem novamente na fase S do ciclo celular. A miostatina regula a ativação destas, ao controlar a transição de fase G1 para S, além de inibir os níveis de MyoD e miogenina, que são proteínas envolvidas na proliferação destas células (MCCROSKERY *et al.*, 2003).

Em contraste com a ação da miostatina, o IGF-I estimula o crescimento e o desenvolvimento do músculo estriado esquelético (SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2011). A ligação do IGF-I ao seu receptor leva à ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que fosforila os fosfolipídios da membrana, gerando fosfoinositídeo-3,4,5 trifosfato (PIP3). A PIP3, por sua vez, ativa duas quinases, a PDK1 e Akt. A Akt inibe a degradação proteica por reprimir os fatores de transcrição da família FoxO, além de estimular a síntese proteica ao ativar a via mTOR. Ademais, a FoxO regula positivamente a transcrição de MuRF1 e a ativação do UPS (SCHIAFFINO; MAMMUCARI, 2011).

Diversos trabalhos vêm apontando a relação entre a perda de massa muscular na DRC e níveis aumentados de miostatina. Bataille *et al.* (2022) por exemplo, analisou as concentrações de miostatina sérica de 232 pacientes com DRC,

correlacionando-as com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). Os autores observaram que, embora não haja aumento da expressão gênica da miostatina, sua concentração estava aumentada, sendo correlacionada inversamente com a TFGe, demonstrando que a diminuição da TFG acarreta seu acúmulo no sangue.

Além disso, tem sido demonstrado que o estresse oxidativo e as citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1), ativam as vias principais que regulam a expressão de MuRF-1 e MAFbx (AGRAWAL *et al.*, 2023).

2.3 A ESTRUTURA DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO E MECANISMOS DE HIPERTROFIA MUSCULAR

O tecido muscular estriado esquelético é composto por células com propriedades de excitabilidade e contratilidade chamadas fibras musculares, devido ao seu formato alongado. As fibras musculares podem ser classificadas em oxidativas lentas (tipo I), oxidativas rápidas (tipo IIa) e glicolíticas rápidas (tipo IIb) (YIN *et al.*, 2021).

Cada fibra muscular é circundada por uma membrana celular conhecida como sarcolema. Tais fibras formam conjuntos dispostos em feixes, os quais são rodeados por outra camada de tecido, o perimísio. Associado ao sarcolema existe um complexo de diversas proteínas, o qual está fisicamente ligado à estrutura interna das miofibrilas, particularmente à proteína actina presente no filamento fino. Diversos feixes musculares forma um músculo, o qual é envolto por tecido conjuntivo chamado epimísio (Frontera & Ochala, 2015).

As fibras musculares individuais são compostas por estruturas de geração de força e suporte de carga, chamados sarcômeros (Figura 4). Cada sarcômero pode ser dividido em diferentes zonas, sendo estas: a banda I, onde apenas filamentos de actina estão presentes, a banda A, que contém filamentos sobrepostos de actina e miosina, o disco Z que margeia o sarcômero, ancorando as extremidades dos filamentos de actina, e a banda M no centro, onde apenas os filamentos de miosina estão presentes e reticulados (WANG *et al.*, 2021).

O músculo estriado esquelético é um tecido que possui grande capacidade plástica, podendo se adaptar rapidamente às condições fisiológicas por meio da

manutenção da estrutura dos sarcômeros (ZÖLLNER *et al.*, 2012). No crescimento muscular fisiológico, o aumento da massa muscular pode ocorrer por um aumento na quantidade, diâmetro ou comprimento das fibras musculares. Porém, a multiplicação destas é limitada ao período pré-natal e imediatamente pós-natal, sendo que, a partir disso, o crescimento muscular ocorre por hipertrofia, ou seja, por meio da adição de miofibrilas, levando ao aumento da massa muscular ou diâmetro do músculo, e por meio da adição de sarcômeros em série (levando ao aumento do comprimento do músculo) (PEARSON, 1990; RILEY; VAN DYKE, 2012).

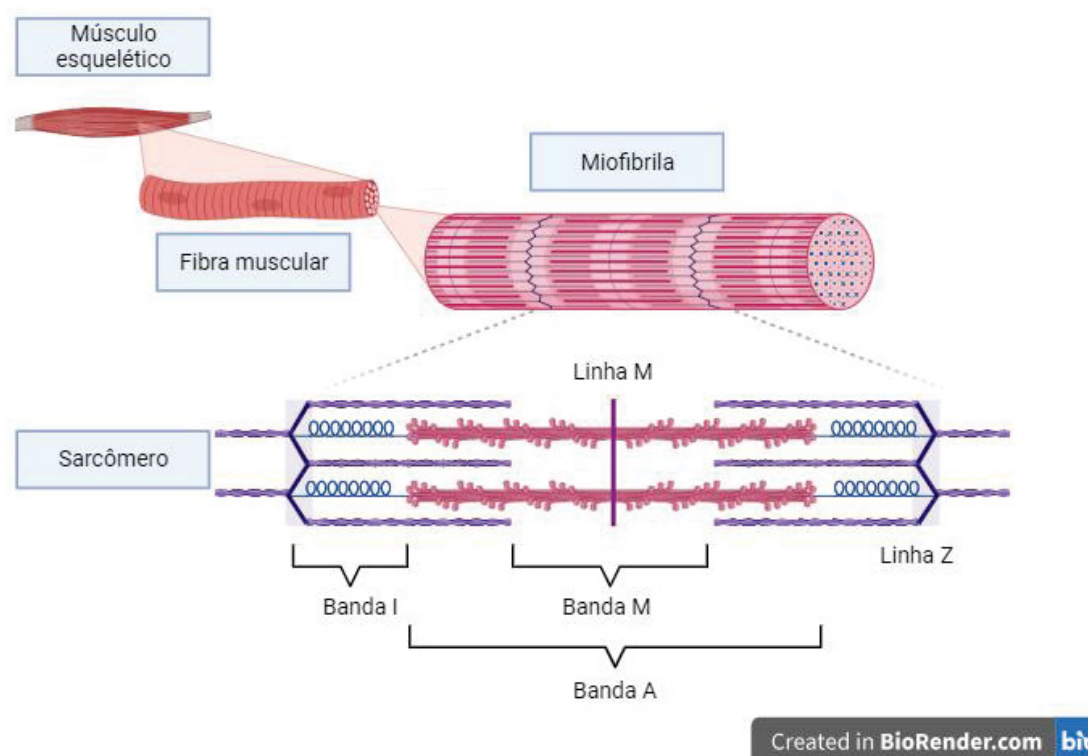


Figura 4: **Estrutura do sarcômeros.** Cada célula muscular individual é formada por inúmeras miofibrilas, as quais são formadas pelas unidades básicas de contração muscular chamadas sarcômeros. Cada sarcômero é formado pela banda I, onde apenas filamentos de actina estão presentes, a banda A, que contém filamentos sobrepostos de actina e miosina, o disco Z que margeia o sarcômero, ancorando as extremidades dos filamentos de actina, e a banda M no centro, onde apenas os filamentos de miosina estão presentes e reticulados

Dessa forma, o músculo esquelético pode sofrer adaptações aos diferentes estímulos mecânicos. Em exposição a altas cargas, há adição de sarcômeros em paralelo, aumentando a força muscular e a área de secção transversa. Já a resposta ao estiramento excessivo crônico ou ao exercício excêntrico, é a adição de sarcômeros em série, visando o aumento do comprimento muscular (KRUSE *et al.*,

2021). Em contrapartida, em resposta ao desuso, ocorre a redução do número de sarcômeros em série e o encurtamento muscular.

Portanto, a manutenção de sarcômeros, tanto em série quanto em paralelo, está diretamente relacionada com a capacidade de geração de força em fibras musculares (KRUSE *et al.*, 2021; WISDOM; DELP; KUHL, 2015).

Conforme evidenciado na literatura, a adição de novos sarcômeros, processo denominado sarcomerogênese, ocorre quando o músculo esquelético é estirado além do seu limite fisiológico, visando manter o comprimento do sarcômero consistente em seu regime ótimo de comprimento e força dentro da fibra muscular e evitando que ocorra a instabilidade do sarcômero (BUTTERFIELD; LEONARD; HERZOG, 2005; WISDOM; DELP; KUHL, 2015), sendo que o tipo de contração muscular exercida é outro fator determinante neste processo.

O exercício físico resistido (EFR), por exemplo, leva ao ganho de massa muscular, força e à hipertrofia, sendo esta última caracterizada tanto pelo aumento da secção de área transversa das fibras musculares, quanto pelo aumento de sarcômeros em série, devido a uma maior absorção e incremento de proteínas pelo músculo (SECCHI *et al.*, 2008). Tem sido relacionado a este aumento de força, principalmente, o ganho de sarcômeros em série, em comparação ao aumento do diâmetro muscular (SECCHI *et al.*, 2008)

No entanto, no estado inflamatório decorrente de doenças mediadas por citocinas pró-inflamatórias, como na DRC, há a ocorrência de sarcopenia e diminuição da força muscular (TEIXEIRA; FILIPPIN; XAVIER, 2012). O TNF- α , por exemplo, é uma citocina que age como potente estimulador da MuRF1, podendo levar à diminuição de sarcômeros e à perda de massa muscular (MARTINS *et al.*, 2020).

2.4 A VIA DE SINALIZAÇÃO STAT-3

A STAT-3 é um fator de transcrição envolvido, dentre outras funções, na diferenciação, migração e proliferação celular, sendo que sua ativação ocorre em resposta a vários fatores de crescimento e citocinas (RAWLINGS; ROSLER; HARRISON, 2004). A IL-6 é um importante regulador a montante do STAT-3, e sua

ligação ao receptor leva à formação de um heterohexâmero composto por IL-6, IL-6R e gp130 (YU *et al.*, 2023).

O complexo receptor mediador das atividades biológicas da IL-6 (Figura 5) consiste na glicoproteína transmembrana do tipo I de ligação à IL-6, denominada IL-6R e na proteína transdutora de sinal transmembrana gp130 (SCHELLER *et al.*, 2011).

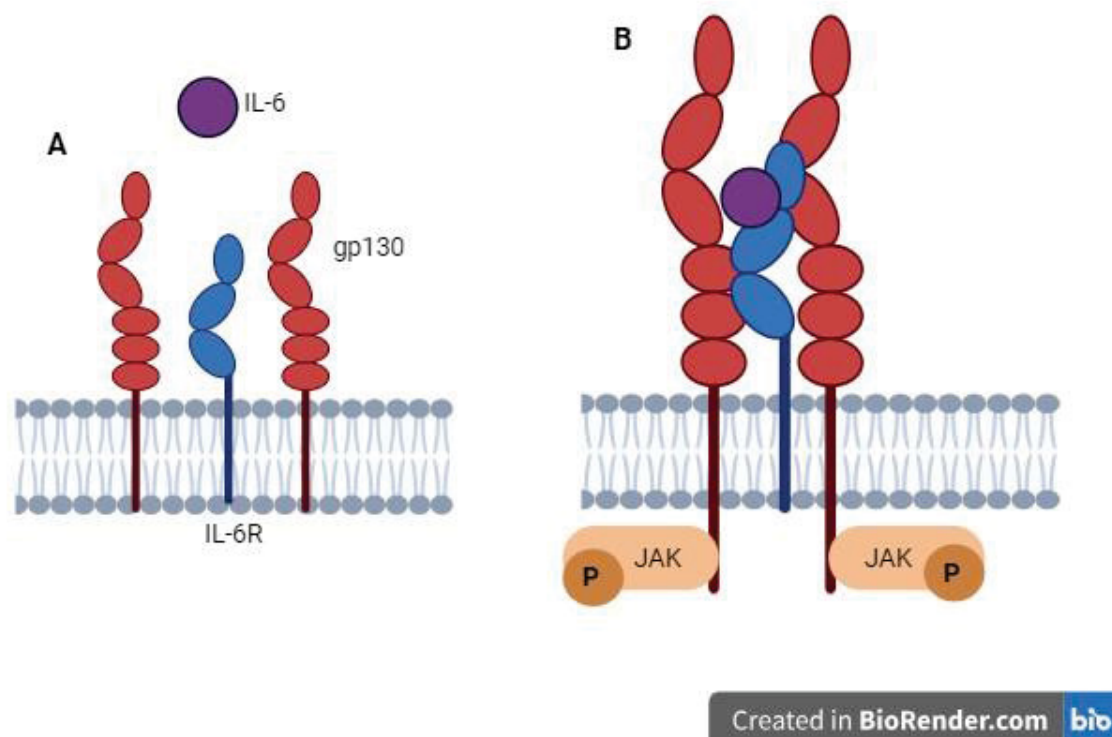


Figura 5: **Complexo receptor de IL-6.** A: O IL-6R é formado pela glicoproteína transmembrana IL-6R e pela proteína transdutora de sinal transmembrana gp130. B: O complexo IL-6/IL-6R se associa com a proteína gp130, iniciando a sinalização intracelular. Tanto a IL-6, quanto o IL-6R não possuem afinidade mensurável com a gp130. Sendo assim, somente o complexo se liga a gp130.

A proteína gp130 está associada de forma não covalente a uma tirosina quinase da família das Janus quinases (JAKs). Ao se ligar ao receptor, a IL-6 induz a dimerização das gp130, o que permite a fosforilação e ativação das quinases associadas, as quais fosforilam resíduos de tirosina que servirão como locais de ancoragem e recrutamento de monômeros de STAT-3 citoplasmáticos (BHARADWAJ *et al.*, 2020) como a tirosina 705, localizada próximo ao carbono terminal da STAT-3. A STAT-3 fosforilada forma dímeros que se translocam para o núcleo, onde regulam a transcrição de genes específicos (PANG *et al.*, 2010; RAWLINGS; ROSLER; HARRISON, 2004) (Figura 6).

Vários mecanismos de regulação negativa das vias JAK/STAT já foram identificados, tais como as fosfotirosinas fosfatases, as proteínas inibidoras da STAT ativada e os supressores da sinalização de citocinas (SOCS) (SHUAI; LIU, 2003).

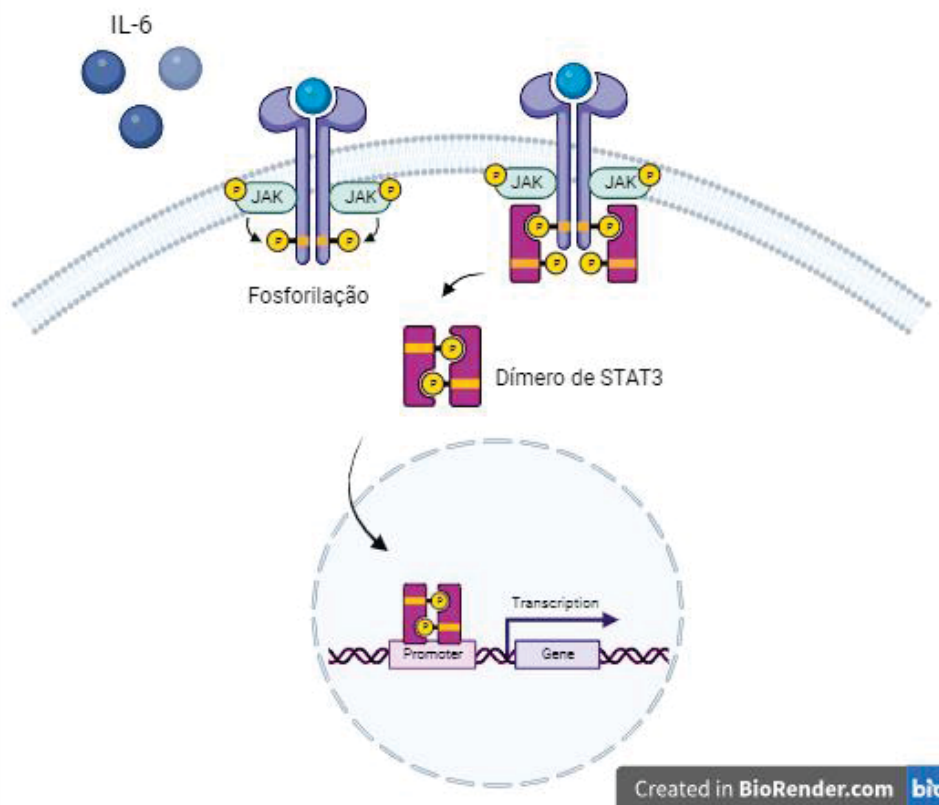


Figura 6: **Modelo de sinalização da via STAT-3.** O fator de transcrição é ativado em resposta a muitas citocinas e fatores de crescimento, como a IL-6, que se ligam aos receptores na membrana plasmática. Após a ligação, as moléculas de STAT-3 são recrutadas para a membrana plasmática, onde serão ativadas via fosforilação de um resíduo de tirosina. A ativação da STAT-3 induz a dimerização através da interação recíproca de fosfotirosina-SH2 entre duas moléculas de STAT-3. Os dímeros de STAT-3 então, se deslocam para o núcleo onde se ligam a sequências consenso no promotor de genes alvo, ativando sua transcrição.

As proteínas SOCS formam uma família de oito membros (SHUAI; LIU, 2003) que apresentam um domínio SH2 flanquado por um domínio amino terminal variável e uma sequência de 40 aminoácidos em uma região C-terminal denominada SOCS box (KILE *et al.*, 2002). Estas proteínas tornam-se rapidamente induzidas após a ativação do STAT por citocinas ou fatores de crescimento e atuam através de um ciclo de feedback negativo para inibir a ativação do STAT. A SOCS-1 regula negativamente a sinalização STAT-3 através da ligação direta às JAK quinases, bloqueando a atividade enzimática, além de promover a ubiquitinação e subsequente degradação

do JAK2 ativado, enquanto a SOCS-3 bloqueia a atividade da JAK quinase ligando-se diretamente aos domínios citoplasmáticos dos receptores (BROSIUS; HE, 2015).

A via de sinalização STAT-3 está envolvida em uma série de patologias, incluindo doenças caracterizadas por inflamação crônica, fibrose e câncer (BHARADWAJ *et al.*, 2020).

No que se refere a DRC, a STAT-3 possui relevante papel na sua progressão, através da modulação da fibrose pelo aumento da expressão α -SMA e fibronectina nas células tubulares e intersticiais (KURATSUNE *et al.*, 2007; PANG *et al.*, 2010), bem como na comunicação entre estas células, sendo que sua inativação reduz a expressão de genes que promovem a acumulação de matriz extracelular e a lesão tubulointersticial (BIENAIMÉ *et al.*, 2016). A STAT-3 também atua na diminuição da massa muscular, desempenhando um papel crítico na perda muscular induzida pela IL-6 (GUADAGNIN; MÁZALA; CHEN, 2018).

2.4.1 O papel do STAT-3 no tecido muscular

Especificamente no contexto da perda muscular, diversos trabalhos vêm apontando a via de sinalização STAT-3 como um importante fator na progressão da caquexia. Miller *et al.*, (2017), por exemplo, demonstrou que a inibição da ativação da STAT-3 a partir do bloqueio da IL-6, levou à diminuição da perda de massa muscular e proteção contra a caquexia em modelo de câncer. Sala & Sacco (2016) citam que a ativação da STAT-3 está diretamente ligada à perda de massa muscular em vários modelos animais, incluindo modelos de DRC. Zhang *et al.*, (2013) observou aumentos significativos nas expressões das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF α em músculos de pacientes com caquexia relacionada à DRC. Os autores também demonstraram que a STAT-3 leva ao aumento da degradação proteica pela ativação da miostatina e que sua inibição diminui a perda de massa muscular em modelo animal de nefropatia diabética.

Outro mecanismo pelo qual a ativação da STAT-3 causa diminuição da massa muscular envolve as células tronco satélites (uma subpopulação de células progenitores musculares capazes de auto renovação). A inibição da STAT-3 estimula as divisões de células tronco satélites nas fibras musculares (PRICE *et al.*, 2014),

promovendo sua expansão e melhorando o reparo tecidual nos músculos distróficos (TIERNEY *et al.*, 2014).

Embora a via STAT-3, induzida por IL-6, tenha papel essencial na inflamação persistente observada na DRC e na perda de massa muscular decorrente desta, estudos mostram que a IL-6 também é secretada pelo músculo estriado esquelético como uma miocina, atuando na comunicação entre o músculo e outros tecidos, tais como o tecido adiposo e o fígado (DAOU, 2020) (Figura 7). A IL-6 derivada dos músculos e induzida pela prática de exercício acarreta maior disponibilidade de glicose, aumentando sua captação e oxidação pelas células musculares, tendo um efeito protetor (PEDERSEN, 2013).

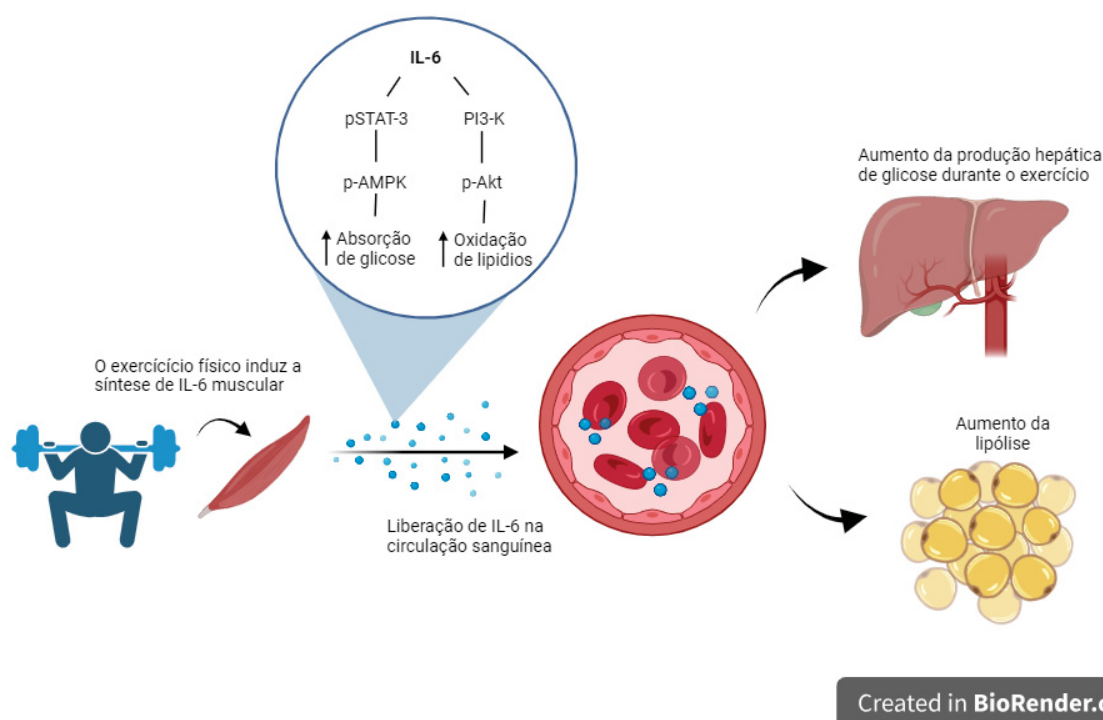


Figura 7: **Secreção de IL-6 como miocina em resposta ao exercício físico.** O exercício físico induz a liberação de IL-6 pelas células musculares, a qual atua na comunicação entre o tecido muscular e outros órgãos. No fígado, a IL-6 promove a produção de glicose, enquanto que no tecido adiposo a miocina atua aumentando a lipólise, afim de liberar energia durante a atividade física.

2.5 O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DRC

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define atividade física como sendo qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que requeiram gasto de energia, enquanto que o exercício físico (EF) é uma subcategoria da atividade física, sendo planejada, estruturada, repetitiva e tem como objetivo melhorar ou manter um ou mais componentes do condicionamento físico (OMS, 2020).

Como alternativa para melhora do quadro clínico dos pacientes portadores de DRC, pode-se apontar o exercício físico como tendo papel importante (WATSON *et al.*, 2017). Diversos trabalhos têm mostrado que o EF intradialítico pode atuar no aumento da eficácia do tratamento de hemodiálise. Dungey *et al.*, (2017), por exemplo, observou que o EF aeróbico intradialítico regular está associado a um efeito anti-inflamatório à nível celular circulante, podendo proteger contra o aumento do risco de doenças cardiovasculares e mortalidade associadas a inflamação crônica e número elevado de monócitos. O trabalho de Storer *et al.*, (2005) mostrou que o EF aeróbico aumenta o pico de consumo de oxigênio, potência muscular e força do quadríceps em pacientes em hemodiálise após um protocolo de 10 semanas de ciclismo intradialítico.

Roshanravan *et al.*, (2017), em um trabalho de revisão da literatura sobre pacientes com DRC submetidos a EF, citam evidências de melhora substancial no tamanho e na potência dos músculos das pernas, o que correspondeu às alterações morfológicas na densidade capilar muscular, além de melhorias no metabolismo oxidativo, biogênese mitocondrial muscular e diminuição da inflamação sistêmica. Entretanto, como apontado por Castro *et al.*, (2019), apesar dos benefícios, a aplicação efetiva de programas de EF aeróbico intradialítico na rotina clínica dos pacientes em DRC ainda enfrenta algumas dificuldades, tais como o elevado custo de compra e manutenção dos equipamentos, aliado à necessidade de adequação do espaço físico, o qual, muitas vezes, é limitado.

Entre os diferentes tipos de exercício, o exercício físico resistido (EFR) tem se demonstrado uma boa alternativa para pacientes com DRC, apresentando alta adesão aos programas de treinamento (WATSON *et al.*, 2015), além de ser uma modalidade de exercício físico que requer pouca infraestrutura, materiais e espaço, podendo ser realizada no próprio ambulatório de hemodiálise. Resultados publicados por Watson *et al.*, (2017), apontam que pacientes com DRC submetidos a treinos de EFR,

apresentaram diminuição significativa da expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, MCP-1 e TNF- α . Enquanto isso, Torres *et al.*, (2020) divulgou que após três meses de EFR intradialítico, pacientes com DRC apresentaram uma melhora significativa em suas habilidades funcionais demonstradas através dos resultados de teste de esteira, bem como o teste de sentar e levantar, além do aumento significativo da massa muscular, força muscular do quadríceps e melhora do perfil lipídico.

Embora necessitem de maior elucidação, estudos com modelos animais de DRC demonstraram benefícios consideráveis na prática do EFR. Souza *et al.*, (2018), mostrou relevantes resultados, os quais indicaram que esse tipo de exercício atenua a inflamação e a progressão da fibrose renal em ratos com DRC induzida por nefrectomia. Adicionalmente, o trabalho de Wang *et al.*, (2014) também demonstrou que camundongos com DRC induzida por nefrectomia e submetidos a um modelo EFR apresentaram aumento de massa muscular e redução da proteólise muscular, bem como alterações de sinais intracelulares que regulam a função das proteínas e células satélites musculares.

2.6 ALTERAÇÕES ÓSSEAS NA DRC

Além dos distúrbios renais e musculares, é sabido que distúrbios em parâmetros bioquímicos são altamente prevalentes na DRC, sendo responsáveis por aumentar a morbimortalidade dos pacientes. Dentre as alterações comumente observadas, destacam-se o distúrbio mineral ósseo (DMO), osteoporose e fraturas por fragilidade (HSU; CHEN; CHEN, 2020).

Por definição, o DMO-DRC descreve a síndrome de anormalidades bioquímicas, ósseas e de calcificação extraesquelética que ocorrem em pacientes com DRC, manifestada por anormalidades no metabolismo do cálcio, fósforo, PTH ou vitamina D; anormalidades de renovação óssea, mineralização, volume, crescimento linear ou força, bem como calcificação vascular ou de outros tecidos moles (MOE *et al.*, 2006).

A hiperfosfatemia, principalmente devido ao aumento do risco de calcificação vascular, é uma alteração associada a resultados adversos e risco de mortalidade, muito comum em pacientes com DRC (RAHBAR SAADAT *et al.*, 2020). Em indivíduos com funcionamento renal normal, o fosfato sérico é mantido em uma estreita faixa de

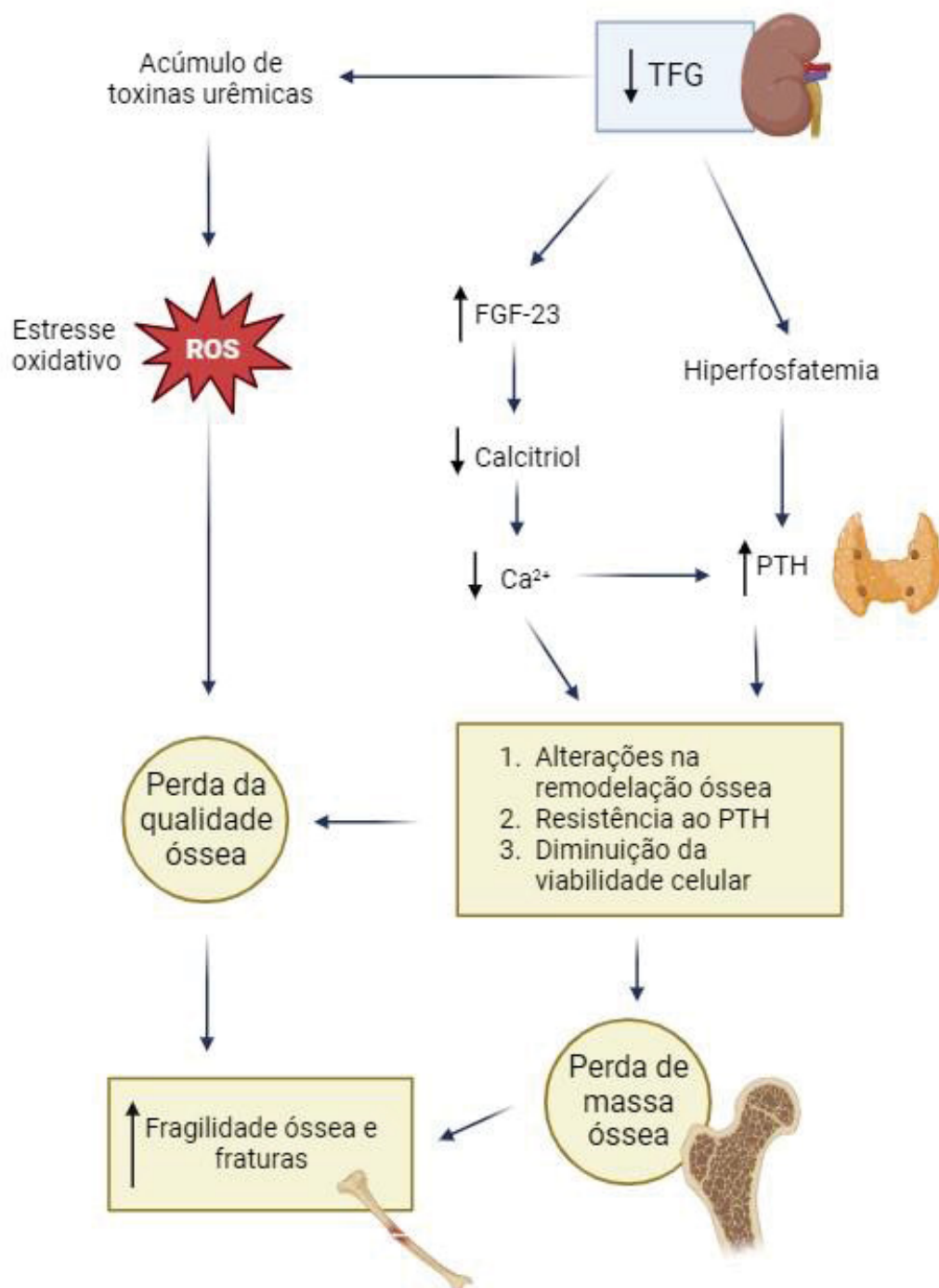
concentração. Na DRC, no entanto, a manutenção do balanço do fósforo é desregulada, causando desequilíbrio do fosfato sérico. Block *et al.*, (2004) demonstrou que o risco de morte em pacientes hemodialíticos associado à hiperfosfatemia independe da idade, sexo, raça ou etnia, sendo que concentrações séricas de fósforo elevadas logo acima da faixa de 3,0 a 5,0 mg/dL já estão associadas a aumentos significativos da mortalidade

O acúmulo de fosfato resultante da diminuição da TFG, ativa mecanismos de compensação, incluindo o aumento da secreção do hormônio da paratireóide (PTH) (BARRETO *et al.*, 2019). A elevação dos níveis sanguíneos do PTH leva à diminuição da reabsorção tubular de fosfato pelos rins e fosfatúria nos néfrons remanescentes. Entretanto, quando a TFG se torna menor que 25mL/min a elevação nos níveis de PTH não é mais capaz de aumentar a fosfatúria, causando o quadro de hiperfosfatemia (EKNOYAN; LEVIN; LEVIN, 2003).

Além da hiperfosfatemia, a hipocalcemia também é comum em pacientes com DRC e contribui para o aumento da secreção de PTH e remodelação óssea anormal.

A concentração sérica total de cálcio diminui após retenção de fosfato, devido ao aumento da expressão do fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23) que leva à diminuição da concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (calcitriol), bem como pela resistência às ações calcêmicas do PTH no osso durante o processo de DRC (HSU; CHEN; CHEN, 2020).

Outro problema relacionado a DRC que leva ao DMO é o acúmulo de toxinas urêmicas, as quais criam um ambiente de estresse oxidativo excessivo, além de inibirem a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, diminuindo assim, a remodelação óssea (IWASAKI; KAZAMA; FUKAGAWA, 2017) (Figura 8).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Figura 8: **Fisiopatologia do distúrbio mineral ósseo relacionado a doença renal crônica.** A diminuição da TFG leva à diminuição da excreção de fósforo, causando seu acúmulo no sangue e consequente liberação de PTH. A diminuição da TFG também acarreta no acúmulo de toxinas urêmicas e produção de espécies reativas de oxigênio, bem como no aumento da síntese de FGF-23 e diminuição de calcitriol, o que diminui a reabsorção de cálcio no intestino. O resultado dessas alterações são a perda da qualidade e da massa óssea, induzindo, assim a fragilidade óssea e fraturas.

2.7 O MODELO DE NEFROPATIA INDUZIDO POR ADRIAMICINA

A adriamicina (ADM) (doxorubicina) é um quimioterápico antibiótico antraciclínico citotóxico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, muito utilizado no tratamento de neoplasias. Em roedores, o fármaco é capaz de mimetizar uma lesão estrutural e funcional, semelhante à da doença renal proteinúrica crônica de humanos (LEE; HARRIS, 2011), nos quais sua nefrotoxicidade é rara (ZHENG *et al.*, 2006).

A ação da ADM ocorre em decorrência da lesão dos podócitos devido aos danos oxidativos na estrutura da célula através da redução direta a um radical semiquinona ou através da produção de espécies reativas de oxigênio (FOGO, 2003). Além disso, a droga leva à diminuição da espessura da camada de superfície endotelial glomerular, como demonstrado no trabalho de Jeansson *et al.*, (2009), o qual verificou que ratos que desenvolveram proteinúria a partir do tratamento com adriamicina apresentavam a camada de superfície endotelial glomerular com apenas 20% da espessura normal.

Tais alterações são resultado na infrarregulação de certos proteoglicanos e enzimas necessárias na produção do glicocálix e consequente diminuição da seletividade da barreira de filtração e albuminúria (JEANSSON *et al.*, 2009). Outra característica da ação da adriamicina nos glomérulos é a retração ou perda dos processos pediculares dos podócitos (KERJASCHKI, 2001).

O modelo de nefropatia induzida por adriamicina é largamente utilizado devido às suas vantagens, tais como a facilidade de reprodução em laboratório, o elevado grau de lesão tecidual associado a uma taxa de mortalidade aceitável (<5%), morbidade (perda de peso), e o fato de o tempo de lesão ser consistente e previsível, uma vez que o modelo é caracterizado pela indução de lesão renal dentro de alguns dias da administração do fármaco (LEE; HARRIS, 2011). Outro fato interessante no uso da ADM é que este quimioterápico causa tanto lesões glomerulares, quanto lesões tubulares, como demonstrado por Okuda *et al.*, (1986), o qual verificou que ratos tratados com a droga apresentam esclerose glomerular, obstrução e dilatação tubular por aglomerados proteicos e fibrose intersticial com infiltração de monócitos característicos da GESF.

O modelo em questão foi descrito por Okuda *et al.*, (1986) em ratos, o qual utilizou duas doses de 2 mg/kg de ADM, injetadas com intervalo de 20 dias, em um

protocolo de 28 semanas. Já Wang *et al.*, (2000) observou que em camundongos da linhagem BALB/c, a mesma dose induz proteinúria evidente a partir do quinto dia, a qual permaneceu elevada durante as 6 semanas de estudo. Ademais, os autores observaram vacuolização glomerular e glomeruloesclerose focal discreta na quarta semana, a qual é exacerbada na sexta semana passando para uma glomeruloesclerose focal extensa, ou até mesmo global, associada à expansão intersticial moderada e inflamação grave.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem BALB/c com oito semanas de idade originados do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos no biotério, acondicionados em caixas coletivas, contendo cinco animais por caixa, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de cerca de 20°C e com suprimentos de água e alimento autoclavados disponíveis durante todo o tempo de experimento.

Os procedimentos foram realizados de acordo com a lei federal nº 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 DROGAS

3.2.1 Indução da nefropatia

Para a indução da nefropatia foi utilizado adriamicina (Adriblastina®) da marca Pfizer (Pfizer™, Inc. Nova Iorque, USA) em dose única de 10 mg/kg (LEE; HARRIS, 2011) por via intravenosa (IV) na veia caudal.

Para simular o estresse os animais dos grupos controle e Stattic (inibidor da via de sinalização STAT-3) receberam solução salina IV na veia caudal.

3.2.2 Inibição da via de sinalização STAT-3

A inibição da via de sinalização STAT-3 foi realizada pela administração do inibidor da via Stattic (Small-molecule Inhibitor of STAT-3 Activation and Dimerization) (Abcam™, Inc., Cambridge, MA) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), na dose de 2 mg/kg, por via IV na veia caudal nos dias 3, 6, 10, 14 e 21 após a administração de ADM, para os grupos Stattic e ADM+Stattic. O volume de Stattic correspondente a dose de 2mg/kg foi ajustado para um volume final de 120 µL em solução salina.

A fim de simular o estresse e possível efeito da solução de diluição da droga, os animais dos grupos controle receberam solução salina com o equivalente de DMSO no mesmo intervalo correspondente a administração de drogas aos devidos grupos.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo estes: 1) Grupo EFR, o qual realizou os treinos e 2) Grupo sedentário que não realizou o protocolo de treinos. Estes dois grupos foram então, divididos em quatro subgrupos, de acordo com a administração das drogas, adriamicina e stattic, sendo estes: 1) Controle; 2) Adriamicina (ADM); 3) Adriamicina + Stattic (ADM+ST) e 4) stattic (ST). Os grupos e subgrupos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Grupos experimentais

Subgrupos	Protocolo	
	EFR	Sedentário
Controle (n)	10	10
ADM (n)	10	10
ADM + ST (n)	10	10
ST (n)	10	10

Antes do início dos experimentos, os animais foram pesados e tiveram sua urina basal coletada. A coleta de urina se deu através de micção espontânea. Para tanto, os animais foram dispostos em caixas forradas com placas de 96 poços, onde a urina foi coletada com auxílio de uma pipeta. A urina foi então congelada e mantida em freezer -20°C até o momento das análises.

Os animais pertencentes ao grupo EFR, foram submetidos ao protocolo de treinos, enquanto que os sedentários foram mantidos em suas caixas, sem a realização do exercício.

Após a oitava semana de experimentos foi realizada a injeção de ADM nos animais dos grupos ADM e ADM+ST, independente da realização ou não dos treinos. Os animais do grupo EFR continuaram o protocolo de treinos por mais 4 semanas (Figura 9).

Nos dias 4, 7, 14, 21 e 28 após a injeção de ADM, os animais foram pesados e tiveram sua urina novamente coletada. No 28º dia após a indução da nefropatia, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta dos tecidos.

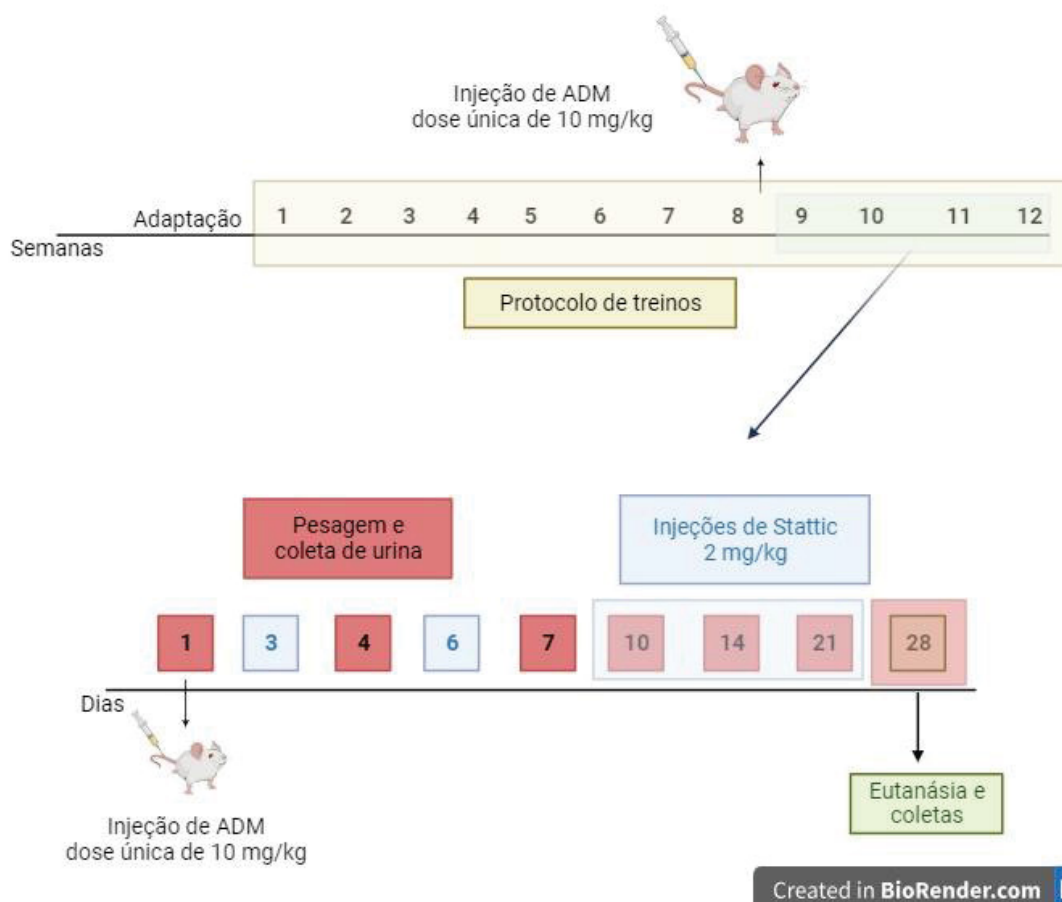


Figura 9: **Desenho experimental.** Os animais do grupo EFR foram submetidos a um protocolo de 12 semanas de treinos, enquanto que os animais sedentários foram mantidos durante o mesmo período em suas caixas. Ao final da oitava semana, os animais tiveram a nefropatia induzida por dose única de ADM IV pela veia caudal. Os animais foram pesados e tiveram sua urina coletada no dia da injeção (1) e nos dias 4, 7, 10, 14, 21 e 28 após a injeção. Nos dias 3, 6, 10, 14 e 21 após a injeção de ADM, os animais dos subgrupos ST e ADM+ST receberam a dose de 2 mg/kg de Stattic por via IV na veia caudal. No 28º dia após a indução da nefropatia, foi realizada a eutanásia e coleta dos materiais.

3.3.1 Eutanásia e coleta dos tecidos

A eutanásia dos animais ocorreu mediante anestesia dissociativa prévia com solução de xilasina e cetamina (16 mg/kg e 150 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal seguida de deslocamento cervical.

O sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado e o plasma sanguíneo congelado. A urina foi coletada diretamente da bexiga urinária e congelada.

O rim esquerdo foi coletado, descapsulado e um corte longitudinal realizado a fim de dividi-lo em duas metades, as quais foram armazenadas em solução de formol

10% (v/v) por 48 horas. Depois deste tempo, os cortes foram lavados em água corrente por 12h e mantidos em álcool 70% (v/v) até o momento do emblocamento em parafina. O rim direito foi coletado, descapsulado e cortado transversalmente em pedaços que foram armazenados, durante a coleta, em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer -80°C.

Foram coletados, medidos e pesados ambos os músculos gastrocnêmios, bem como o sóleo direito. O 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 -80°C. O gastrocnêmio direito foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido e depois em freezer -80°C.

O músculo sóleo foi fixado em um corte de cortiça e mantido em solução de formol (10% v/v) durante três horas. Após essa etapa, este foi retirado e colocado em solução de ácido nítrico (30% v/v) durante 24h e na sequência, transferido para solução de glicerol 50% para posterior análise.

Foi coletado o fêmur direito. Para tanto, foi realizada a desarticulação coxofemoral e remoção de todo o tecido muscular aderido ao osso, com o auxílio de uma pinça histológica. O fêmur foi então, inicialmente fixado em etanol 70% (v/v), para preservar sua estrutura, durante 72h e depois transferido para o etanol absoluto, para desidratação, onde permaneceu até o momento do processamento.

3.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO

Os camundongos foram submetidos a um protocolo de exercício físico resistido, utilizando uma escada vertical de 110 cm de altura e 18 cm de largura, com degraus espaçados em 2 cm, conforme modelo descrito em Hornberger Jr.; Farrar, (2004). Uma caixa de 20x20x20cm, era mantida no topo para o repouso dos animais entre as escaladas.

Antes do início do protocolo, os animais passaram por um período de familiarização e adaptação, o qual foi sucedido pelos treinos que consistiram em séries de 20 escaladas com pesos anexados na parte proximal das caudas. Após cada subida, havia dois minutos de intervalo e a progressão da carga utilizada ocorreu mediante testes de carga máxima suportada (TCM) (GUO *et al.*, 2020). O protocolo

teve duração de 12 semanas, sendo aplicado nas segundas, quartas e sextas feiras pela manhã.

As cargas utilizadas nos treinos variaram de 40 a 60% da carga máxima obtida no último TCM, visando representar um treino de moderada intensidade, sendo o máximo de carga recomendado na realização de exercício resistido em situações de doenças crônicas (SANCHES *et al.*, 2013).

3.4.1 Período de 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 em três escaladas por dia, em três dias não consecutivos na semana, partindo de três diferentes pontos: 35 cm, 55 cm e 110 cm de distância do topo da escada, com 120 segundos de intervalo a cada escalada e sem a utilização de cargas anexadas ao animal (CASSILHAS *et al.*, 2013).

3.4.2 Teste de carga máxima (TCM)

O TCM consistiu em no máximo seis subidas ou até que o animal não conseguisse alcançar 90% da altura da escada. Foram realizados quatro TCMs, sendo estes: 1) logo após o término da semana de adaptação; 2) após 4 semanas de treinos; 3) após 8 semanas de treinos e 4) após 12 semanas de treinos.

A carga inicial do primeiro teste foi de 75% do peso do camundongo e, a cada subida concluída, cinco gramas de peso foram acrescentados de forma subsequente, havendo intervalo de dois minutos entre cada subida (SHEN *et al.*, 2021). A carga inicial dos testes subsequentes foi de 75% da soma dos pesos totais suportados na última escalada alcançada no teste anterior.

3.5 MENSURAÇÃO DA PROTEINÚRIA

A proteinúria foi mensurada a partir da razão entre a albuminúria e a creatininúria.

3.5.1 Mensuração da albuminúria

A dosagem da albuminúria foi realizada por eletroforese 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 corridas foram realizadas em sistema vertical, com voltagem constante de 60V para o gel de empacotamento, e 110V a partir do momento em que as amostras adentravam o gel de separação.

Para a realização da quantificação, as amostras de urina foram diluídas a uma concentração de 10% e foi adicionado o agente redutor de pontes dissulfeto β -mercaptoetanol junto a amostra, resultando em uma solução final de 50% (v/v) de amostra diluída e 50% (v/v) de β -mercaptoetanol.

Após a separação, os géis foram corados com Azul de Comassie. O excesso de corante foi removido com solução descorante a base de ácido acético e metanol e por fim, foi feita a quantificação da albuminúria no fotodocumentador Amersham Imager 600 GE®.

3.5.2 Mensuração da creatininúria

A dosagem de creatinina urinária foi realizada pelo método de Jaffe modificado, com o kit da marca Labtest Diagnóstica (Ref.: 35, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), que apresenta um índice de correção para minimizar interferentes. As análises se deram seguindo o determinado pelo protocolo fornecido pelo fabricante do produto.

O método utilizado consiste na formação de um complexo, com variação de cor, quando a creatinina presente na amostra reage com o ácido pícrico, em meio alcalino. Para a dosagem foi necessário diluir a urina a 4%. A reação foi quantificada no leitor de placas Tecan® Infinite M200 por fotometria no comprimento de onda de 520 nm.

3.6 MENSURAÇÃO DA CREATININA, UREIA E FOSFATO SÉRICO

A dosagem da creatinina, ureia e fosfato sérico foram realizados através de kit para a realização do ensaio colorimétrico da marca Labtest Diagnóstica (Ref.: 35,

27 e 12, respectivamente; Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As análises se deram seguindo o determinado pelo protocolo fornecido pelo fabricante do produto.

3.7 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS DO TECIDO MUSCULAR

3.7.1 Secção e preparação de lâminas histológicas

Os músculos gastrocnêmios esquerdos que estavam armazenados a -80°C foram transferidos para criostato a -20°C e fixados com o composto Tissue-Tek® O.C.T às platinas.

Após a fixação, a região mediana dos músculos foi seccionada transversalmente na espessura de $10\mu\text{m}$ e as lâminas histológicas foram preparadas contendo três secções transversais do tecido muscular, as quais foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para adesão do tecido e depois armazenadas a -20°C até o momento do ensaio ou coloração do tecido.

As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (HE), bem como, pelas técnicas de NADH-TR e Sudan black. Depois de prontas, as lâminas foram fotodocumentadas em aumentos de 100 e 400 vezes com auxílio de microscópio (Carl Zeiss™ Primo Star™) com câmera acoplada (Carl Zeiss™ AxioCam ERc 5s) no programa ZEN 3.1 (Carl Zeiss™), e analisadas pelo software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

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

As análises histomorfométricas foram realizadas após a coloração por HE (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) a fim de quantificar o número de fibras musculares, núcleos periféricos e centrais. Para tanto, foram mensurados os diâmetros maior e menor das fibras musculares e a da área total do campo que compreendia fibras musculares completas, sendo desconsideradas as fibras que apareciam apenas parcialmente no campo.

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

A partir das análises histomorfométricas das fibras foi calculada a densidade de fibras (mm^2) (Densidade = n° de fibras/área mensurada) e a partir da análise de núcleos foram calculadas a razão de núcleos por fibra (núcleos/fibra = n° núcleos totais/ n° de fibras).

3.7.3 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).

As lâminas foram coradas e montadas com gelatina incolor e posteriormente fotografadas. Foram analisadas 12 imagens de cada lâmina e a quantificação se deu pela intensidade de coloração.

3.8 CONTAGEM DE SARCÔMEROS EM SÉRIE

Para a contagem dos sarcômeros em série, foram isolados do ventre de cada músculo sóleo um total de dez fibras musculares, as quais foram separadas com o auxílio de pinças ultrafinas e lupa, sendo estas posteriormente fixadas em lâmina histológica por meio de esmalte incolor.

A contagem de sarcômeros se deu ao longo de $300 \mu\text{m}$ de cada fibra muscular, em um total de cinco fibras por animal, a partir do microscópio óptico Axio Lab A1 ZEISS (fornecido pelo Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência – CTAF – da UFPR) em aumento de 1000x. Foram fotografados três campos aleatórios de cada uma das cinco fibras e a contagem de sarcômeros ocorreu utilizando o programa Image J (Figura 10). Para a obtenção da quantidade de sarcômeros totais por fibra, somou-se o valor obtido nos três campos analisados em cada fibra.

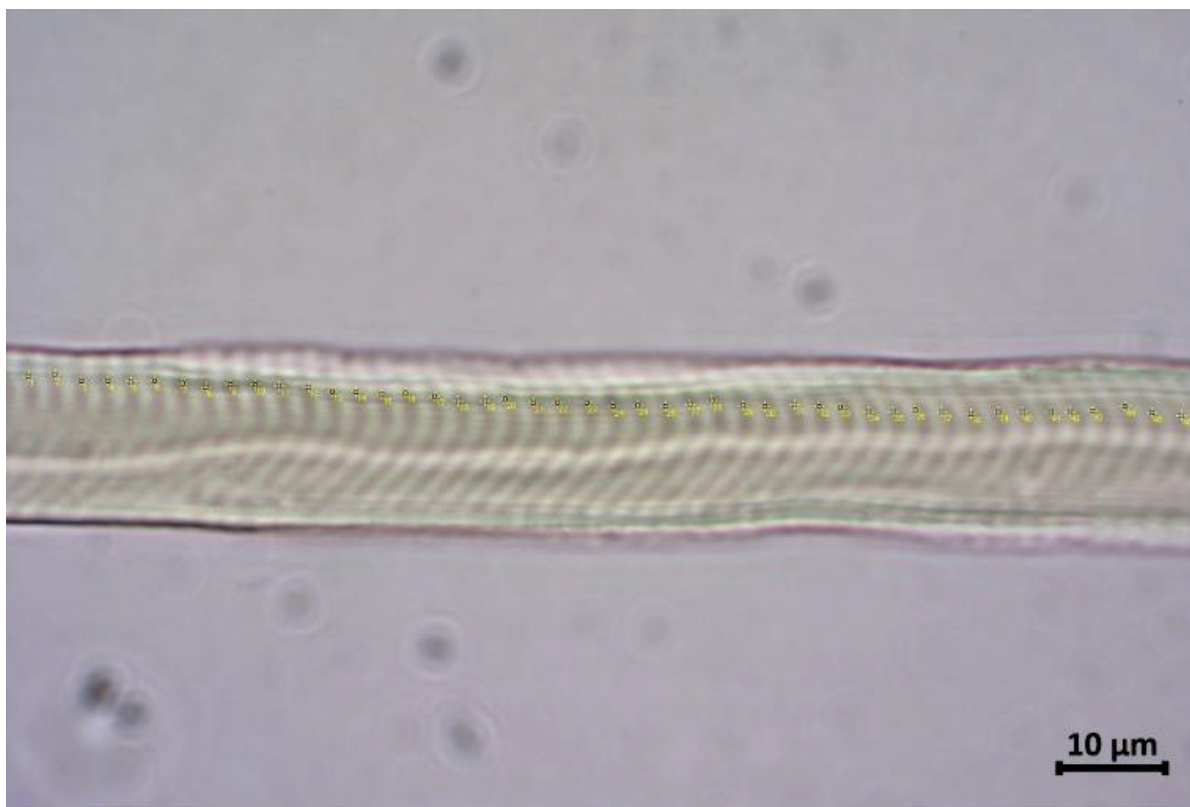


Figura 10: **Contagem de sarcômeros em série.** A contagem foi realizada no programa Image J em campo claro e aumento de 1000x em microscópio óptico Axio Lab A1 ZEISS (CTAF- UFPR).

3.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL

Os rins esquerdos que estavam armazenados em álcool 70% (v/v), foram emblocados em parafina para posterior corte e montagem das lâminas.

Para a coloração das lâminas foi utilizado o Tricrômico de Masson, o qual possibilita uma visualização de diferentes estruturas, como: núcleos em preto; citoplasma, queratina e fibras intercelulares em vermelho e colágeno e muco em azul. Dessa forma, essa coloração é considerada especial para análise da matriz extracelular e a avaliação do grau de fibrose intersticial (BÜLOW; BOOR, 2019).

Foram preparadas e coradas uma lâmina para cada subgrupo, contendo um corte de rim de cada animal, em um total de cinco animais por subgrupo.

Para a análise, foram capturados 20 campos aleatórios em microscópio Axio Lab A1 ZEISS (CTAF-UFPR) em aumento de 400x, de cada corte histológico do córtex renal, que posteriormente foram analisadas.

Para mensuração da fibrose renal, foram avaliados a espessura da membrana basal e expansão da matriz celular com colapso e distorção. A análise foi realizada a partir da pontuação semiquantitativa de cada campo observado: zero, refere-se a nenhuma alteração; de 1 a 9% na presença de alterações leves; de 10 a 50% quando apresentaram alterações moderadas; acima de 50% quando dispuseram de intensas alterações.

3.10 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO TECIDO ÓSSEO

Para análise histomorfométrica do tecido ósseo, as amostras que estavam em álcool absoluto foram transferidas para frasco contendo xilol, onde permaneceram por 24h, de modo a remover o conteúdo lipídico presente nos ossos.

Para auxiliar na impregnação do produto utilizado no emblocamento da amostra, foi realizado um corte com bisturi próximo a área de análise desejada (Figura 11).



Figura 11: **Corte realizado com lamina de bisturi.** O corte é realizado próximo a área que será analisada de modo que o metacrilato possa impregnar melhor na parte interna do osso.

Após o corte, as amostras passaram por uma bateria de três soluções, onde permaneceram um período de 5 a 7 dias em cada uma. A sequência das soluções e suas respectivas concentrações estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Soluções utilizadas no emblocamento das amostras de tecido ósseo.

Nome da solução	Composição
Solução A	25% de diisobutilftalato ($C_6H_{22}O_4$, Merck® nº 814157) e 75% de metacrilato de metila (CHO, Merck® nº 800590)
Solução 1%	25% de diisobutilftalato, 75% de metilmetacrilato e 1% de peróxido de benzoíla ($C_4H_{10}O_4$: Sigma Aldrich® cat no. 85907)
Solução 2%	25% de diisobutilftalato, 75% de metilmetacrilato e 2% de peróxido de benzoíla

A solução 'A' tem a função crucial de atuar como agente de transição, removendo o xilol e preparando a amostra para a impregnação com resina, garantindo assim, a penetração completa da resina nos espaços intercelulares e assegurando uma inclusão adequada para preservação da estrutura da amostra para análise posterior.

Após passarem pelas soluções, foi realizado a inclusão das amostras em uma "pré-base". Para tanto, estas foram colocadas em frascos de 20 mL com tampa, contendo cerca de 5 mL da solução 2% já polimerizada. O material é adicionado a "pré-base" e em seguida é adicionado mais solução 2% até que a amostra seja totalmente coberta. Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C durante 48h para secagem do bloco (Figura 12).

Depois de secos, os frascos foram quebrados para remoção dos blocos, os quais foram lixados para então, passarem pela microtomia e montagem das lâminas.

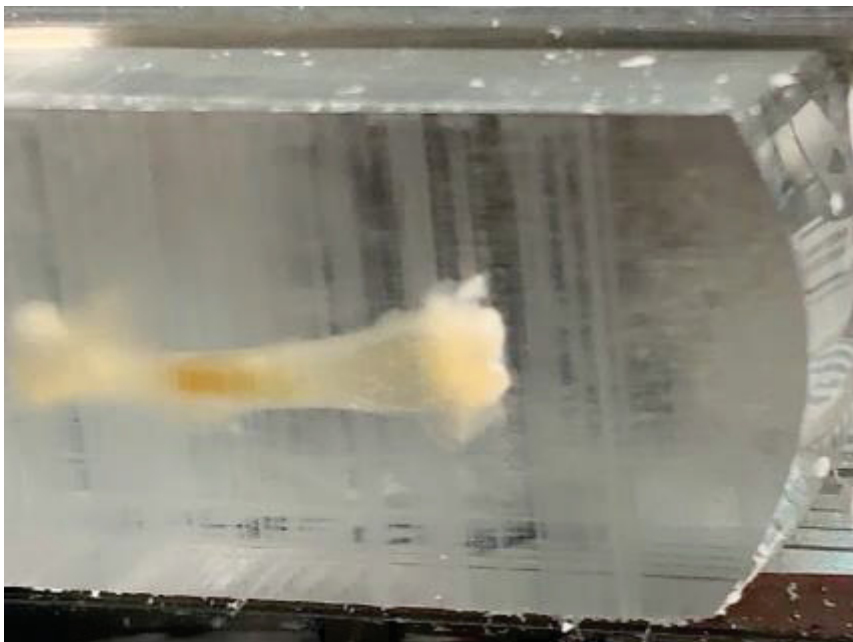


Figura 12: Fêmur de camundongo em bloco de metacrilato.

Para montagem das lâminas, foram realizados cortes de 5 μm em micrótomo, os quais foram colocados em lâminas gelatinizadas (gelatina a 1%) e corados com azul de toluidina. Depois de coradas, as lâminas foram analisadas com o uso do software OsteoMeasure®, sendo avaliado os seguintes parâmetros: razão do volume ósseo pelo volume total, superfície de osteóide, espessura de osteóide, espessura da trabécula, espaço entre as trabéculas e o número de trabéculas.

3.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Os rins e os músculos gastrocnêmios que foram coletados para PCR em tempo real (qPCR) foram armazenados durante a coleta em nitrogênio líquido e depois guardados a uma temperatura de -80°C até a realização do procedimento. O RNA total foi extraído utilizando PureZOL® (Bio Rad, Califórnia, USA). Após a extração, o RNA total foi purificado e sua concentração determinada através do espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Inc., DE, EUA) a 260 nm.

Cada amostra de RNA total teve sua integridade conferida através de eletroforese em gel de 1% de agarose e após isso, foram armazenadas novamente para, posteriormente, serem utilizadas na preparação do cDNA e na análise dos marcadores escolhidos.

O cDNA foi sintetizado a partir da enzima transcriptase reversa da marca Bio-Rad® (Bio Rad, Califórnia, USA) e a qPCR foi realizada utilizando SYBR Green® (Bio Rad, Califórnia, USA) para quantificar o RNA mensageiro dos genes codificantes de STAT-3, IL-6, nefrina e SOCS-3, no tecido renal, bem como os genes STAT-3, MuRF-1, MyoD e miogenina, no tecido muscular.

Como normalizador foi utilizado o mRNA do gene ACTB e os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa de acordo com a fórmula $10,000/2^{\Delta Ct}$. Os primers foram sintetizados baseando-se na sequência conhecida de bases nitrogenadas descritas no GenBank, e o programa Primer Express da Applied Biosystems. As sequências dos primers utilizados estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Sequência de primers utilizados na realização da qPCR

Gene	Sequência sense	Sequência anti-sense
ACTB	TCTGTATTCCCCTCCATCGTC	GGGTCAGGATACCTCTCTTGC
STAT3	TGAAGGTGGTGGAGAACCTC	GCTGCTGCATCTTCTGTCTG
IL-6	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC
SOCS3	ATGGTCACCCACAGCAAGTTT	TCCAGTAGAATCCGCTCTCCT
NPHS1	ACCTGTATGACGAGGTGGAGAG	TCGTGAAGAGTCTCACACACCAG
Trim63	GTGTGAGGTGCCTACTTGCTC	TGAGAGATGATCGTCTGCACT
Myogenin	ACAGCATCACGGTGGAGGATATGT	CCCTGCTACAGAAGTGATGGCTTT
MyoD	ACGACTGCTTTCTTCACCACTCCT	TCGTCTTAACTTTCTGCCACTCCG

3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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 DISCUSSÃO

4.1 ALBUMINÚRIA

A proteinúria, em especial a albuminúria, é um dos principais sinais encontrados no modelo de nefropatia induzido por ADM (Chen *et al.*, 1995). Vários trabalhos já observaram proteinúria significativa em animais tratados com ADM na dose de 10 mg/kg (Okuda *et al.*, 1986; R. L. Pereira *et al.*, 2012) sendo que a perda de proteínas na urina se deve às alterações sofridas na barreira de filtração glomerular, bem como aos danos oxidativos nos podócitos ocasionados pela ADM (LEE & HARRIS, 2011), a qual induz lesão renal em roedores semelhante àquelas descritas em pacientes com glomeruloesclerose segmentar e focal (W. de F. Pereira *et al.*, 2015).

Segundo Scarfe *et al.*, (2015), a nefropatia induzida por ADM apresenta duas fases, sendo que na primeira os glomérulos estão histologicamente intactos, mas com a sua capacidade de atuar como barreira macromolecular gravemente comprometida, resultando na proteinúria intensa observada nos primeiros dias após a injeção de ADM. Em contrapartida, a segunda fase é marcada pela fibrose, a qual leva à perda da superfície de filtração total, diminuindo a TFG.

O aumento acentuado da albuminúria nos dias iniciais, foi observado por Wang *et al* (2000), em um trabalho que comparou o modelo de nefropatia induzido por ADM em duas linhagens de camundongos, dentre elas, a mesma utilizada no presente estudo (BALB/c). Os autores utilizaram uma dose única de 10,5 mg/kg de adriamicina e observaram que os animais desenvolveram proteinúria significativamente alta na primeira semana após a injeção da droga, seguida de uma leve queda nas semanas consecutivas.

Corroborando com os achados dos trabalhos anteriormente citados, a análise da urina para detecção da albuminúria e creatininúria em razão da lesão renal presente nos animais sedentários dos grupos que receberam a ADM indicou um aumento significativo da razão albuminúria/creatininúria em todos os pontos

analisados, em relação aos animais que não foram tratados com a droga, como observado na figura 13.

No entanto, devido ao pico da proteinúria ser nos dias iniciais, o intervalo de 7 dias após a injeção da ADM tem especial relevância. Na figura 13E, observa-se que, ao contrário dos animais sedentários (13A), aqueles submetidos ao protocolo de EFR, não tiveram aumento da albuminúria, demonstrando assim, que o EFR atua de modo a minimizar os efeitos nefrotóxicos da ADM, diminuindo a proteinúria. Este resultado também foi observado no intervalo de 21 dias após a injeção da droga.

Não foram observadas diferenças significativas na razão albuminúria/creatininúria entre os grupos ADM e ADM+ST, independente da realização do EFR, revelando assim, que a inibição da via STAT-3 não interferiu na proteinúria característica do modelo.

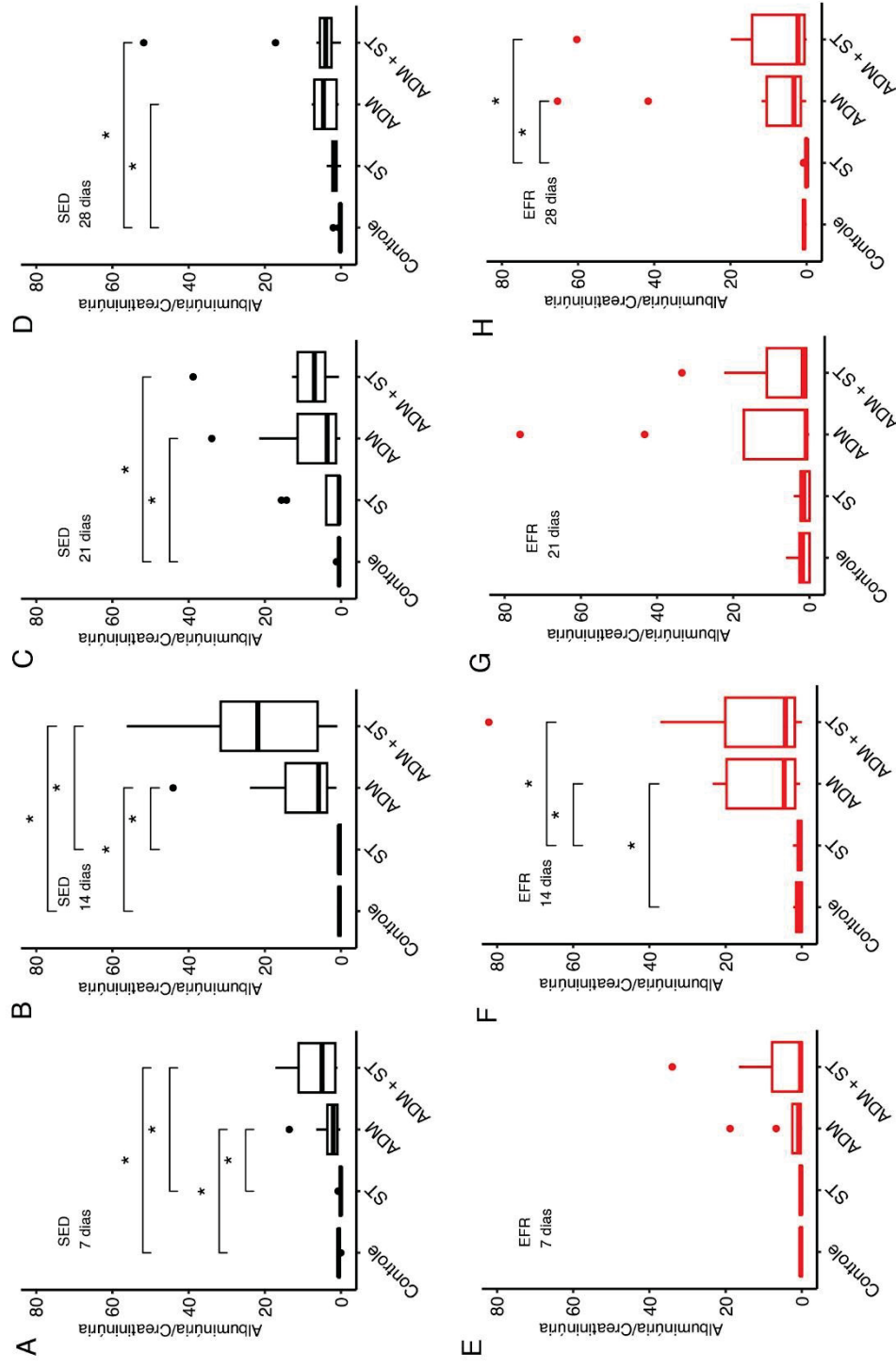


Figura 13: **O EFR protege contra a proteinúria causada pela injeção de ADM.** A: Os animais sedentários que receberam a ADM tiveram aumento significativo da proteinúria 7 dias após a injeção da droga, em relação aqueles que não receberam o tratamento. E: em contraste, os animais do grupo EFR não tiveram diferenças significativas observadas. B e F 14: dias após a injeção de ADM, ambos os grupos tiveram aumento da proteinúria em relação aos animais que não receberam a droga. C: em 21 dias após a injeção de ADM, assim como observado em 7 dias, os animais sedentários que receberam ADM apresentaram proteinúria significativa em relação aos grupos controle, enquanto que os animais submetidos ao protocolo de treinos não tiveram o mesmo aumento (G). D e H: em 28 dias após a injeção de ADM, ambos os grupos apresentaram aumento da proteinúria nos animais com a nefropatia em relação aos controles.

4.2 PESO CORPORAL

Além da proteinúria, outra resposta comumente descrita no modelo experimental de nefropatia por ADM é a perda de peso corporal dos animais nos dias seguintes à administração da droga. Esta resposta, em conjunto com proteinúria elevada, indicam o grau de desenvolvimento da lesão renal (WANG *et al.*, 2015).

Os animais submetidos ao modelo de nefropatia induzida por ADM tendem a ficar debilitados e caquéticos o que é caracterizado pela diminuição da massa corporal.

Os resultados de peso corporal dos animais dos diferentes grupos ao longo dos experimentos estão demonstrados na figura 14. Para uma melhor verificação da diferença entre os grupos e protocolos de modo total, foi realizado o cálculo de área sob a curva (AUC) (Figura 15).

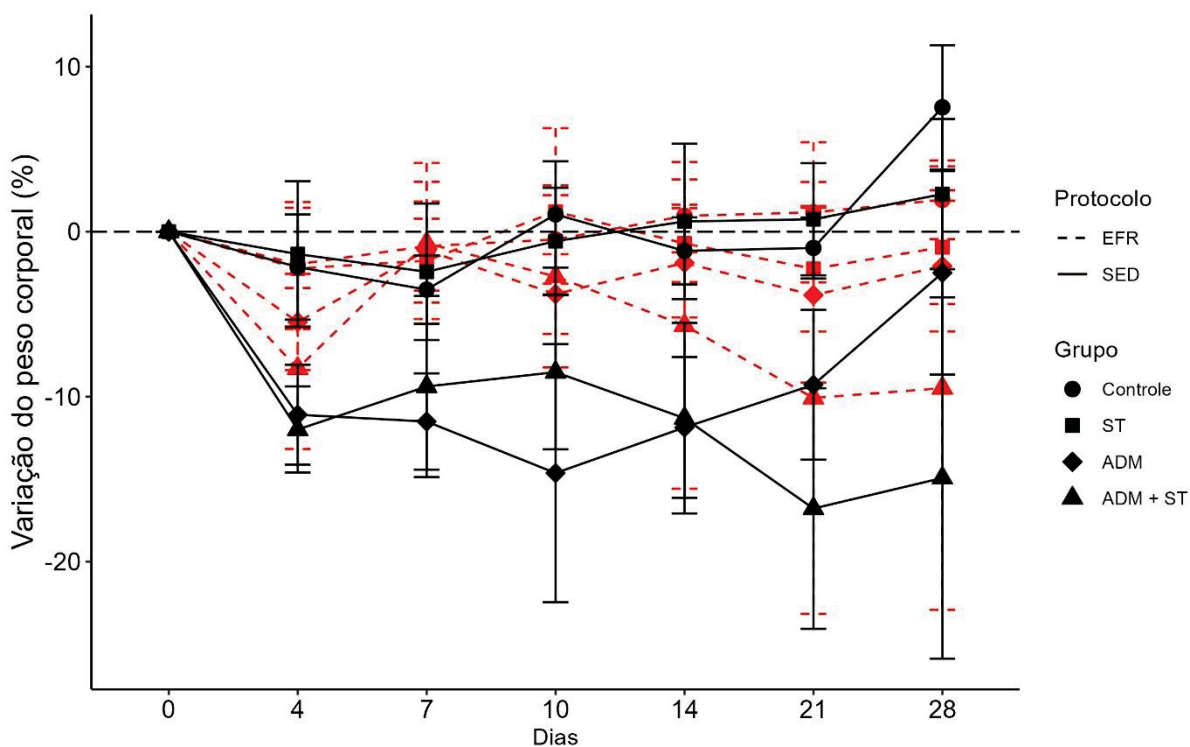


Figura 14: Variação do peso corporal dos animais ao longo dos protocolos.

A análise dos resultados da variação dos pesos corporais dos animais ao longo do experimento demonstrou que aqueles que receberam ADM, independentemente da realização do EFR, tiveram uma perda de peso significativa em relação aos seus respectivos grupos controles. Entretanto, ao comparar os pesos dos animais cuja nefropatia foi induzida pela droga (grupos ADM e ADM+ST), é possível observar que os que realizaram o protocolo de treinos perderam menos peso do que os animais sedentários.

Desta maneira, percebe-se que o exercício físico é capaz de proteger os animais da perda de peso característica do modelo de nefropatia induzido pela ADM o que resulta em uma menor debilidade.

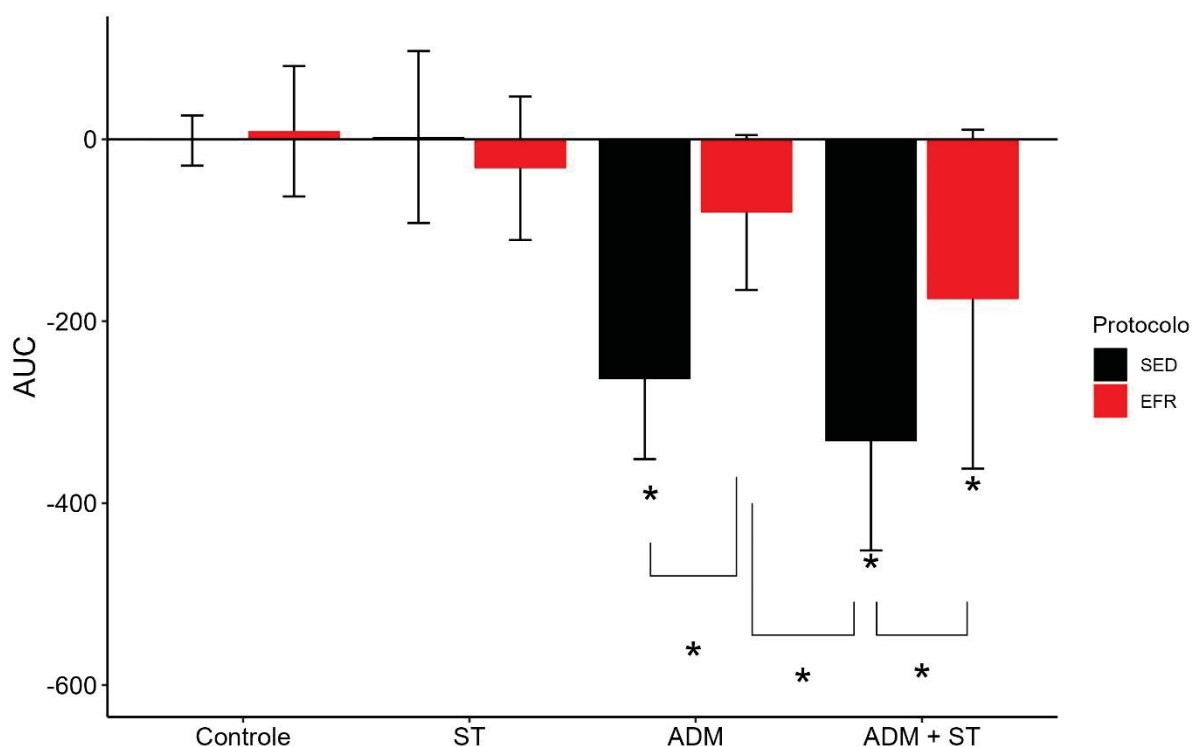


Figura 15: **Área abaixo da curva.** O gráfico da AUC demonstra que os animais sedentários que receberam a ADM, tiveram perda de peso significativa ao longo do protocolo em relação aos que realizaram o EFR. * $p < 0.05$ vs controle.

Ao comparar apenas os grupos que receberam ADM (Figura 16) observa-se que o grupo ADM+ST sedentário apresentou variação negativa do peso corporal em todos os pontos de mensuração, enquanto o grupo ADM sedentário teve redução do

peso corporal apenas durante o intervalo do dia 4 ao dia 14. Em contrapartida, os grupos ADM e ADM+ST EFR não apresentaram variação significativa do peso corporal em nenhum ponto de análise.

Tais resultados demonstram que a inibição da via STAT-3 na ausência de atividade física resulta em aumento da perda de peso acarretada pela ADM, sendo que a realização da atividade física é capaz de reverter esse quadro.

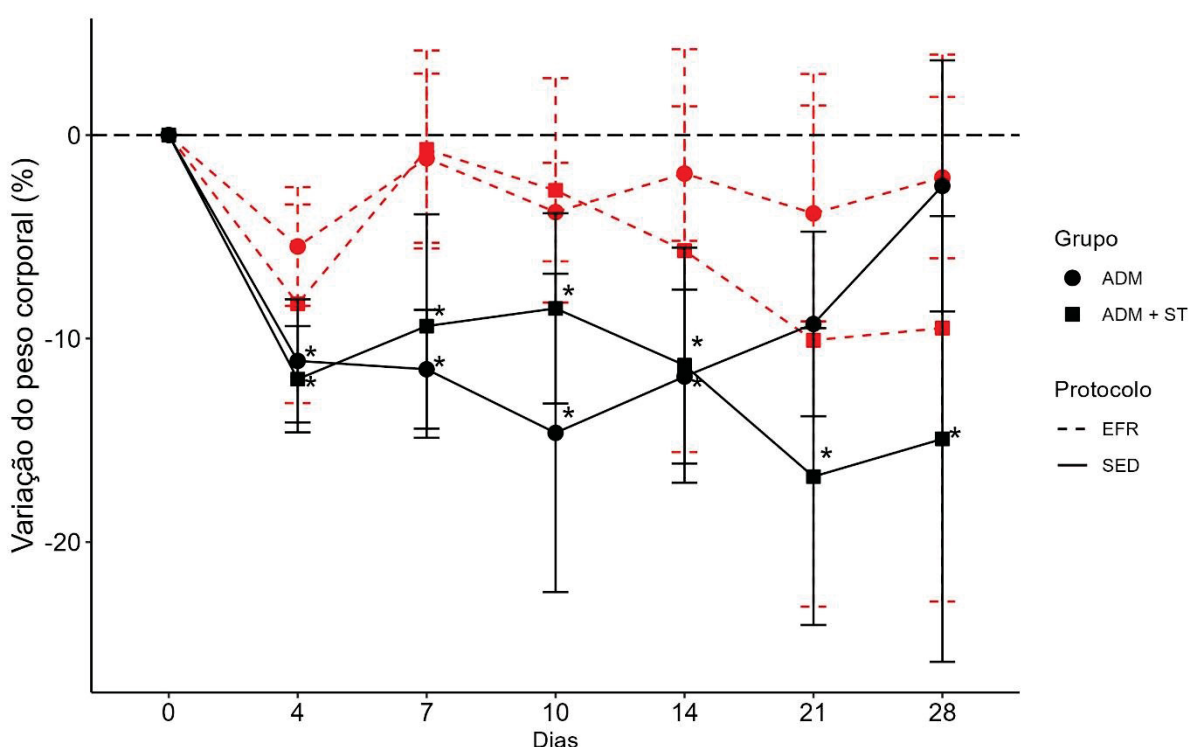


Figura 16: A inibição da via STAT-3 na ausência de atividade física resulta em aumento da perda de peso acarretada pela ADM. A variação de peso dos grupos ADM e ADM+ST ao longo dos dias demonstra que os animais submetidos ao protocolo de EFR tiveram a perda de peso característica do modelo reduzida em relação aos sedentários. Protocolos EFR (Preto, pontilhado) e SED (vermelho, contínuo). * $p < 0.05$ vs Dia 0.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.3.1 Creatinina sérica

A creatinina sérica é o biomarcador de função renal mais comumente utilizado para estimar a taxa de filtração glomerular, sendo importante no estudo da epidemiologia da doença renal crônica (KASHANI *et al.*, 2020).

Neste trabalho, a creatinina sérica foi quantificada a partir do sangue coletado por punção cardíaca no momento da eutanásia, no 28º dia após a injeção de ADM e sua dosagem se deu a partir de teste comercial.

Embora alguns trabalhos apontem que o modelo de nefropatia induzida por ADM leva ao aumento da creatinina sérica, em nosso trabalho, tal elevação não foi observada nos animais tratados com o quimioterápico (Figura 17).

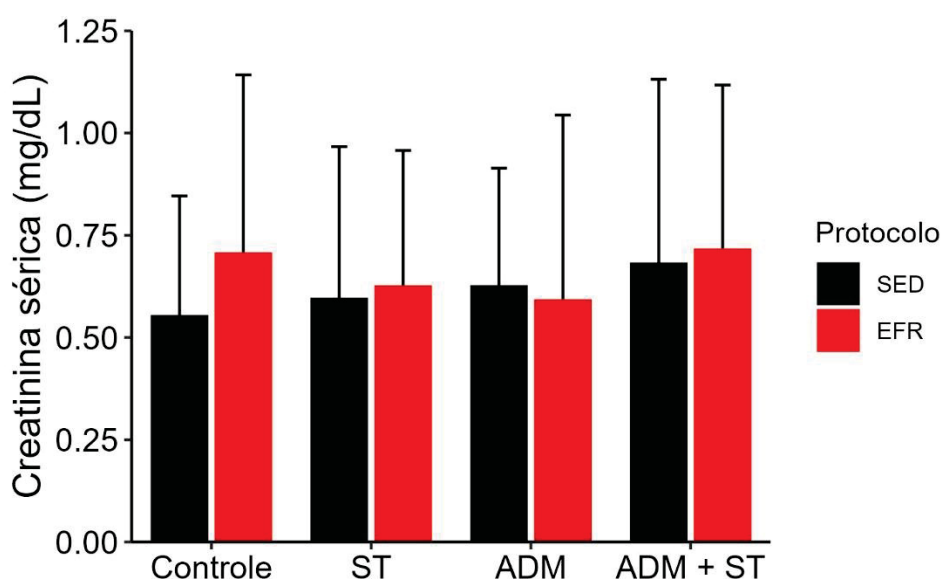


Figura 17: **Níveis de creatinina sérica.** Não houve aumento significativo dos níveis de creatinina sérica nos grupos de animais estudados.

Nossos resultados corroboram com os achados de Bryant *et al.*, (2022) , o qual comparou o modelo de nefropatia induzida por ADM em duas sublinhagens de camundongos C57BL/6, sendo que os autores não observaram aumentos significativos da creatinina sérica em uma das sublinhagens de animais estudados. Em outros estudos com o mesmo modelo, como o realizado por Lee *et al.*, (2006) , foi constatado aumento dos níveis séricos de creatinina apenas a partir da quarta semana após a injeção da droga.

4.3.2 Ureia sérica

Assim como a creatinina, a ureia sérica foi também quantificada a partir do sangue coletado por punção cardíaca no momento da eutanásia, no 28º dia após a injeção de ADM e sua dosagem se deu a partir de teste comercial. Os níveis séricos de ureia também não tiveram variações significativas, como demonstrado na figura 18.

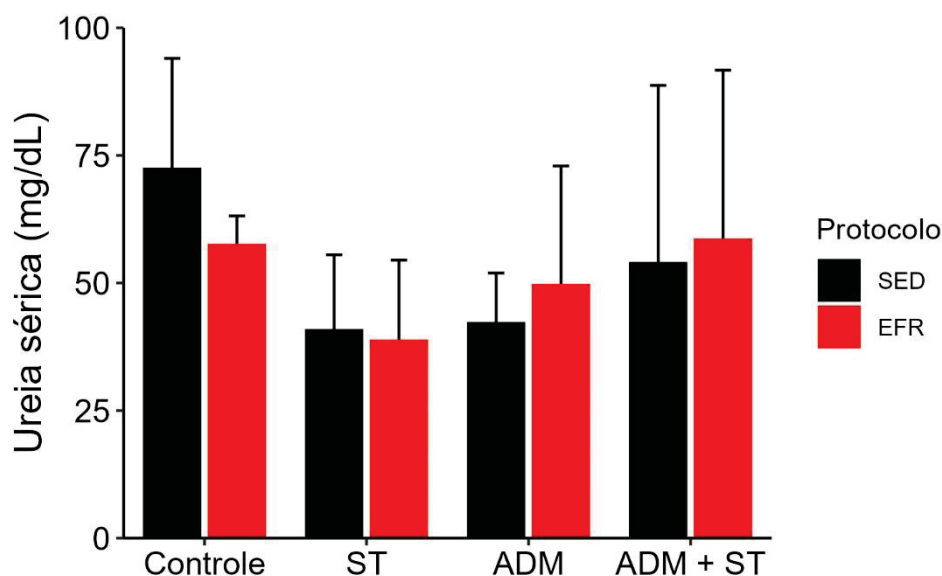


Figura 18: **Níveis de ureia sérica.** Não houve aumento significativos nos níveis de ureia sérica nos grupos de animais estudados.

4.3.3 Fosfato sérico e urinário

Para quantificação do fosfato sérico e urinário, foram coletados sangue e urina no 28º dia após a injeção de ADM. A análise foi realizada por kit comercial e não foram observadas diferenças significativas, como demonstrado na figura 19.

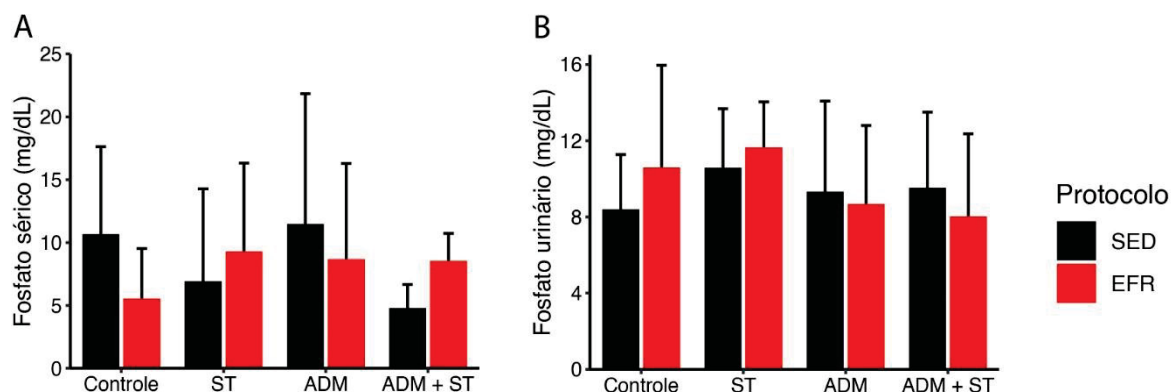


Figura 19: **Níveis de fosfato.** Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de fosfato urinário (A) e sérico (B) nos grupos de animais estudados.

4.4 TESTE DE CARGA MÁXIMA

O TCM foi realizado a fim de determinar a progressão das cargas utilizadas nos treinos, bem como na avaliação da evolução da força dos animais durante e após a realização do protocolo de exercícios. Dessa forma, após cada TCM, os animais foram submetidos aos treinos contendo progressão de cargas, as quais variaram entre 40 e 60% dos valores obtidos no último teste (SANCHES *et al.*, 2013).

A partir da análise das cargas máximas toleradas pelos animais (Figura 20), é possível perceber que houve evolução na capacidade de carga máxima durante o protocolo, principalmente entre o primeiro e os demais testes. Os animais aumentaram sua capacidade de suporte de carga quando analisados independentemente dos grupos experimentais. O aumento de carga se deu, inclusive, no quarto teste, o qual foi realizado após a indução da nefropatia, demonstrando que, mesmo na presença da lesão renal, o EFR é capaz de proteger o animal da sarcopenia característica da DRC.

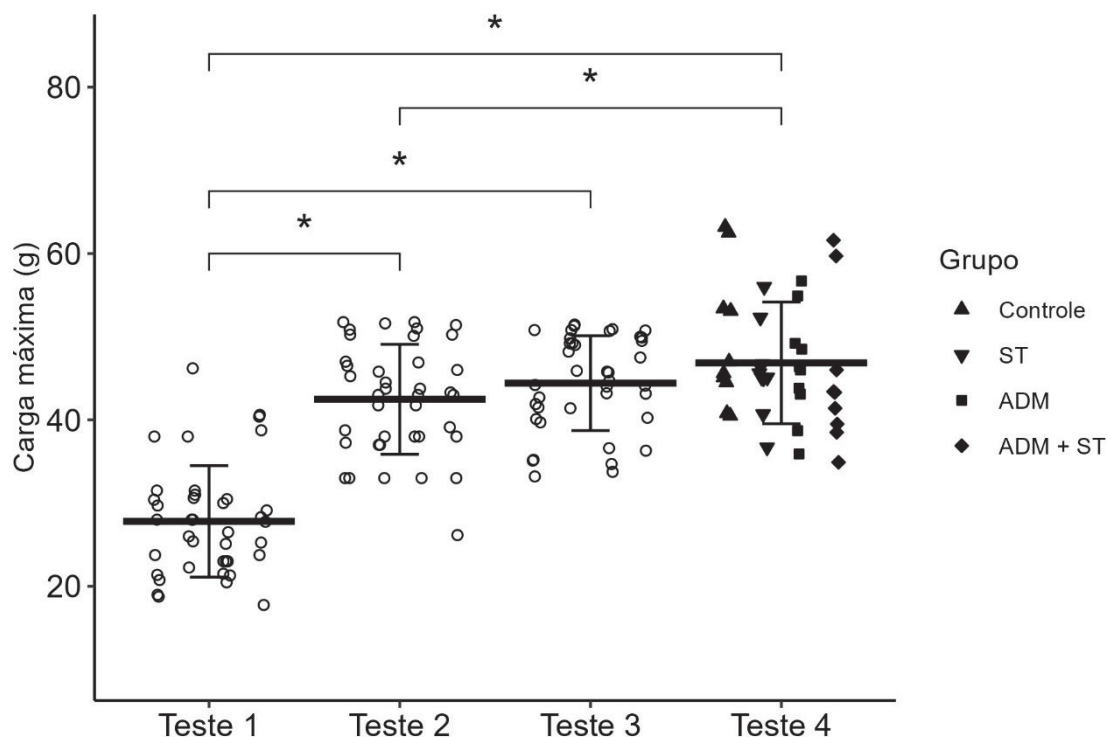


Figura 20: **O EFR levou ao aumento do suporte de carga máxima, mesmo sob a ação da ADM.** Valores de carga máxima suportada pelos animais submetidos ao protocolo de treinos. * $p < 0,05$.

Nossos resultados corroboram com os achados de Souza *et al.*, (2018), os quais, a partir de um estudo com ratos Wistar em modelo de experimental de DRC por nefrectomia (Nx) 5/6 e submetidos ao EFR, demonstraram que os animais que realizaram EF tiveram aumento significativamente maior de força muscular, em comparação ao grupo Nx sedentário.

Por outro lado, ao analisar os grupos experimentais isoladamente no teste 4, não é possível observar diferenças significativas entre eles. Assim, pode-se inferir que o tratamento com STATTIC e a inibição da via de sinalização STAT-3 não interfere no ganho de força muscular proporcionado pelo EFR.

4.5 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO SÓLEO

4.5.1 Peso muscular

A sarcopenia decorrente da idade ou secundária a doenças crônicas, assim como na DRC, é caracterizada por afetar diretamente a arquitetura muscular, ao reduzir a área de secção transversa, o comprimento dos fascículos musculares, volume e ângulo de penação do músculo e, por fim, resultar em redução da capacidade de força produzida por unidade muscular (BAPTISTA; VAZ, 2009; MCLEAN; KIEL, 2015). Desta maneira, a sarcopenia está envolvida na piora do prognóstico dos pacientes, levando à diminuição da sua qualidade de vida e sendo relacionada com o aumento da morbidade e mortalidade (LARSSON *et al.*, 2019).

A perda de massa muscular característica da sarcopenia se dá, principalmente, pelo desbalanço entre a síntese e degradação proteica, a qual tem sido relacionada aos níveis séricos elevados de IL-6 e TNF- α apresentados por estes pacientes e, por fim, por um possível aumento na ativação da via de sinalização STAT-3 (CARRERO *et al.*, 2008; MUÑOZ-CÁNOVES *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2022; CHATZIPETROU *et al.*, 2022).

O EF tem sido sugerido como tendo um importante papel na atenuação da perda muscular, auxiliando na renovação muscular e proteica, bem como na redução da inflamação (NOOR; REID; SLEE, 2021).

No entanto, ao analisar os resultados do peso do músculo sóleo (Figura 21), não foi observado diferenças significativas entre os grupos de estudos, indicando que este músculo não é afetado pela ação da ADM, bem como, não sofre alterações pela realização do EFR ou inibição da via de sinalização STAT-3. O comprimento do músculo sóleo também não foi alterado.

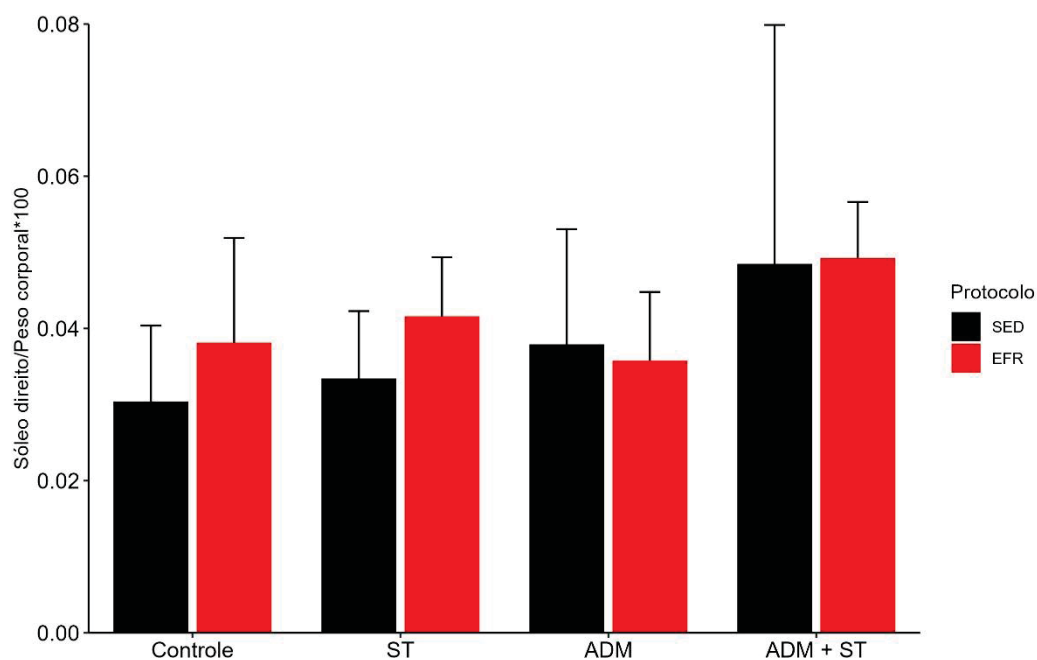


Figura 21: **Peso do músculo sóleo.** Não foram observadas diferenças significativas no peso corrigido do músculo sóleo nos grupos analisados.

4.5.2 Avaliação do número de sarcômeros em série

A análise dos resultados da contagem de sarcômeros em série no músculo sóleo não apontou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que realizaram o EFR e sedentários, bem como entre os subgrupos, como observado na figura 22.

Considerando que há uma relação direta entre a adição de sarcômeros em série e o aumento comprimento muscular (HINKS *et al.*, 2023), o fato de não ter sido observado aumento nesses parâmetros, indica que tanto o protocolo de treinos utilizado neste trabalho, quanto a inibição da via de sinalização STAT-3, não tem envolvimento com os mecanismos de hipertrofia por crescimento longitudinal.

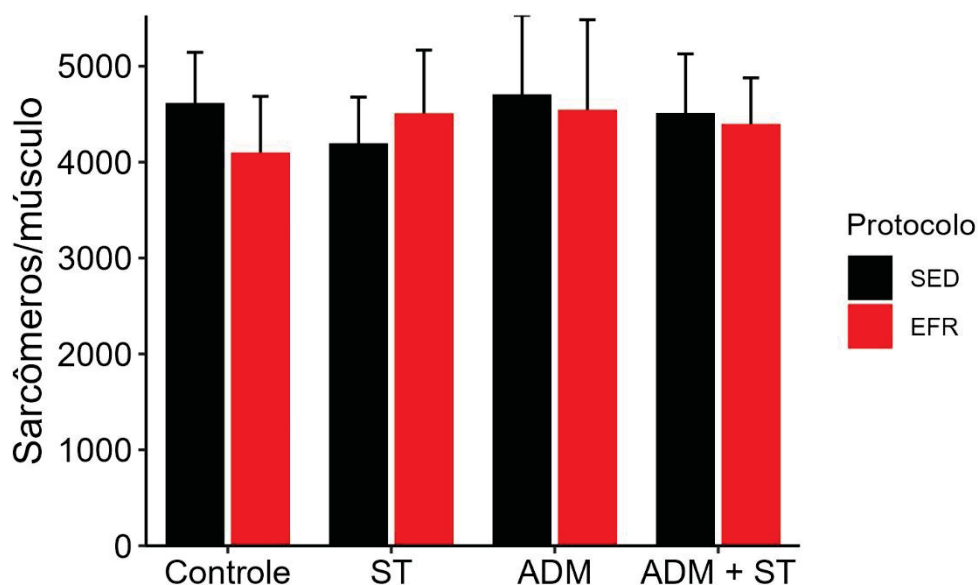


Figura 22: **A realização do protocolo de EFR e a inibição da via STAT-3 não causaram aumento do número de sarcômeros em série.** Não foram observadas diferenças significativas no número de sarcômeros em série do músculo sóleo

4.6 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS DO MÚSCULO GASTROCNÊMIO

Já foi demonstrado que a ADM interage diretamente com o músculo esquelético, causando danos estruturais e funcionais que levam à fraqueza muscular (HAYWARD *et al.*, 2013). Um dos mecanismos da citotoxicidade da ADM é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que levam ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial (GAYTAN *et al.*, 2023), um processo intimamente associado à ativação de vias de sinalização proteolítica (HIENSCH *et al.*, 2020). Outros mecanismos moleculares que parecem estar envolvidos na perda de músculo esquelético induzida pela ADM é a ativação da via do proteassoma dependente da ubiquitina e a autofagia (HIENSCH *et al.*, 2020).

A produção de ROS é o evento crucial para os efeitos deletérios da ADM sobre o tecido muscular. Em contrapartida, é amplamente documentado que o exercício físico crônico é capaz de melhorar a maquinaria antioxidante celular, contribuindo consequentemente para diminuir os marcadores de estresse oxidativo (KAVAZIS *et al.*, 2009; MARQUES-ALEIXO *et al.*, 2018). O EFR realizado antes da administração de ADM acarreta em um pré-condicionamento que tem sido relatado como estratégia

eficaz para neutralizar o aumento da produção de ROS induzido pelo quimioterápico (MARQUES-ALEIXO *et al.*, 2018) .

4.6.1 Peso do músculo gastrocnêmio

Os músculos gastrocnêmios dos animais foram coletados, pesados e o valor obtido foi corrigido pela massa corporal total. Os resultados obtidos indicaram que o exercício físico levou ao aumento da massa muscular, como demonstrado na figura 23.

A análise do gráfico aponta que os animais do grupo controle EFR apresentaram músculos significativamente mais pesados em relação ao grupo controle sedentário, indicando que o protocolo de treinos promoveu ganho de massa muscular.

Além da redução de peso corporal, estudos apontam a redução do peso de diferentes músculos em modelo animal em resposta a ADM. Em um estudo de meta-análise publicado por Hiensch *et al.*, (2020), por exemplo, foi observado uma redução de 14% do peso muscular associado à administração de ADM em ratos.

Em nosso trabalho, observamos que os animais que recebem adriamicina e realizaram o EFR apresentaram músculos significativamente mais pesados em comparação ao grupo de animais com a nefropatia, mas que não realizaram o protocolo de treinos. Sendo assim, é possível inferir que mesmo na presença da nefropatia, o EFR promoveu ganho de massa muscular, sendo capaz de mitigar os efeitos deletérios da ADM no tecido muscular.

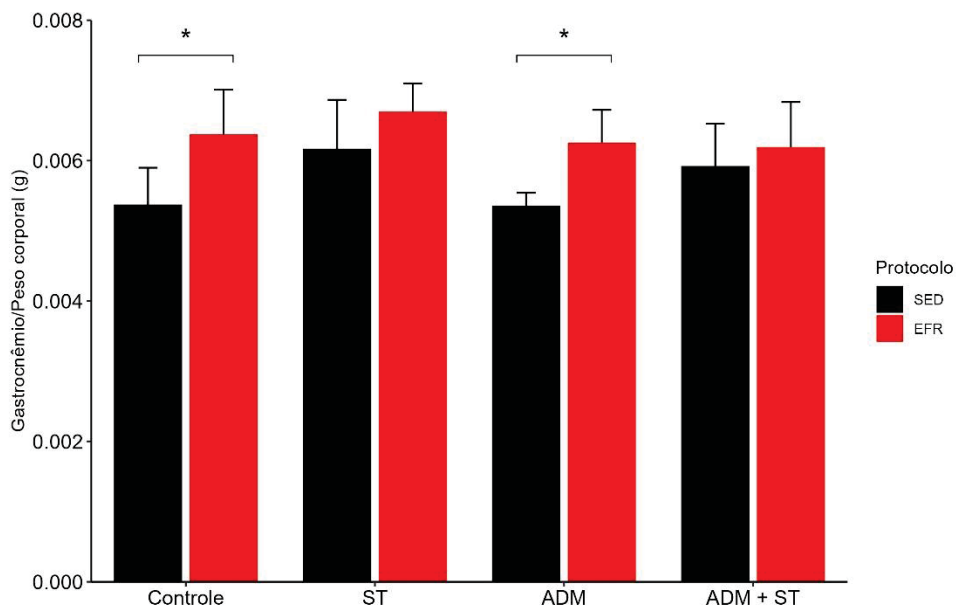


Figura 23: **O exercício físico de resistência protege contra os efeitos deletérios no tecido muscular causado pela ADM.** Os animais que receberam ADM e realizaram o EFR tiveram valores significativamente maiores de peso muscular em comparação aos seus pares sedentários, demonstrando que mesmo na presença da nefropatia, o EFR é capaz de manter a massa muscular.

4.6.2 Densidade de fibras musculares

Apesar dos animais que realizaram o exercício físico apresentarem maior peso do músculo gastrocnêmio, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no valor de densidade de fibras musculares ou valor maior e menor da fibra muscular, entre os grupos estudados, como observado na figura 24.

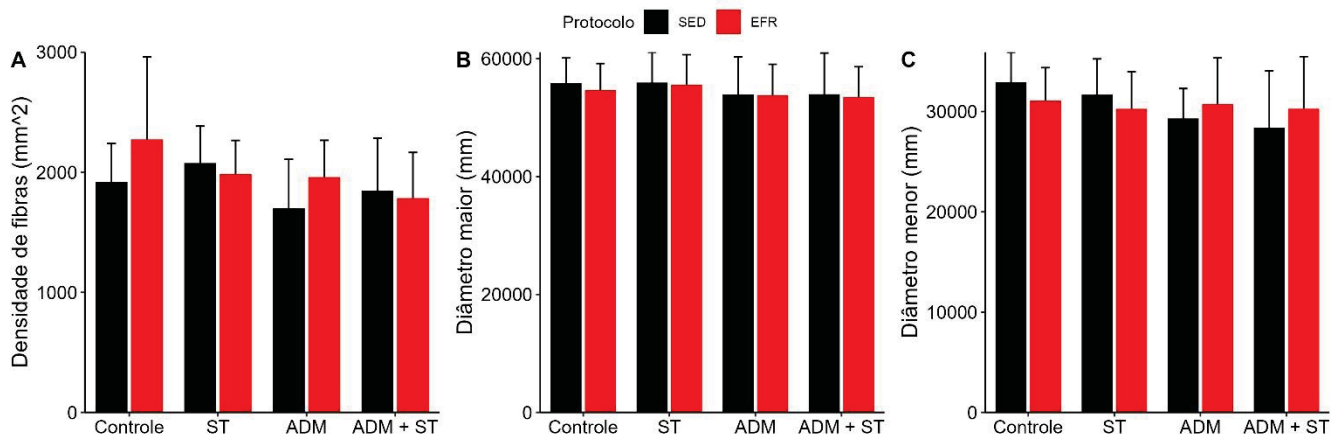


Figura 24: **Densidade de fibras musculares.** Não houve diferenças significativas na densidade de fibras musculares no músculo gastrocnêmio (A), bem como nos valores de diâmetro maior (B) e menor (C).

4.6.3 Tipos de fibras musculares

Os músculos esqueléticos são compostos de diferentes tipos de fibras, as quais são classificadas de acordo com as isoformas da cadeia pesada da miosina. Em mamíferos, as fibras musculares incluem isoformas da cadeia pesada da miosina do tipo I, tipo IIa e tipo IIb (GUO *et al.*, 2020).

As fibras do tipo I possuem velocidades de contração mais lentas e são relativamente resistentes à fadiga. As fibras do tipo IIa, ou fibras glicolíticas oxidativas rápidas, apresentam velocidades de contração mais altas que as fibras do tipo I, mas são menos resistentes à fadiga (PLOTKIN *et al.*, 2021), por fim, as fibras do tipo IIb são consideradas fibras glicolíticas de contração rápida.

Além disso, as fibras musculares são estruturas dinâmicas capazes de alterar seu fenótipo sob diversas condições, por exemplo, aumento ou diminuição da atividade neuromuscular, carga ou descarga mecânica, perfis hormonais alterados e envelhecimento (PETTE & STARON, 2000).

As fibras musculares dos animais dos grupos estudados foram classificadas em tipo I, IIa e IIb através da técnica histoenzimática de NADH-TR (Figura 25) e os resultados obtidos estão demonstrados na figura 26. A partir da análise do gráfico observa-se que a distribuição das fibras apresentou diferenças significativas em relação a realização do EFR e da administração das drogas.

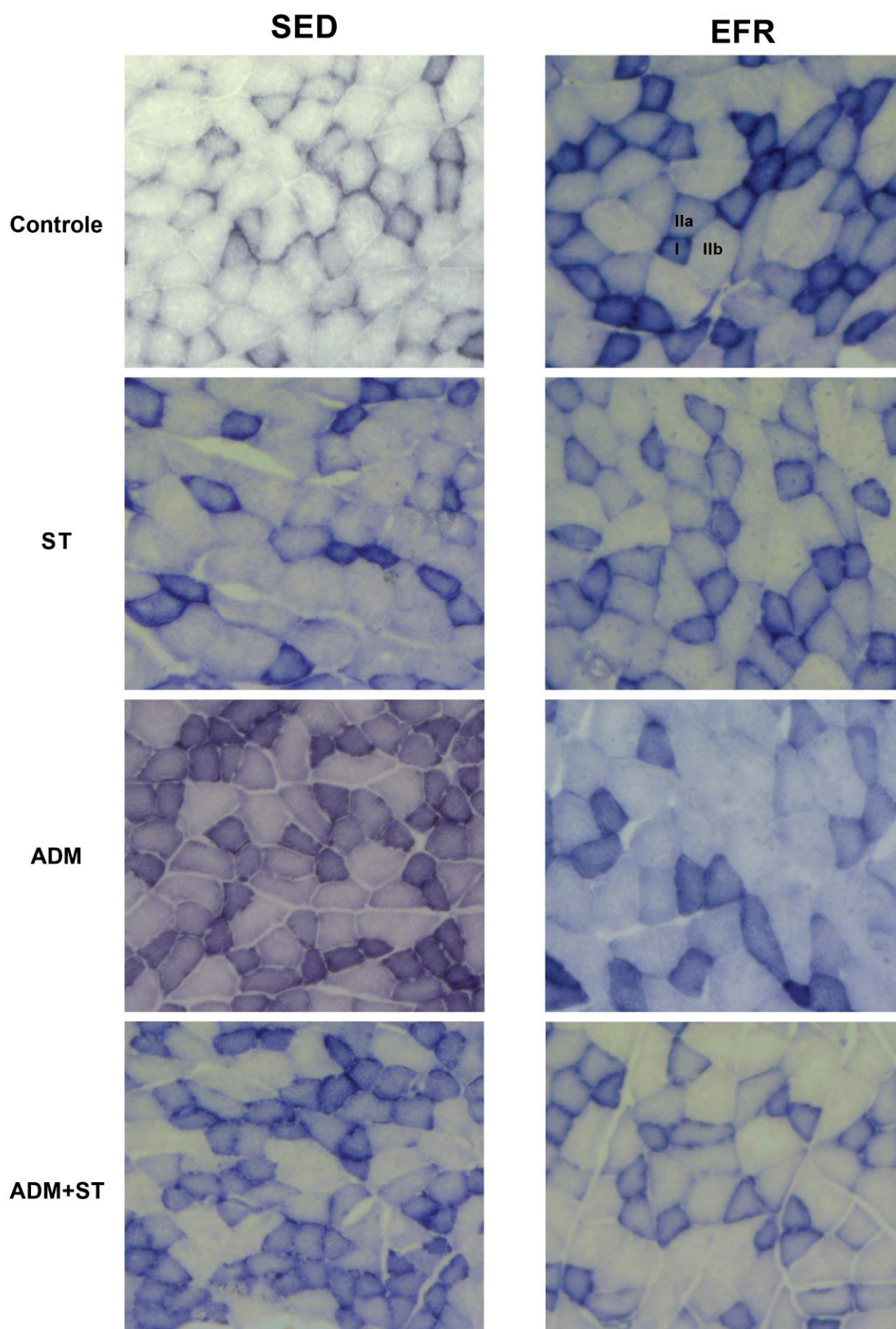


Figura 25: **Tipos de fibras musculares.** Músculo gastrocnêmio corado pela técnica de NADH-TR, com fibras do tipo I, tipo IIa e tipo IIb.

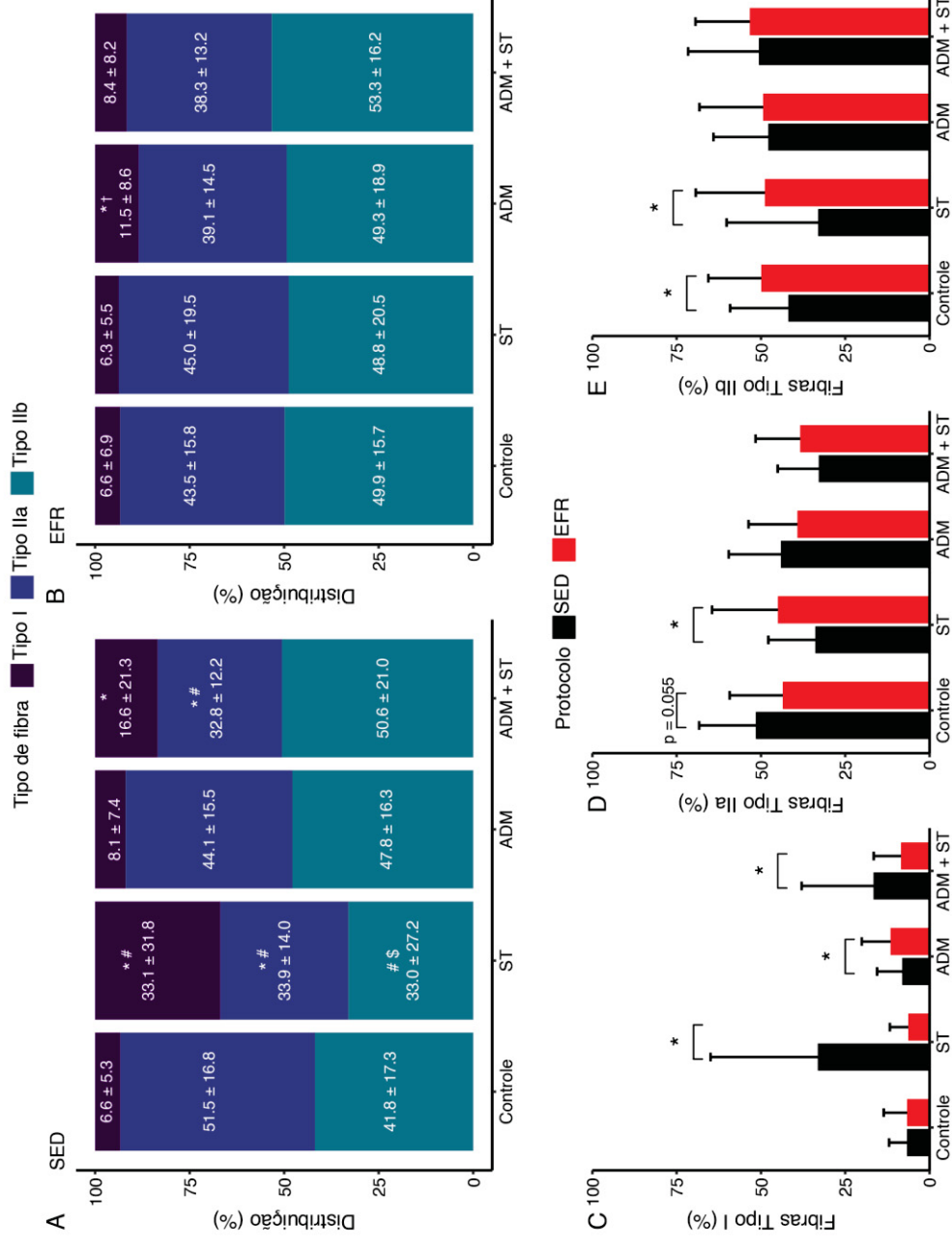


Figura 26: **A distribuição da população de fibras categorizadas em fibras dos tipos I, IIa e IIb apresentou alterações devido à administração de drogas e pelo protocolo de exercício.** (A) Distribuição das fibras dos animais SED e (B) distribuição das fibras dos animais EFR. Valores indicam percentual ± desvio padrão para cada população. * p < 0.05 vs controle; # p < 0.05 vs ADM; \$ p < 0.05 vs ADM + ST; † p < 0.05 vs ST. (C – E) Comparação entre as populações de fibras entre os dois protocolos. * p < 0.05.

Para os animais sedentários, as populações de fibras do tipo I e IIa sofreram alterações nos grupos ST e ADM+ST em comparação com o grupo controle, como observado na figura 26A. Estes animais apresentaram a porcentagem de fibras do tipo I significativamente mais alta do que o grupo que não recebeu as drogas, enquanto que a quantidade das fibras do tipo IIa, estava significativamente diminuída.

Em contrapartida, a observação da figura 26B, nos fornece a informação que no grupo EFR, houve diferença apenas na população de fibras do tipo I, a qual está aumentando em relação controle.

Quando se compara os valores dos pares de subgrupos, a partir da análise dos gráficos apresentados na figura 26, percebe-se que os animais sedentários que receberam as drogas apresentaram valores significativamente maiores de fibras do tipo I do que os subgrupos que realizaram o EFR (Figura 26C). Ademais, o grupo ST EFR teve aumento das fibras do tipo IIa e IIb, quando comparado ao seu par sedentário.

Dessa maneira, a análise da distribuição dos tipos de fibras musculares dos diferentes grupos de estudos, nos faz inferir que os animais sedentários tiveram maiores alterações deste parâmetro do que os que realizaram o protocolo dos treinos. Além disso, percebe-se que a administração de *stattic* está relacionada com o aumento da população de fibras do tipo I e diminuição das do tipo II. Em contrapartida, as populações de fibras do grupo EFR são mais homogêneas, tendo variado pouco em relação aos seus subgrupos.

Em resposta à prática de exercício físico, o músculo esquelético pode sofrer conversão entre os tipos de fibras, sendo que o treinamento de força resulta na transição das fibras musculares de contração lenta para de contração rápida (LEE *et al.*, 2018), ou seja, o EFR favorece o aumento da população de fibras do tipo IIb.

Corroborando com tal premissa, nossos resultados apontaram que os animais que realizaram o EFR e não receberam nenhuma droga (grupos controle e ST EFR), apresentaram fibras do tipo IIb significativamente mais abundantes quando comparados aos seus pares sedentários. Em contrapartida, nos animais que receberam a ADM tal diferença não foi observada, indicando assim, uma possível atuação da ADM no sentido de prejudicar a transição das fibras musculares em resposta ao EFR.

4.6.4 Núcleos celulares e deposição de lipídio intramuscular

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

No entanto, os níveis de lipídios musculares também estão elevados em atletas treinados em resistência, uma vez que o EF leva ao aumento da demanda de energia no músculo e estes fornecem ácidos graxos livres para conversão energética. Dessa maneira, a presença combinada de níveis elevados de lipídios intramusculares com a elevada sensibilidade à insulina é referida como o “paradoxo dos atletas” (ZACHAREWICZ *et al.*, 2018) .

A análise do nível de lipídios intracelulares do músculo gastrocnêmio foi realizada pela técnica de coloração de Sudan Black (Figura 27E), sendo que os resultados estão demonstrados na figura 27C.

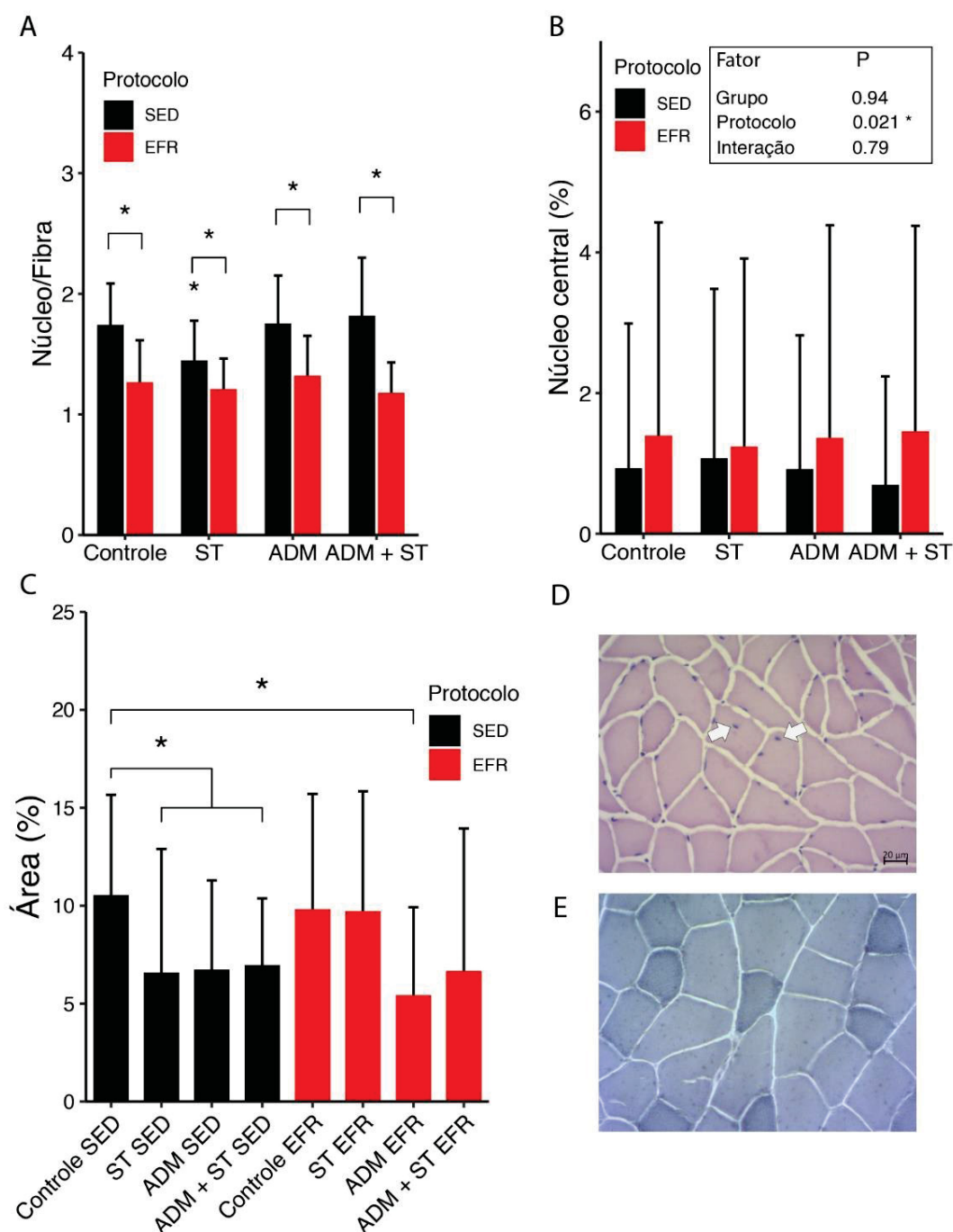


Figura 27: **Número de núcleos celulares e valor de lipídio intramuscular.** A) Razão núcleo/fibra do músculo gastrocnêmio. B) Presença de núcleos centrais nas fibras musculares. C) Estimativa de lipídeos intramusculares pela técnica histológica de Sudan Black. D) Campo histológico do músculo gastrocnêmio de camundongo. Setas brancas indicam a presença de núcleos centralizados. E) Imagem histológica da técnica de Sudan Black.

A partir da análise dos resultados, observa-se que os animais do grupo controle sedentário apresentaram área com deposição lipídica significativamente maior do que os animais sedentários que foram tratados com as drogas. Além disso,

o valor de lipídio intramuscular deste grupo também foi estatisticamente superior ao dos animais que realizaram o EFR e receberam ADM. Em contrapartida, os animais que realizaram o EFR não demonstraram diferenças significativas entre os subgrupos de estudo.

Além da deposição lipídica, também foi quantificada o número de núcleos por fibra muscular e a porcentagem de núcleos centrais nas fibras musculares, sendo os resultados demonstrados nas figuras 27A e 27B, respectivamente.

Nas células musculares esqueléticas, os núcleos são, normalmente, encontrados na periferia celular, sendo que o mau posicionamento nuclear já foi associado à disfunção muscular. Núcleos localizados centralmente são encontrados rotineiramente em certos distúrbios musculares, bem como na regeneração muscular.

A maioria das doenças que apresentam núcleos localizados centralmente são causadas por perda muscular, caracterizadas por um estado constante de degeneração/regeneração muscular (ROMAN; GOMES, 2018).

Ao contrário do que era esperado, foi observado que o EFR levou ao aumento do número de núcleos centrais em comparação aos animais que não realizaram a atividade física (Figura 27B), demonstrado pelo valor significativo de P no teste realizado, demonstrando assim, interação do protocolo de treinos.

Outro resultado curioso foi o qual indicou que os animais do grupo EFR tiveram uma diminuição do número de núcleos por fibra muscular (Figura 27A). A alteração no número de núcleos das fibras musculares pode indicar o crescimento ou hipertrofia muscular, enquanto que a redução de núcleos/fibra, por sua vez, pode demonstrar um processo de lesão às fibras (SCHIAFFINO *et al.*, 2013). Dessa maneira, era de se esperar que o EFR levasse ao aumento do número dos núcleos por fibra muscular, no entanto, observamos o oposto.

Frente a tais resultados intrigantes, sugere-se a necessidade de repetição dos experimentos em uma pesquisa futura para melhor elucidação do papel do EFR e da via de sinalização STAT-3 nos parâmetros musculares estudados.

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL

É bem estabelecido na literatura que o modelo de nefropatia induzido por adriamicina acarreta, dentre outras manifestações, grande deposição de matriz

intersticial, causando fibrose (OKUDA *et al.*, 1986; PEREIRA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2000) , sendo esta uma das causas do caráter progressivo do modelo.

A fim de analisar o papel do EFR e da via de sinalização STAT-3 na deposição de tecido fibrótico no rim, foi realizada a análise histológica dos cortes renais pela coloração de tricrômico de Masson. Os valores de fibrose obtidos estão demonstrados na figura 28.

A partir da análise dos resultados foi possível observar que a área histológica positiva para marcação de fibrose está significativamente aumentada nos animais sedentários que receberam a administração de ADM. Este aumento não foi verificado nos animais que tiveram a nefropatia induzida e que receberam o inibidor da via STAT-3, indicando que o tratamento com statin pode mitigar a fibrose tubulointersticial característica do modelo.

Os resultados obtidos sustentam as conclusões do estudo realizado por Bienaimé *et al.* (2016), o qual demonstrou o importante papel da STAT-3 na comunicação tubulointersticial durante a doença renal crônica, uma vez que a ativação da STAT-3 promove acúmulo de matriz intersticial e de fibroblastos. Os autores também demonstraram que a inativação desta via de sinalização causa a diminuição de fibrose tubulointersticial.

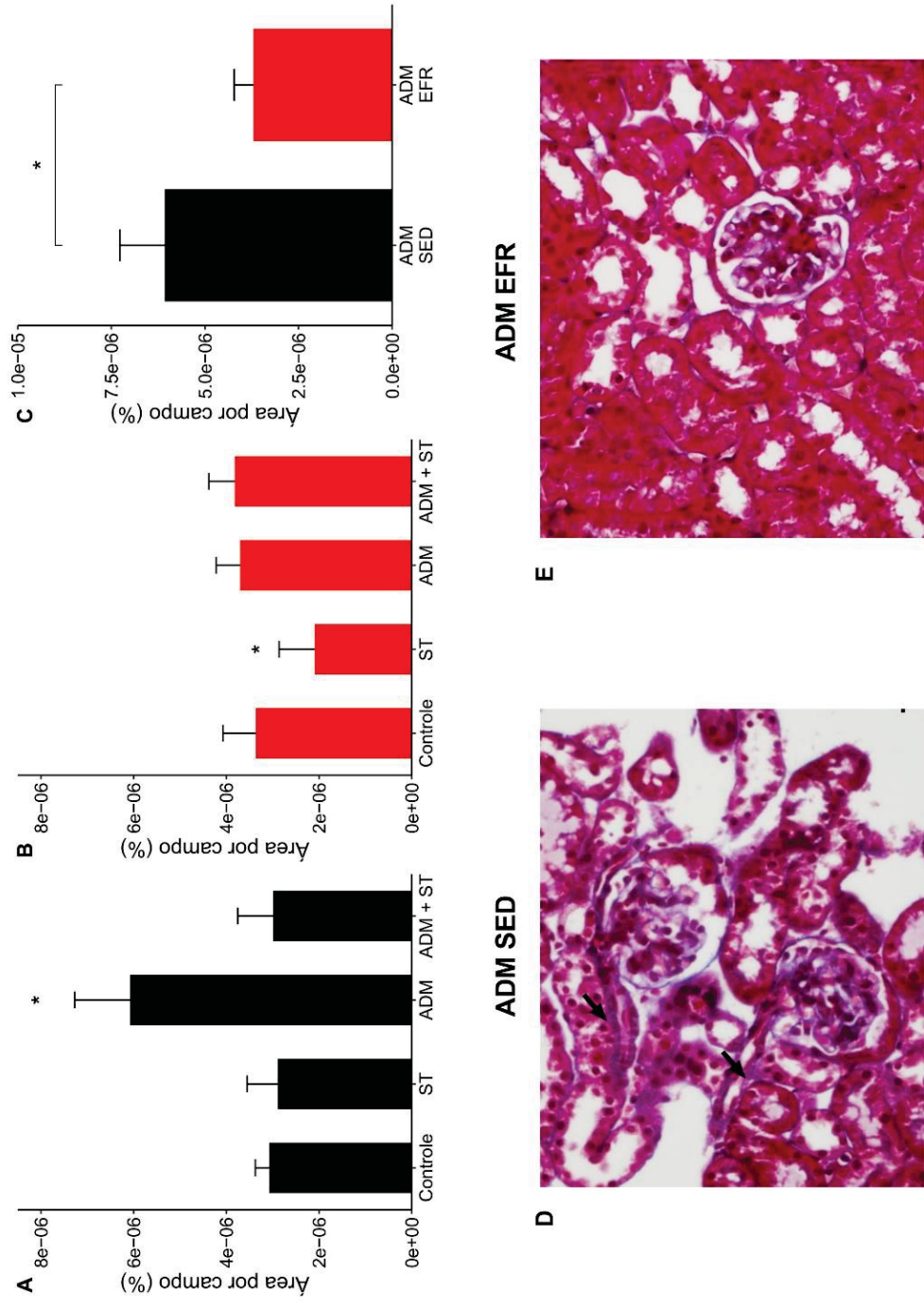


Figura 28: **A** realização do EFR leva a diminuição da fibrose renal causada pela ADM. Marcação histológica para (A) protocolo SED e (B) protocolo EFR. (C) Comparação entre animais que receberam adriamicina demonstra aumento da marcação histológica apenas

Em outro estudo publicado recentemente por nosso grupo de pesquisa, também foi indicado que a via de sinalização STAT-3 possui grande relevância sobre a fibrose tubulointersticial em decorrência do modelo de nefropatia induzida por ADM, sendo observado que a inibição da via pelo stattic leva à diminuição de marcadores de lesão renal, incluindo a fibrose e a necrose tubular (de OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2023).

Ao analisar os animais do grupo ADM e que realizaram o protocolo de treinos, não foi observado aumento da marcação, indicando que a realização do EFR pode ser capaz de impedir a deposição de tecido fibrótico tubulointersticial. Tal conclusão corrobora com nossos resultados de proteinúria e peso corporal, dois outros marcadores importantes no modelo utilizado, os quais indicaram que a realização do exercício físico é responsável pela diminuição da lesão renal causada pela ADM.

Resultados semelhantes aos nossos, foram encontrados por Souza *et al.*, (2018), os quais demonstraram que ratos submetidos ao modelo de nefrectomia 5/6 (Nx) e a um protocolo de exercício físico de resistência durante 10 semanas, tiveram um valor de fibrose intersticial significativamente menor do que os animais Nx sedentários.

Por fim, foi observado uma redução da fibrose no grupo ST EFR, demonstrando novamente o papel da inibição da via STAT-3 na redução da fibrose tubulointersticial.

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO MUSCULAR

A fim de analisar se o modelo de nefropatia induzido por adriamicina levava a alterações na expressão de genes relacionados ao catabolismo e anabolismo muscular, e em caso afirmativo, se a prática de EFR e a via STAT-3 se relacionavam com tal modulação, foi realizada a quantificação da expressão de genes no músculo gastrocnêmio. Para tanto, o mRNA de TRIM63, MYOG (miogenina), MyoD e STAT-3 foram quantificados por PCR em tempo real e os resultados obtidos, demonstrados na figura 29.

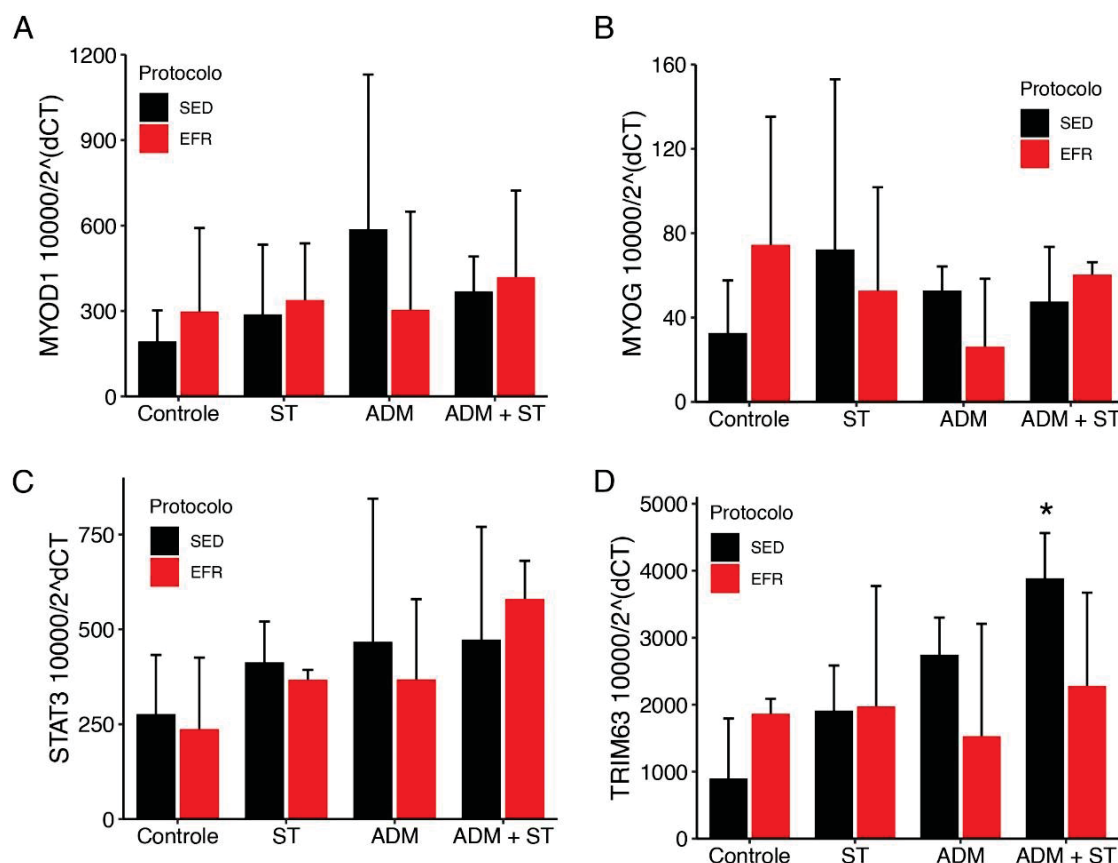


Figura 29: **Expressão de genes no tecido muscular.** Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes MyoD (A), MYOG (B) e STAT-3 (B). Já em a expressão de TRIM63 (C) apresentou alteração no grupo ADM+ST SED em relação seu controle. * $p < 0.05$ vs Controle (SED).

Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes MYOG, MyoD e STAT-3 no músculo dos animais analisados. Já a análise de TRIM63 indicou alteração no grupo ADM+ST SED.

É bem estabelecido na literatura que o MuRF-1, também conhecido como ubiquitina-ligase E3, o qual é codificado pelo gene TRIM63, está associado à atrofia muscular, desempenhando um papel crucial no UPS (BAUMERT *et al.*, 2018). Os alvos reconhecidos do MuRF-1 incluem proteínas contráteis e estruturais como titina, troponina 1, cadeias pesadas e leves da miosina, proteína C de ligação à miosina, bem como várias proteínas envolvidas na glicólise e no metabolismo do glicogênio (ROM; REZNICK, 2016).

A ativação do UPS é iniciada pela via de sinalização prejudicada do IGF-1/PI3K/AKT que se desenvolve na DRC devido à resistência à insulina, acidose

metabólica, excesso de angiotensina II e à inflamação crônica (BATAILLE *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2023).

A prática de exercício físico é reconhecida como tendo papel na diminuição da expressão de MuRF-1, como demonstrado por Gielen *et al.*, (2012), em um estudo com pacientes com insuficiência cardíaca crônica, submetidos a quatro semanas de exercício aeróbico. Ao fim do experimento, os pacientes que realizaram o protocolo de treinos apresentaram uma diminuição significativa da expressão gênica e proteica de MuRF-1 em comparação ao grupo controle.

Trabalhos também apontam a capacidade que o exercício resistido possui na modulação da expressão de MuRF-1. Mascher *et al.*, (2008), por exemplo, avaliou a expressão do gene após sessões repetidas de treinos de resistência, observando que a expressão de mRNA do MuRF-1 aumenta após uma primeira série de treinos, porém esse aumento é 30% menor após uma segunda sessão do exercício resistido. Os autores salientam que as alterações na expressão de genes envolvidos na degradação proteica são atenuadas como resposta ao treinamento de resistência repetitivo.

Em nosso estudo foi observado que os animais sedentários tratados com ADM+ST tiveram níveis de expressão de TRIM63 significativamente maior do que o grupo controle. Em contrapartida, os animais do mesmo grupo que realizaram o EFR não tiveram este aumento, indicando que a prática do treino resistido pode atenuar a ativação do gene de degradação proteica relacionada à DRC.

Embora no grupo ADM também tenha havido um aumento, este não foi significativo, levando a cogitar que a inativação da via STAT-3 também tem papel na modulação do gene.

4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO TECIDO RENAL

Foi realizada a análise da expressão de genes relacionados à lesão renal, de modo a avaliar se o EFR e a inibição da via de sinalização STAT-3 podem alterar a transcrição destes. Para isso, o mRNA de IL-6, NPHS-1 (nefrina), SOCS-1 e STAT-3 foram quantificados no tecido renal dos animais analisados e os resultados obtidos apresentados na figura 30.

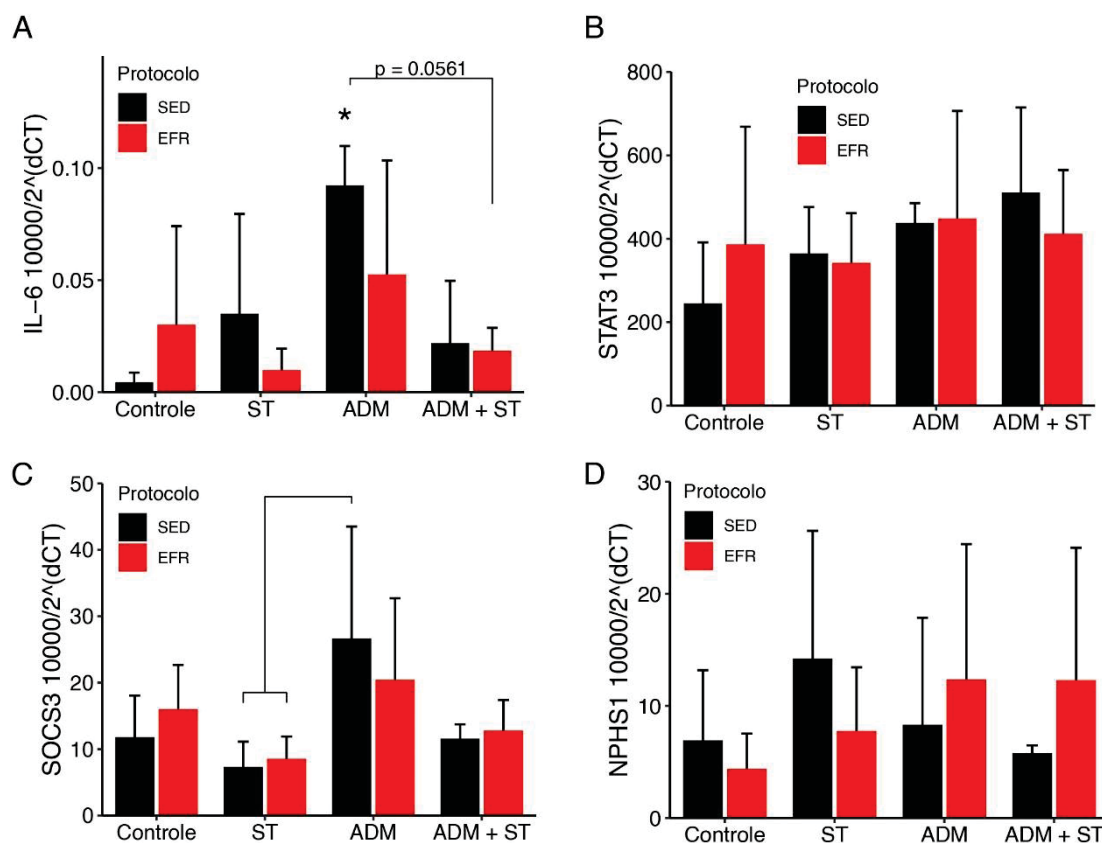


Figura 30: **Expressão de genes no tecido renal.** A expressão de IL-6 está aumentada no grupo sedentário em comparação ao controle (A). Entretanto, o mesmo aumento não é observado nos animais EFR, indicando que a execução dos treinos pode minimizar os efeitos da ADM sobre a produção de IL-6 renal. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de STAT-3 (B) e NPHS-1 (D). Já a expressão de SOCS-1 (C) foi diminuída pelo tratamento com stattice na ausência de nefropatia. * $p < 0.05$ vs Controle (SED).

A análise dos resultados indica que não houve alteração na expressão de NPHS-1 e STAT-3 no tecido renal (Figuras 30B e 30D). No entanto, a expressão de IL-6 está significativamente aumentada no grupo ADM sedentário em relação aos animais controle (Figura 30A) e a expressão de SOCS-3 (Figura 30C) dos animais tratados com ADM foi significativamente menor em comparação com o grupo ADM sedentário.

A interleucina 6 é uma citocina com ação pleiotrópica, atuando em diversas funções dos organismos, podendo ser secretada por muitos tipos celulares através de estímulos como infecção, inflamação ou câncer (GARBERS; ROSE-JOHN, 2018). A secreção de IL-6 por monócitos e macrófagos após a ativação de receptores Toll-like

é especialmente importante em casos de inflamação (CALABRESE; ROSE-JOHN, 2014).

É amplamente detalhado na literatura que a IL-6 tem grande papel na progressão da DRC. Níveis plasmáticos elevados desta citocina são comumente observados em pacientes com DRC, causado em grande parte pelo aumento do estresse oxidativo, inflamação crônica e sobrecarga de fluidos, bem como pela depuração reduzida de IL-6 devido ao comprometimento da função renal. Além disso, as diálises, por si só, estimulam ainda mais as respostas inflamatórias, aumentando a produção desta citocina (SU; LEI; ZHANG, 2017).

As anormalidades renais relacionadas à DRC e associadas à alta expressão de IL-6 incluem alterações no endotélio, dano podocitário, hipertrofia glomerular e aumento da expressão de fibronectina pelas células mesangiais (KREINER *et al.*, 2022).

Estudos têm demonstrado que a realização de exercício físico pode levar à diminuição dos níveis séricos de IL-6 em pacientes com DRC. O trabalho de Ikizler *et al.*, (2018), por exemplo, constatou, a partir da avaliação do efeito da dieta de restrição calórica e do exercício físico aeróbico em pacientes com DRC, que a prática de exercício físico é capaz de diminuir os níveis de IL-6 dos participantes. Em uma meta-análise recentemente publicada por Baião *et al.*, (2023), a qual avaliou os efeitos de intervenções com exercícios sobre marcadores inflamatórios em pacientes com DRC, foi relatada uma redução significativa na IL-6 após intervenções combinadas de exercícios.

Corroborando com os achados dos trabalhos anteriormente citados, em nosso estudo, observamos que os animais com a nefropatia e que realizaram o protocolo de exercício físico não apresentaram o mesmo aumento de expressão de IL-6 constatado no grupo sedentário, indicando assim, que a realização do EFR é capaz de mitigar o efeito da ADM sobre a produção renal de IL-6. Além disso, ao comparar o grupo ADM sedentário com o grupo ADM+ST EFF foi encontrado valor de $p=0,056$, muito próximo ao significativo, indicando que a inibição da via de sinalização STAT-3, associada a realização dos treinos pode potencializar o efeito do EFR de modular a síntese de IL-6.

No que se refere ao resultado apontando na figura 30C, podemos observar que o tratamento com o inibidor da via de sinalização STAT-3, independentemente da realização de EFR e na ausência de nefropatia levou à diminuição da expressão

gênica de SOCS-3, quando comparado com os animais sedentários cuja a nefropatia foi induzida.

Considerando que o SOCS-3 é um inibidor endógeno de STAT-3, é coerente a hipótese que a inibição da via e conseqüentemente a redução dos dímeros de STAT-3, levam à diminuição da necessidade de síntese do SOCS-3, reduzindo assim, a transcrição do seu gene.

Em contrapartida, a ADM causa o aumento da expressão de IL-6 (de OLIVEIRA SANTOS et al., 2023), a qual leva à ativação da via de sinalização STAT-3. Dessa maneira, é possível inferir que o aumento da ativação da via desencadeia um mecanismo de feedback negativo que culmina no incremento da expressão de SOCS-3, de modo a inibir a via.

Por esse motivo, observamos o aumento da expressão do mRNA de SOCS-3 no grupo ADM sedentário em relação aos animais dos grupos que receberam *static*. No entanto, este aumento não foi observado nos animais com a nefropatia e que realizaram o EFR, levando a pensar que a realização dos treinos tenha papel neste mecanismo de controle da via de sinalização STAT-3.

4.10 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO TECIDO ÓSSEO

As análises histomorfométricas são classificadas em parâmetros estruturais, microarquitetônicos e de remodelação, sendo estes últimos subdivididos em categorias estáticas e dinâmicas (DALLE CARBONARE *et al.*, 2021).

Os parâmetros estruturais fornecem informações sobre a massa e estrutura óssea, estando relacionados à geometria tridimensional do osso. Os parâmetros de remodelação estáticos fornecem informações sobre a quantidade de osso não mineralizado (osteóide) e a extensão das cavidades de reabsorção, enquanto que os dinâmicos informam sobre a taxa de formação óssea e só podem ser medidos quando os pacientes foram marcados com tetraciclina anteriormente à biópsia (KULAK; DEMPSTER, 2010).

Neste trabalho, foram avaliados os parâmetros estruturais, dentre eles o volume ósseo, a espessura trabecular, o número de trabéculas, bem como a distância

entre elas. Também foram avaliados os parâmetros estruturais estáticos, sendo estes a espessura e a superfície de osteóide.

Devido a questões técnicas, uma vez que o teste foi realizado em parceria com uma instituição externa, foi decidido em comum acordo a realização da análise apenas dos grupos controle e ADM, de ambos os protocolos (EFR e sedentário). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 31.

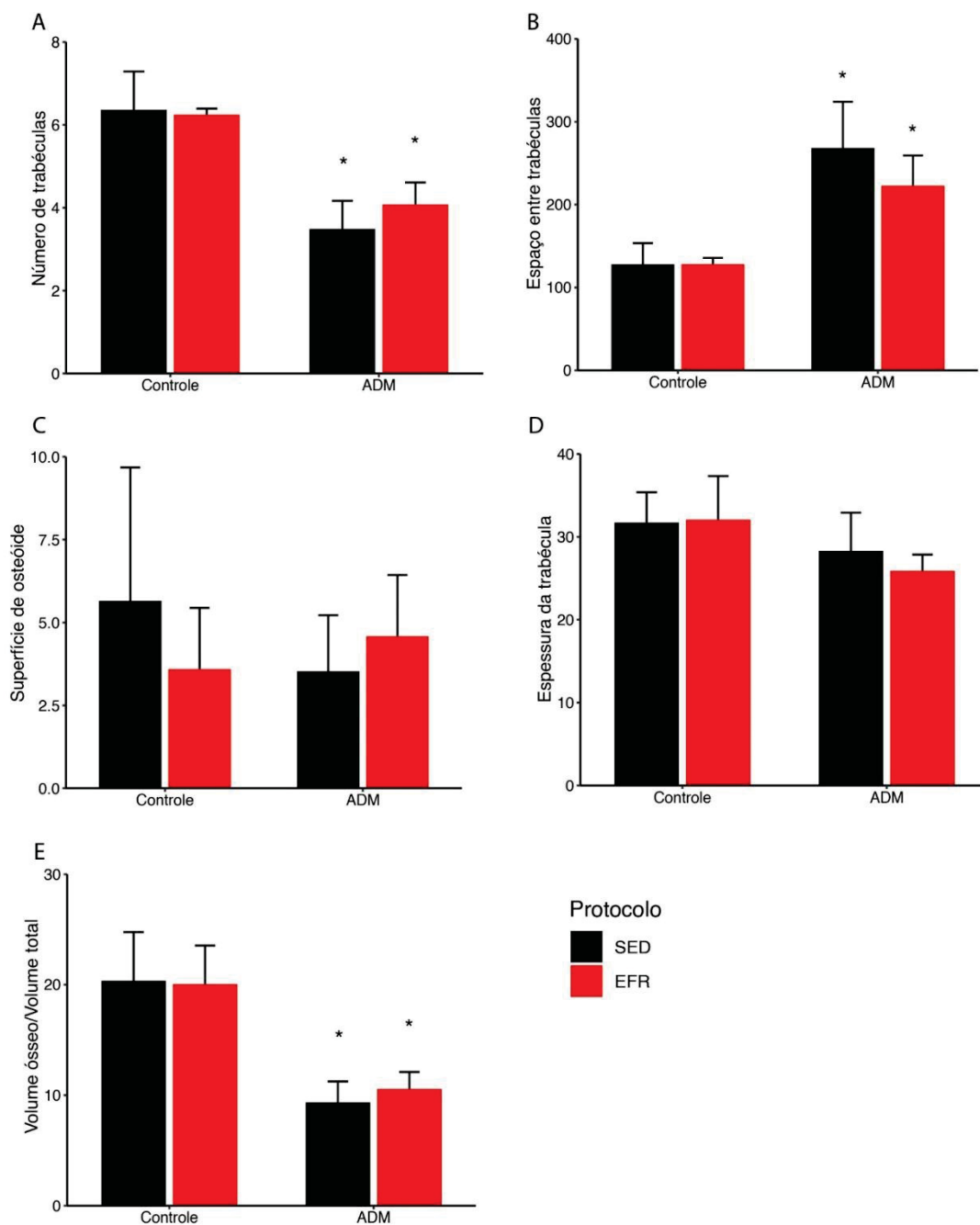


Figura 31: **O tratamento com ADM leva à perda de massa óssea que não é revertida pelo EFR.** O tratamento com a ADM causou a diminuição do número de trabéculas (A), e aumento do espaço entre elas (B), acompanhado pela diminuição da razão do volume ósseo pelo volume total (E). A superfície de osteóide (C) e a espessura das trabéculas (D), não sofreram alterações significativas. A realização do EFR não teve influência sobre os resultados. * $p < 0.05$ vs Controle.

A análise do gráfico nos permite observar que o tratamento com a ADM levou à diminuição do volume ósseo, independente da realização do EFR. Além disso,

houve diminuição do número das trabéculas e aumento do espaço entre as trabéculas nos animais com a nefropatia, em relação aos grupos controle. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros estruturais estáticos. A realização do protocolo de treinos parece não ter relação com as alterações destes parâmetros.

Os distúrbios ósseos que os pacientes com DRC estão sujeitos, resultam em comprometimento da microarquitetura cortical e trabecular e os predispõem a um risco de duas a quatro vezes maior de fraturas em comparação com a população em geral (RAMALHO *et al.*, 2018) .

Nossos resultados demonstraram que a nefropatia causada pela ADM também é capaz de alterar a estrutura óssea dos animais e que o protocolo de treinos realizado não foi capaz de reverter esta alteração.

Assim como nas nossas observações, outros autores também já relatam alterações na microestrutura óssea em modelos de DRC. Heveran *et al.*, (2016) , por exemplo, verificou que camundongos C57BL/6 submetidos a nefrectomia 5/6 (Nx) também tiveram diminuição de número de trabéculas e aumento de espaço entre estas. Em um outro trabalho, Heveran *et al.*, (2019), analisou o papel da idade e da DRC em conjunto e isoladamente na mesma linhagem de camundongos Nx, concluindo que a DRC por si só causa prejuízos na qualidade e estrutura óssea, reveladas pela diminuição do volume ósseo, fração de área óssea, número de trabéculas, espessura do osso cortical e aumento da porosidade do osso cortical, a partir da análise por microtomografia computadorizada.

Após a realização das análises dos parâmetros estruturais estáticos e dinâmicos apresentadas neste trabalho, novos estudos continuarão a ser realizados em parceria com o instituto pró-renal, a fim de analisar o papel da via de sinalização STAT-3 nas alterações na microestrutura óssea dos animais submetidos ao modelo de nefropatia induzido por ADM.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que o tratamento com adriamicina nos animais sedentários causou aumento significativo da albuminúria, aliado a perda considerável de massa corporal, em comparação com os animais que realizam o protocolo de treinos, demonstrando assim, que o EFR atua de modo a minimizar os efeitos nefrotóxicos da ADM, diminuindo a proteinúria e a perda de peso.

Ademais, nossos resultados nos forneceram subsídios para concluir que o EFR também é eficiente em mitigar fibrose renal causada pela administração da ADM, bem como o aumento da expressão de IL-6 no tecido renal, sendo que estas alterações se relacionam com a via de sinalização STAT-3, uma vez que a inibição da via, evitou o aumento destes parâmetros nos grupos com a nefropatia e que receberam o inibidor static.

Também foi possível constatar que o EFR é capaz de proteger o animal da sarcopenia característica do modelo utilizado. Tal fato foi demonstrado pelos testes de carga máxima e pelo aumento da massa do músculo gastrocnêmio dos animais do grupo EFR em relação aos sedentários. Além disso, observamos que a prática do EFR é capaz de manter as populações de fibras musculares em considerável homogeneidade, evitando as alterações dos tipos de fibras ocasionada pelo uso da ADM e do static.

Ao analisar a via de sinalização STAT-3 nos parâmetros relacionados à atrofia e hipertrofia muscular, observamos envolvimento desta na expressão gênica de TRIM63, a partir do aumento da expressão do gene apenas nos animais do grupo ADM sedentário, não sendo observado o mesmo aumento naqueles que realizaram o EFR ou nos grupos com a nefropatia e que receberam o static.

Portanto, é possível inferir que a perda de massa muscular do modelo tem relação com a via de sinalização STAT-3 e que esta, por sua vez, pode ser modulada pela prática da atividade física resistida. Contudo, nossa pesquisa não foi capaz de explicar quais os mecanismos celulares responsáveis por tal modulação, sendo necessário um maior aprofundamento do tema.

Nossos resultados, desta maneira, nos permitiram concluir que a prática de EFR é benéfica na manutenção da massa muscular, sendo capaz de mitigar a perda muscular oriunda da sarcopenia, bem como os danos renais característicos do modelo

de nefropatia induzido por ADM. Por isso, sugere-se que novas pesquisas sejam desenvolvidas de modo a esclarecer os mecanismos celulares responsáveis por mediar a modulação da via de sinalização STAT-3 a partir da realização do EFR.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBATE, M. et al. Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF- β 1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. **Kidney International**, v. 61, n. 6, p. 2066–2077, jun. 2002.
- ABBATE, M.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. How Does Proteinuria Cause Progressive Renal Damage? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 2974–2984, nov. 2006a.
- AGRAWAL, S. et al. Exploring the Role of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Atrophy: Mechanisms and Implications. **Cureus**, 20 jul. 2023.
- AKCHURIN, O. M.; KASKEL, F. Update on Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Blood Purification**, v. 39, n. 1–3, p. 84–92, 2015.
- ALCALDE, P. R.; KIRSZTAJN, G. M. Expenses of the Brazilian Public Healthcare System with chronic kidney disease. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, n. 2, p. 122–129, 4 jun. 2018.
- ALP IKIZLER, T. et al. Prevention and treatment of protein energy wasting in chronic kidney disease patients: a consensus statement by the International Society of Renal Nutrition and Metabolism. **Kidney International**, v. 84, n. 6, p. 1096–1107, dez. 2013.
- ANDERSON, S. et al., Prediction, Progression, and Outcomes of Chronic Kidney Disease in Older Adults. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 20, n. 6, p. 1199-1209, jun. 2009
- BAIÃO, V. M. et al. Effects of Exercise on Inflammatory Markers in Individuals with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Metabolites**, v. 13, n. 7, p. 795, 27 jun. 2023.
- BAUMERT, P. et al. TRIM63 (MuRF-1) gene polymorphism is associated with biomarkers of exercise-induced muscle damage. **Physiological Genomics**, v. 50, n. 3, p. 142–143, 1 mar. 2018.
- BATAILLE, S. et al. Myostatin and muscle atrophy during chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 36, n. 11, p. 1986–1993, 9 nov. 2021.
- BATAILLE, S. et al. Mechanisms of myostatin and activin A accumulation in chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 37, n. 7, p. 1249–1260, 23 jun. 2022.
- BARRETO, F. C. et al. Strategies for Phosphate Control in Patients With CKD. **Kidney International Reports**, v. 4, n. 8, p. 1043–1056, ago. 2019.
- BERTANI, T. et al. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. **Kidney International**, v. 30, n. 4, p. 488–496, out. 1986.

BHARADWAJ, U. et al. Targeting Janus Kinases and Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Treat Inflammation, Fibrosis, and Cancer: Rationale, Progress, and Caution. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 2, p. 486–526, 20 abr. 2020.

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

BLOCK, G. A. et al. Mineral Metabolism, Mortality, and Morbidity in Maintenance Hemodialysis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 8, p. 2208–2218, ago. 2004

BROSIUS, F. C.; HE, J. C. JAK inhibition and progressive kidney disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 24, n. 1, p. 88–95, jan. 2015.

BRYANT, C. et al. Adriamycin-Induced Nephropathy is Robust in N and Modest in J Substrain of C57BL/6. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 16 jun. 2022.

BÜLOW, R. D.; BOOR, P. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 643–661, 22 maio 2019

BUTTERFIELD, T. A.; LEONARD, T. R.; HERZOG, W. Differential serial sarcomere number adaptations in knee extensor muscles of rats is contraction type dependent. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 4, p. 1352–1358, out. 2005.

CALABRESE, L.H.; ROSE-JOHN, S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Nat. Rev. Rheumatol.** August 2014.

CARRERO, J. J. et al. Muscle atrophy, inflammation and clinical outcome in incident and prevalent dialysis patients. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 557–564, ago. 2008.

CASTRO, A. P. A. DE et al. Intradialytic resistance training: an effective and easy-to-execute strategy. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, n. 2, p. 215–223, jun. 2019.

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.

CHEN, A. et al. Induction of Proteinuria by Adriamycin or Bovine Serum Albumin in the Mouse. **Nephron**, v. 69, n. 3, p. 293–300, 1995.

CHEN, M.-M. et al. Regulation of Myostatin on the Growth and Development of Skeletal Muscle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 24 dez. 2021.

CHENG, T.-C. et al. Muscle Wasting in Chronic Kidney Disease: Mechanism and Clinical Implications—A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6047, 27 maio 2022.

DALLE CARBONARE, L. et al. Bone Biopsy for Histomorphometry in Chronic Kidney Disease (CKD): State-of-the-Art and New Perspectives. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 19, p. 4617, 8 out. 2021.

DAOU, H. N. Exercise as an anti-inflammatory therapy for cancer cachexia: a focus on interleukin-6 regulation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 318, n. 2, p. R296–R310, 1 fev. 2020.

DAS, R. et al. Upregulation of mitochondrial Nox4 mediates TGF- β -induced apoptosis in cultured mouse podocytes. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 306, n. 2, p. F155–F167, 15 jan. 2014.

DUARTE, M. P. et al. Prevalence of sarcopenia in patients with chronic kidney disease: a global systematic review and meta-analysis. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 15, n. 2, p. 501–512, 24 abr. 2024.

DUNGEY, M. et al. Regular exercise during haemodialysis promotes an anti-inflammatory leucocyte profile. **Clinical Kidney Journal**, v. 10, n. 6, p. 813–821, 1 dez. 2017.

EKNOYAN, G.; LEVIN, A.; LEVIN, N. W. Bone metabolism and disease in chronic kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, p. 1–201, out. 2003.

EVANS, M. et al. A Narrative Review of Chronic Kidney Disease in Clinical Practice: Current Challenges and Future Perspectives. **Advances in Therapy**, v. 39, n. 1, p. 33–43, 5 jan. 2022.

FAHAL, I. H. Uraemic sarcopenia: aetiology and implications. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 29, n. 9, p. 1655–1665, 1 set. 2014.

FENG, X. et al. Secular trends of epidemiologic patterns of chronic kidney disease over three decades: an updated analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. **BMJ Open**, v. 13, n. 3, p. e064540, 17 mar. 2023.

FOGO, A. B. Animal models of FSGS: Lessons for pathogenesis and treatment. **Seminars in Nephrology**, v. 23, n. 2, p. 161–171, mar. 2003.

FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 3, p. 183–195, 8 mar. 2015.

GARBERS, C.; ROSE-JOHN, S.; HEINK, S.; KORN, T. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. **Nature Reviews**, 2018.

GAYTAN, S. L. et al. The beneficial role of exercise in preventing doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 9 mar. 2023.

GIELEN, S. et al. Exercise Training Attenuates MuRF-1 Expression in the Skeletal Muscle of Patients With Chronic Heart Failure Independent of Age. **Circulation**, v. 125, n. 22, p. 2716–2727, 5 jun. 2012.

GRACIA-IGUACEL, C. et al. Criteria for classification of protein–energy wasting in dialysis patients: impact on prevalence. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 11, p. 1271–1278, 14 jun. 2019.

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.

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.

HABERECHE-MÜLLER, S.; KRÜGER, E.; FIELITZ, J. Out of Control: The Role of the Ubiquitin Proteasome System in Skeletal Muscle during Inflammation. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1327, 8 set. 2021.

HAYWARD, R. et al. Tissue retention of doxorubicin and its effects on cardiac, smooth, and skeletal muscle function. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 177–187, 14 jun. 2013.

HE, S. et al. An integrated transcriptomics and network pharmacology approach to exploring the mechanism of adriamycin-induced kidney injury. **Chemico-Biological Interactions**, v. 325, p. 109096, jul. 2020.

HEVERAN, C. M. et al. Moderate chronic kidney disease impairs bone quality in C57Bl/6J mice. **Bone**, v. 86, p. 1–9, maio 2016.

HEVERAN, C. M. et al. Chronic kidney disease and aging differentially diminish bone material and microarchitecture in C57Bl/6 mice. **Bone**, v. 127, p. 91–103, out. 2019.

HIENSCH, A. E. et al. Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways. **Acta Physiologica**, v. 229, n. 2, 31 jun. 2020.

HILL, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0158765, 6 jul. 2016.

HINKS, A. et al. The importance of serial sarcomere addition for muscle function and the impact of aging. **Journal of Applied Physiology**, vol. 135, n. 2, jul. 2023.

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.

HSU, C.-Y.; CHEN, L.-R.; CHEN, K.-H. Osteoporosis in Patients with Chronic Kidney Diseases: A Systemic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6846, 18 set. 2020.

IKIZLER, T. A. et al. Metabolic Effects of Diet and Exercise in Patients with Moderate to Severe CKD: A Randomized Clinical Trial. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 1, p. 250–259, jan. 2018.

IWASAKI, Y.; KAZAMA, J. J.; FUKAGAWA, M. Molecular Abnormalities Underlying Bone Fragility in Chronic Kidney Disease. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–11, 2017.

JAGER, K. J. et al. A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. **Kidney International**, v. 96, n. 5, p. 1048–1050, nov. 2019.

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, jan. 2009.

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

KASHANI, K.; ROSNER, M. H.; OSTERMANN, M. Creatinine: From physiology to clinical application. **European Journal of Internal Medicine**, v. 72, p. 9–14, fev. 2020.

KAVAZIS, A. N. et al. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 1, p. H144–H152, jul. 2009.

KERJASCHKI, D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 11, p. 1583–1587, 1 dez. 2001.

KHAMOUI, A. V., et al. Aerobic and resistance training dependent skeletal muscle plasticity in the colon-26 murine model of cancer cachexia. **Metabolism**, vol. 65, n. 5, p. 685-698, mai. 2016.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. **Kidney Int.** 2022 Nov;102(5S):S1-S127. doi: 10.1016/j.kint.2022.06.008. PMID: 36272764.

KILE, B. T. et al. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 235–241, maio 2002.

KOVES, T. R. et al. PPAR γ coactivator-1 α 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.

KOVESDY, C. P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. **Kidney International Supplements**, v. 12, n. 1, p. 7–11, abr. 2022.

KREINER, F. F. et al. Interleukin 6 in diabetes, chronic kidney disease, and cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic perspectives. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 18, n. 4, p. 377–389, 3 abr. 2022.

KRUSE, A. et al. Stimuli for Adaptations in Muscle Length and the Length Range of Active Force Exertion—A Narrative Review. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 8 out. 2021.

KULAK, C. A. M.; DEMPSTER, D. W. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 2, p. 87–98, mar. 2010.

KURATSUNE, M. et al. Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction. **Nephrology**, v. 12, n. 6, p. 565–571, 9 dez. 2007.

LARSSON, L. et al. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 1, p. 427–511, 1 jan. 2019.

LAMBERS HEERSPIJK, H. J.; GANSEVOORT, R. T. Albuminuria Is an Appropriate Therapeutic Target in Patients with CKD. ***Clinical Journal of the American Society of Nephrology***, v. 10, n. 6, p. 1079–1088, jun. 2015a.

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, V. W.; HARRIS, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. ***Nephrology***, v. 16, n. 1, p. 30–38, 23 jan. 2011.

LEE, S.-H. et al. Exercise induces muscle fiber type switching via transient receptor potential melastatin 2-dependent Ca²⁺ signaling. ***Journal of Applied Physiology***, v. 124, n. 2, p. 364–373, 1 fev. 2018.

LEE, V. W. S. et al. Adriamycin nephropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice. ***Nephrology Dialysis Transplantation***, v. 21, n. 11, p. 3293–3298, 12 set. 2006.

LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. ***Nat Rev Nephrol.***, vol. 7, n. 12, p. 684-696, 2011.

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.

MARTINS, H. R. F. et al. Morphometric and Molecular Muscle Remodeling after Passive Stretching in Elderly Female Rats. ***Clinics***, v. 75, p. e1769, 2020.

MASCHER, H. et al. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. ***American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism***, v. 294, n. 1, p. E43–E51, jan. 2008.

MCCROSKERY, S. et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. ***The Journal of Cell Biology***, v. 162, n. 6, p. 1135–1147, 15 set. 2003.

MENG, X.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; LAN, H. Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. ***Nature Reviews Nephrology***, v. 12, n. 6, p. 325–338, 25 jun. 2016.

MEYER, T. W. Tubular injury in glomerular disease. ***Kidney International***, v. 63, n. 2, p. 774–787, fev. 2003.

MEZZANO, S. A. et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. ***Kidney International***, v. 57, n. 1, p. 147–158, jan. 2000.

MIHAI, S. et al. Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome. ***Journal of Immunology Research***, v. 2018, p. 1–16, 6 set. 2018.

MILLER, A.; MCLEOD, L.; ALHAYYANI, S.; et al. Blockade of the IL-6 trans-signalling/STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma. **Oncogene**, v. 36, n. 21, p. 3059–3066, 2017.

MOE, S. et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney International**, v. 69, n. 11, p. 1945–1953, jun. 2006.

MORLEY, J. E. et al. Sarcopenia With Limited Mobility: An International Consensus. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 12, n. 6, p. 403–409, jul. 2011.

NAKAJIMA, H. et al. Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. **Kidney International**, v. 61, n. 5, p. 1577–1587, maio 2002.

NERBASS, F. B. et al. Hemodiálise no Brasil: diferenças entre regiões geográficas quanto a dados demográficos, parâmetros laboratoriais e prescrição de medicamentos. **Brazilian Journal of Nephrology**, 30 jun. 2023.

NOBLE, R.; TAAL, M. W. Epidemiology and causes of chronic kidney disease. **Medicine**, v. 47, n. 9, p. 562–566, set. 2019.

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.

de OLIVEIRA SANTOS, T. C. et al. STAT-3 signaling role in an experimental model of nephropathy induced by doxorubicin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 478, n. 5, p. 981–989, 6 maio 2023.

O’SULLIVAN, T. F.; SMITH, A. C.; WATSON, E. L. Satellite cell function, intramuscular inflammation and exercise in chronic kidney disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 11, n. 6, p. 810–821, 1 dez. 2018.

PANG, M. et al. A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. **Kidney International**, v. 78, n. 3, p. 257–268, ago. 2010.

PEARSON, A. M. Muscle growth and exercise. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 3, p. 167–196, jan. 1990.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a Secretory Organ. Em: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2013. p. 1337–1362.

PEREIRA, R. A. et al. Sarcopenia in chronic kidney disease on conservative therapy: prevalence and association with mortality. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 10, p. 1718–1725, out. 2015.

PEREIRA, R. L. et al. Invariant Natural Killer T Cell Agonist Modulates Experimental Focal and Segmental Glomerulosclerosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32454, 12 mar. 2012.

- PEREIRA, W. DE F. et al. The experimental model of nephrotic syndrome induced by Doxorubicin in rodents: an update. **Inflammation Research**, v. 64, n. 5, p. 287–301, 19 maio 2015.
- PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 6, p. 500–509, 15 set. 2000.
- PLOTKIN, D. L. et al. Muscle Fiber Type Transitions with Exercise Training: Shifting Perspectives. **Sports**, v. 9, n. 9, p. 127, 10 set. 2021.
- PRICE, F. D. et al. Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. **Nature Medicine**, v. 20, n. 10, p. 1174–1181, 7 out. 2014.
- RAHBAR SAADAT, Y. et al. Gut microbiota; an overlooked effect of phosphate binders. **European Journal of Pharmacology**, v. 868, p. 172892, fev. 2020.
- RAMALHO, J. et al. The trabecular bone score: Relationships with trabecular and cortical microarchitecture measured by HR-pQCT and histomorphometry in patients with chronic kidney disease. **Bone**, v. 116, p. 215–220, nov. 2018.
- RAPA, S. F. et al. Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease—Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 263, 30 dez. 2019.
- RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281–1283, 15 mar. 2004.
- REISER, J.; GUPTA, V.; KISTLER, A. D. Toward the development of podocyte-specific drugs. **Kidney International**, v. 77, n. 8, p. 662–668, abr. 2010.
- RILEY, D. A.; VAN DYKE, J. M. The Effects of Active and Passive Stretching on Muscle Length. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 51–57, fev. 2012.
- ROM, O.; REZNICK, A. Z. The role of E3 ubiquitin-ligases MuRF-1 and MAFbx in loss of skeletal muscle mass. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 98, p. 218-230, set. 2016.
- ROMAGNANI, P. et al. Chronic kidney disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17088, 23 nov. 2017.
- ROMAN, W.; GOMES, E. R. Nuclear positioning in skeletal muscle. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 82, p. 51–56, out. 2018.
- ROSHANRAVAN, B.; GAMBOA, J.; WILUND, K. Exercise and CKD: Skeletal Muscle Dysfunction and Practical Application of Exercise to Prevent and Treat Physical Impairments in CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 69, n. 6, p. 837–852, jun. 2017.
- ROUBICEK, T. et al. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. **Nutrition**, v. 25, n. 7–8, p. 762–768, jul. 2009.

SABATINO, A. et al. Protein-energy wasting and nutritional supplementation in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 3, p. 663–671, jun. 2017.

SALA, D.; SACCO, A. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling as a potential target to treat muscle wasting diseases. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, p. 1, mar. 2016.

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.

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, 2 set. 2015.

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.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 4, 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.

SECCHI, K. et al. Efeito do alongamento e do exercício contra-resistido no músculo esquelético de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 3, p. 228–234, jun. 2008.

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.

SHIMIZU, H. et al. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- κ B and p53 in proximal tubular cells. **Life Sciences**, v. 92, n. 2, p. 143–148, fev. 2013.

SHUAI, K.; LIU, B. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 11, p. 900–911, nov. 2003.

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.

de SOUSA, L. C. M. et al. Health-related patterns and chronic kidney disease in the Brazilian population: National Health Survey, 2019. **Frontiers in Public Health**, v. 11, 6 abr. 2023.

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.

STENVINKEL, P. et al. Chronic Inflammation in Chronic Kidney Disease Progression: Role of Nrf2. **Kidney International Reports**, v. 6, n. 7, p. 1775–1787, jul. 2021.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. The uremic toxin indoxyl sulfate exacerbates reactive oxygen species production and inflammation in 3T3-L1 adipose cells. **Free Radical Research**, v. 50, n. 3, p. 337–344, 3 mar. 2016.

STORER, T. W. et al. Endurance exercise training during haemodialysis improves strength, power, fatigability and physical performance in maintenance haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 7, p. 1429–1437, 1 jul. 2005.

TANDUKAR, S.; PALEVSKY, P. M. Continuous Renal Replacement Therapy. **Chest**, v. 155, n. 3, p. 626–638, mar. 2019.

TANG, P. C. et al. TGF- β 1 Signaling: Immune Dynamics of Chronic Kidney Diseases. **Frontiers**, vol. 8, fev. 2021.

TANNER, G. A. et al. Glomerular and proximal tubular morphology after single nephron obstruction. **Kidney International**, v. 36, n. 6, p. 1050–1060, dez. 1989.

TEIXEIRA, V. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. *Revista Brasileira de Reumatologia*, vol. 52, n. 2, abril, 2012.

TIERNEY, M. T. et al. STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. **Nature Medicine**, v. 20, n. 10, p. 1182–1186, 7 out. 2014.

TORRES, E. et al. Exercise training during hemodialysis sessions: Physical and biochemical benefits. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v. 24, n. 6, p. 648–654, 27 dez. 2020.

VERZOLA, D. et al. Emerging role of myostatin and its inhibition in the setting of chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 95, n. 3, p. 506–517, mar. 2019.

WANG, K. et al. Chronic kidney disease-induced muscle atrophy: Molecular mechanisms and promising therapies. **Biochemical Pharmacology**, v. 208, p. 115407, fev. 2023.

WANG, X. H.; MITCH, W. E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, n. 9, p. 504–516, 1 set. 2014.

WANG, Y. et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. **Kidney International**, v. 58, n. 4, p. 1797–1804, out. 2000.

WANG, Z. et al. The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. **Cell**, v. 184, n. 8, p. 2135–2150.e13, abr. 2021.

WATANABE, H.; ENOKI, Y.; MARUYAMA, T. Sarcopenia in Chronic Kidney Disease: Factors, Mechanisms, and Therapeutic Interventions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 9, p. 1437–1445, 1 set. 2019.

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.

WEBSTER, A. C. et al. Chronic Kidney Disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10075, p. 1238–1252, mar. 2017.

WHITE, T. A.; LEBRASSEUR, N. K. Myostatin and Sarcopenia: Opportunities and Challenges - A Mini-Review. **Gerontology**, v. 60, n. 4, p. 289–293, 2014.

WHO **Guidelines on Physical Activity and Sedentary Behaviour**: at a glance. Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2020.

WILLIAMS, N. G. et al. Endocrine Actions of Myostatin: Systemic Regulation of the IGF and IGF Binding Protein Axis. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 172–180, 1 jan. 2011.

WISDOM, K. M.; DELP, S. L.; KUHL, E. Use it or lose it: multiscale skeletal muscle adaptation to mechanical stimuli. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 14, n. 2, p. 195–215, 9 abr. 2015.

XIONG, Y.; YU, C.; ZHANG, Q. Ubiquitin-Proteasome System–Regulated Protein Degradation in Spermatogenesis. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 1058, 21 mar. 2022.

YIN, L. et al. Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. **Pharmacological Research**, v. 172, p. 105807, out. 2021.

YU, J. et al. Novel insights into STAT3 in renal diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 165, p. 115166, set. 2023.

ZACHAREWICZ, E.; HESSELINK, M. K. C.; SCHRAUWEN, P. Exercise counteracts lipotoxicity by improving lipid turnover and lipid droplet quality. **Journal of Internal Medicine**, v. 284, n. 5, p. 505–518, 8 nov. 2018.

ZHANG, L. et al. Stat3 Activation Links a C/EBP δ to Myostatin Pathway to Stimulate Loss of Muscle Mass. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 368–379, set. 2013.

ZHENG, Z. et al. An Ancestral Haplotype Defines Susceptibility to Doxorubicin Nephropathy in the Laboratory Mouse. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 7, p. 1796–1800, jul. 2006.

ZÖLLNER, A. M. et al. Stretching Skeletal Muscle: Chronic Muscle Lengthening through Sarcomerogenesis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e45661, 1 out. 2012.