

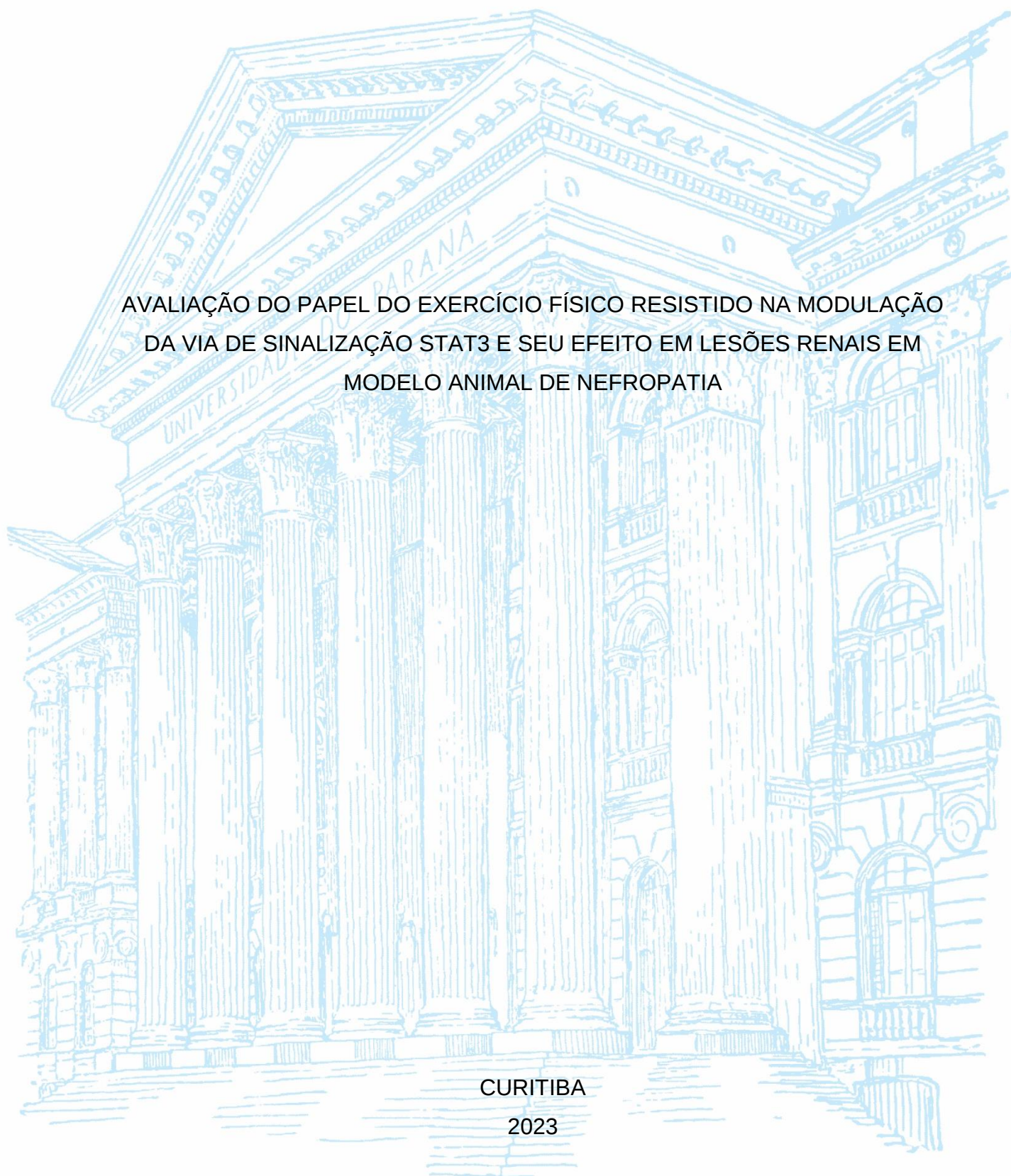
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PIETRA MANCINI SEIBT

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NA MODULAÇÃO
DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 E SEU EFEITO EM LESÕES RENAIS EM
MODELO ANIMAL DE NEFROPATIA

CURITIBA

2023



PIETRA MANCINI SEIBT

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NA MODULAÇÃO
DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 E SEU EFEITO EM LESÕES RENAIIS EM
MODELO ANIMAL DE NEFROPATIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira

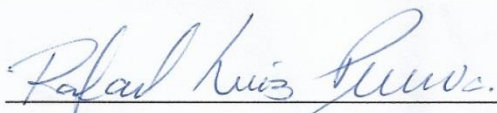
CURITIBA

2023

PIETRA MANCINI SEIBT

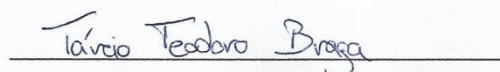
AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO NA
MODULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3 E SEU EFEITO EM LESÕES
RENAIS EM MODELO ANIMAL DE NEFROPATIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de
Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná,
como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.



Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira

Orientador – Departamento de Fisiologia, UFPR



Prof. Dr. Tarcio Teodoro Braga

Departamento de Patologia Básica, UFPR

Curitiba, 23 de novembro de 2023.

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso à minha avó e ao meu avô maternos (in memoriam), meus maiores incentivadores, que estarão eternamente em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que apoiaram minhas escolhas e se fizeram presentes quando eu mais precisei ao decorrer da graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira, por ter aceitado me orientar com muita dedicação e por toda a paciência e ensinamentos, que me proporcionaram um desenvolvimento profissional.

A minha amiga e co-orientadora, Thabata Caroline de Oliveira Santos, e ao meu amigo de laboratório, Gabriel Pereira por todas as trocas de experiências, aprendizado, conselhos e amizade.

Aos meus pais, Andrea Mancini Seibt e Carlos Eduardo Seibt, que me incentivam a buscar os meus sonhos e estiveram sempre presentes durante essa caminhada.

Ao Pedro Henrique Ribas Nery Serafim, por todo o apoio e companheirismo ao longo desses anos.

A minha família, que sempre unida me deu forças nos momentos mais difíceis e me impulsionou em busca do que eu almejo.

Aos meus amigos de perto e de longe, que mesmo em meio aos desencontros da vida e da pandemia se fizeram presentes em todos os momentos ao longo dessa caminhada.

À Profa. Dra. Debora Tavares Resende e Silva, pela colaboração na análise histológica.

Ao programa de Iniciação Científica da UFPR pela bolsa concedida.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função renal, sendo a inflamação crônica um fenômeno comum da doença, visto que, ocorre exposição persistente aos estímulos inflamatórios, que desencadeiam danos teciduais e fibrose. Posto isso, a DRC é um problema global de saúde, afetando mais de 7% da população. No Brasil, estima-se que mais de dez milhões de pessoas tenham a doença. Essa condição impacta a qualidade de vida e gera altos custos para os sistemas de saúde. Dessa forma, o presente estudo analisou a ação do exercício físico resistido (EFR) e da via de sinalização STAT3 em marcadores inflamatórios e fibróticos associados à lesão renal presentes em modelo experimental de nefropatia induzida por adriamicina (ADM). A via de sinalização STAT3 desempenha papel no crescimento, proliferação e diferenciação celular, sendo a inibição dessa via essencial para a atenuação da fibrose. Enquanto isso, a adriamicina reproduz a glomeruloesclerose segmentar focal humana (GESF), resultando em inflamação e fibrose tubulointersticial. Para esse trabalho foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c, divididos em dois grupos principais: EFR e sedentário. Cada grupo foi subdividido em quatro subgrupos, de acordo com o protocolo de drogas: Controle, ADM, ADM+STATTIC e STATTIC. O protocolo de EFR durou 12 semanas, e consistiu em: processo de adaptação, teste de peso de carga máxima (PCM), a cada três semanas, e os treinos, realizados três vezes por semana. Para induzir a nefropatia, foi administrada ADM via intravenosa caudal. A inibição da via de sinalização STAT3 foi feita com inibidor seletivo STATTIC, aplicado após a indução da nefropatia. Para as análises de capacidade de carga máxima elevada pelos animais submetidos ao EFR, variação de peso corporal, razão/albumina/creatinina urinária e fibrose renal, foram realizados os teste de PCM, pesagens, coletas de urina e rim direito dos animais. Os resultados do estudo indicam que o EFR contribui para um aumento progressivo na capacidade de carga em camundongos com nefropatia induzida por ADM. O EFR também mostrou eficácia na redução da perda de peso corporal, especialmente em comparação com camundongos sedentários tratados com ADM. A razão albumina/creatinina aumentou nos camundongos sedentários tratados com ADM, mas o EFR ajudou a mitigar esses efeitos. Além disso, o estudo revelou que a ADM causou fibrose nos animais sedentários, mas o tratamento com STATTIC atenuou esse efeito. Os animais que realizaram EFR não desenvolveram fibrose significativa, sugerindo um efeito protetor do exercício resistido contra a fibrose renal. A combinação de EFR e STATTIC não mostrou diferença significativa em comparação com os grupos individuais, indicando que ambos contribuem para melhorar a função renal. Com isso, os resultados sugerem que o EFR e o STATTIC, não concomitante, podem ser benéficos na melhoria da função renal induzida por ADM. Entretanto, mais estudos referentes ao efeito do EFR na estrutura muscular dos animais e a expressão de marcadores de lesão, serão realizados.

Palavras-chave: Doença renal crônica 1. Adriamicina 2. Exercício físico 3. Fibrose 4.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – VIA DE SINALIZAÇÃO E INIBIÇÃO DE STAT3	26
FIGURA 2 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	32

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CAPACIDADE DE CARGA DO GRUPO EFR.....	35
GRÁFICO 2 – VARIAÇÃO DE PESO CORPORAL.....	37
GRÁFICO 3 – RAZÃO ALBUMINA/CREATININA EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS E EFR.....	39
GRÁFICO 4 – FIBROSE EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS E EFR	40
GRÁFICO 5 – FIBROSE NEGATIVA E POSITIVA	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: GRUPOS EXPERIMENTAIS	31
--------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

DRC	- Doença renal crônica
ADM	- Adriamicina
GESF	- Glomeruloesclerose segmentar focal
MEC	- Matriz extracelular
OS	- Estresse oxidativo
SOD	- Superóxido dismutase
GSH	- Glutathione
NO	- Óxido nítrico
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
TFG	- Taxa de filtração glomerular
IL	- Interleucina
TNF	- Fator de necrose tumoral
TNFR	- Receptor de fator de necrose tumoral
IFN	- Interferon
TGF	- Fator de crescimento transformador
STAT	- <i>Signal transducers and activators of transcription</i>
GSK3 β	- Glicogênio sintase quinase 3 β
ILK	- Quinase ligada à integrina
IPP	- ILK, PINCH, Parvin
PAI-1	- Plasminogênio tecidual 1
JAK	- Janus quinase
SOCS	- Proteínas supressoras de sinalização de citocinas
STATTIC	- <i>Stat Three Inhibitory Compound</i>
ST	- STATTIC
EFR	- Exercício físico resistido
PCM	- Peso de carga máxima

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

™ - marca comercial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 HIPÓTESES.....	17
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivos específicos.....	17
1.3 JUSTIFICATIVA	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA	18
2.2 PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	20
2.2.1 Estresse oxidativo	20
2.2.2 Inflamação renal.....	21
2.2.3 Fibrose renal	23
2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO E INIBIÇÃO DO TRANSDUTOR DE SINALIZAÇÃO E ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO 3	25
2.4 EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO	28
3 METODOLOGIA	29
3.1 MODELO EXPERIMENTAL	29
3.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO.....	29
3.3 INDUÇÃO DA NEFROPATIA	30
3.4 INIBIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3	30
3.5 COLETA DE URINA E PESAGEM.....	31
3.6 DESENHO EXPERIMENTAL	31
3.7 EUTANÁSIA	32
3.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE ALBUMINA E CREATININA 33	
3.9 LÂMINAS HISTOLÓGICAS: COLORAÇÃO TRICRÔMICO DE MASSON.....	33
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 CARGA MÁXIMA	34
4.2 PESO CORPORAL	36
4.3 RAZÃO ALBUMINA/CREATININA URINÁRIA	38
4.4 FIBROSE RENAL.....	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	43
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é considerada um problema de saúde pública mundial, uma vez que a prevalência é de mais de 7%, para pacientes com idade entre 30 e 64 anos, e se eleva substancialmente ao aumento dos fatores de risco, que incluem *diabetes mellitus*, hipertensão, obesidade e envelhecimento. No Brasil, estima-se que mais de dez milhões de pessoas apresentam DRC, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia. Ademais, essa doença afeta a qualidade de vida do paciente e possui altos custos para os sistemas de saúde (ANDERSON et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; GLOBAL KIDNEY HEALTH ATLAS, 2023 ; AYODELE; ALEBIOSU, 2010).

A DRC é caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função renal. O estágio inicial da mesma é assintomático, o que dificulta o diagnóstico precoce. Com a progressão, entretanto, os pacientes começam a apresentar insuficiência renal e outras complicações, como comprometimentos cardiovasculares, anemia e doenças ósseas. Esse quadro pode culminar com a necessidade de tratamentos substitutivos, como a diálise e transplante renal, ou até mesmo progredir ao óbito (AMMIRATI, 2020; AYODELE; ALEBIOSU, 2010).

A inflamação crônica é um fenômeno comum da DRC, visto que, ocorre exposição persistente aos estímulos inflamatórios, como hipóxia, que desencadeiam danos teciduais e fibrose (GERMOLEC et al., 2018; PETRESKI et al., 2021; WANG et al., 2022). Associado ao processo inflamatório tem-se, a via de sinalização STAT3, que quando ativada vem sendo relacionada a progressão da DRC, em especial em um contexto de aumento de mediadores inflamatórios e eventos fibróticos (PANIZO et al., 2021).

Por outro lado, intervenções não farmacológicas podem oferecer melhora do quadro clínico e da qualidade de vida durante a DRC. Neste contexto, temos uma atividade que vem sendo relacionado à diminuição do processo inflamatório, o exercício físico resistido. Este contribui para a diminuição da inflamação, por reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma vêm sendo indicada a prática de exercício físico resistido para pacientes com DRC, uma vez que reduz a inflamação, evita a fibrose renal, melhora a qualidade de vida e traz benefícios para um melhor processo de diálise (LANG, 2005; GUADAGNIN; MÁZALA; CHEN, 2018; ANDERSON et al., 2009).

1.1 HIPÓTESES

Nossa hipótese é que a realização do exercício físico resistido e a inibição da via de sinalização STAT3 diminuam marcadores de lesão renal em modelo experimental de nefropatia.

1.2 OBJETIVOS

Analisar a ação do exercício físico resistido e da modulação da via de sinalização STAT3 em marcadores inflamatórios e fibróticos associados à lesão renal presentes em modelo experimental de nefropatia induzida por adriamicina.

1.2.1 Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros da nefropatia induzida por adriamicina como proteinúria e perda de peso antes, durante e após a indução da doença renal.

Avaliar marcadores inflamatórios e fibróticos no tecido renal por meio da análise histológica do córtex após a realização do exercício físico resistido e da inibição da via de sinalização STAT3 em modelo de nefropatia.

1.3 JUSTIFICATIVA

Ano após ano a prevalência estimada de pacientes com DRC se eleva, visto que o número de pacientes em diálise aumenta aproximadamente 2,5% por ano no Brasil. Além disso, mais de 80% desses pacientes tem o tratamento financiado pelo o sistema público de saúde. Vale ressaltar que os tratamentos disponibilizados não são capazes de estagnar ou curar o paciente. Dessa forma, esses dados explicam o fato dessa doença ser considerada um problema de saúde pública, uma vez que apresenta impasses socioeconômicos e de saúde (NERBASS et al., 2022; ALCALDE; KIRSZTAJN, 2018).

À medida que a DRC progride pelo aumento de inflamação crônica, a presença de disfunção tecidual e fibrose são observadas. Dessa forma, a via de sinalização STAT3, ativada pela interleucina (IL-) 6, desempenha papel central

nesse processo inflamatório, uma vez que se encontra aumentada tanto em modelo experimental quanto em pacientes com DRC. Em contrapartida, o exercício físico resistido auxilia na redução de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, em níveis plasmáticos, diminuindo, assim, a inflamação e possíveis danos teciduais (WANG et al., 2023; SOUZA et al., 2018).

Sabe-se que na DRC a fibrose renal é uma manifestação terminal, e um determinante da insuficiência renal por resultar em trauma do parênquima e perda irreversível da função renal. O que torna esse um parâmetro histológico de função renal, que está correlacionado com a diminuição da qualidade de vida do paciente (PANIZO et al., 2021; LIU, 2011). Entretanto, as análises histológicas de inflamação e fibrose renal em modelo animal, submetido à modulação da via de sinalização STAT3 em conjunto com o exercício físico resistido, ainda não foram exploradas no contexto da DRC.

Desta forma, esse estudo tem como objetivo analisar o quadro histológico da DRC, em especial o processo inflamatório e fibrótico frente a realização do exercício físico resistido e da modulação da via de sinalização STAT3 em modelo experimental de nefropatia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA

O modelo de nefropatia induzida por adriamicina (ADM) é considerado robusto com grau de lesão tecidual grave, possuindo mortalidade menor que 5%. Além disso, esse modelo é considerado, nos estudos realizados, adequado para testes de intervenções, que tendem a proteger contra a lesão renal, uma vez que é caracterizado pela indução da lesão em poucos dias depois da injeção da droga, sendo o momento da lesão consistente e previsível (LEE; HARRIS, 2011; WANG et al., 2015).

A indução da nefropatia depende de inúmeros fatores como espécie, sexo e idade, tendo a maioria das espécies de ratos e algumas de camundongos sensíveis aos efeitos da droga. Os camundongos BALB/c machos necessitam de uma dose única de 10 mg/kg via intravenosa, sendo assim esta é a linhagem mais utilizada (LEE; HARRIS, 2011).

Em camundongos BALB/c, este é um modelo experimental historicamente utilizado de DRC, por apresentar boa reprodutibilidade (WANG et al., 2015). O modelo apresenta inicialmente, lesão química seguida por alterações imunológicas e estruturais que mimetizam a glomeruloesclerose segmentar focal humana (GESF) (FOGO, 2014; ROSENBERG; KOPP, 2017).

A GESF é uma glomerulopatia e pode ser descrita por causar obstrução do lúmen capilar pela matriz, de forma que a obstrução ocorra em uma região específica do rim ou o órgão por completo. A doença pode ser causada por duas lesões diferentes, a primária e a secundária. A lesão primária é caracterizada por lesão podocitária e proteinúria bastante acentuada, causada por um fator circulante. Já a lesão que ocorre secundariamente é dita como: uma lesão comum às várias doenças renais progressivas crônicas, a qual pode estar associada a inúmeros fatores, como infecções, uso de drogas e respostas adaptativas secundárias, como o transplante renal. Dessa forma, essa doença causa lesões progressivas e irreversíveis que podem levar a DRC (FOGO, 2014; ROSENBERG; KOPP, 2017).

A adriamicina, utilizada para gerar a lesão, é uma antraciclina citotóxica, que pertence a uma classe de drogas antitumorais com ampla atividade em cânceres humanos, a qual é também utilizada na indução da nefropatia em modelos animais. Essa droga causa a lesão renal devido às alterações tanto na barreira de filtração glomerular, como em células endoteliais glomerulares, membrana basal glomerular e podócitos. Isso gera uma diminuição do glicocálix e da seletividade glomerular, além de aumentar os poros das células endoteliais e levar a fusão dos processos podais dos podócitos, em especial devido aos danos oxidativos na estrutura da célula. Esse dano pode ocorrer pela diminuição do radical semiquinona ou pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a esclerose glomerular focal e segmentar e em longo prazo uma esclerose global além de inflamação e fibrose tubulointersticial (FOGO, 2003; LEE; HARRIS, 2011).

As alterações graves podem ser visualizadas entre duas e quatro semanas após a injeção da droga. Dessa forma, algumas das manifestações incluem proteinúria e, como consequência, a redução do peso corporal. A albumina e a creatinina são as principais proteínas avaliadas, uma vez que são marcadores da lesão por adriamicina. Neste modelo, a proporção albumina/creatinina e a albuminúria demonstram um aumento substancial, que está intimamente ligado à

ativação de vias inflamatórias e progressão da fibrose (BRYANT et al., 2022; WANG et al., 2000; JEANSSON et al., 2008; FOGO, 2014; DOU et al., 2020).

2.2 PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica é caracterizada pela perda gradual da função renal, além da expansão mesangial, acúmulo de matriz extracelular (MEC), hipertrofia glomerular resultando em glomeruloesclerose e fibrose renal (TAKEDA et al., 1997; BIENAIMÉ et al., 2016).

Além disso, pacientes com DRC podem apresentar complicações, como disfunções cardiovasculares e inflamações recorrentes, causadas pelo estresse oxidativo e inflamação, os quais têm papel fundamental na progressão da doença (RAPA et al., 2019).

2.2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo (OS) é um estado de desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, o qual leva ao acúmulo de radicais livres oxidantes e redução da degradação desses radicais. O rim é um órgão metabolicamente muito ativo, o que o torna mais vulnerável aos danos oxidativos, uma vez que formam inúmeros radicais livres, que quando em desequilíbrio causam o OS (LIU et al., 2018; RAPA et al., 2019).

A formação e desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio ocorrem tanto na medula quanto no córtex renal, resultando em proteinúria e aumento de mediadores pró-inflamatórios. Estes desencadeiam uma resposta inflamatória que pode evoluir para fibrose renal. Dessa forma, a deficiência de antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e glutathione (GSH), responsáveis pela remoção de superóxidos e peróxidos das células, respectivamente, é observada em pacientes com doença renal crônica, sendo um exemplo desse desequilíbrio (RAPA et al., 2019; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Outra enzima responsável pelo estresse oxidativo, denomina-se óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a qual tem como função a produção de óxido nítrico (NO), que é capaz de promover a dilatação dos vasos quando presente no endotélio renal.

No entanto, o estado de estresse oxidativo é visto quando há uma falha, denominada desacoplamento, na eNOS. Tal desacoplamento ocorre devido à produção de ROS durante a transferência de elétrons no sítio ativo da enzima, a qual é desacoplada da oxidação da L-arginina. Esse evento resulta na produção de um ânion superóxido, que, por sua vez, combina-se com o óxido nítrico, gerando o peroxinitrito.

O desacoplamento pode ocorrer principalmente pela presença de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um análogo endógeno da L-arginina, que está associado à DRC, por inibir a produção de óxido nítrico pela eNOS. Com grande quantidade de peroxinitrito, há uma inibição da enzima, o que gera uma menor produção de óxido nítrico no endotélio renal, que resulta na vasoconstrição e redução da taxa de filtração glomerular (TFG), relacionando-se o desequilíbrio à DRC (RAPA et al., 2019).

2.2.2 Inflamação renal

A inflamação renal é uma das características da DRC que contribui no desenvolvimento, progressão e complicações da doença. Nesse caso, a inflamação presente é a inflamação crônica, a qual ocorre devido há uma longa exposição aos estímulos inflamatórios, como a hipóxia e o estresse oxidativo, que pode levar a danos teciduais e favorecer a fibrose (GERMOLEC et al., 2018; PETRESKI et al., 2021; WANG et al., 2022).

Em vista disso, os mediadores inflamatórios originados de células endoteliais e epiteliais recrutam células inflamatórias, como macrófagos, que liberam fator de crescimento para a ativação de fibroblastos, os quais podem desencadear eventos fibróticos (PANIZO et al., 2021). Entretanto, as células epiteliais tubulares podem não só recrutar células inflamatórias como sofrer alterações estruturais e fenotípicas. Isso faz com que essas células funcionem como células inflamatórias propriamente ditas, em quadros de hipóxia e inflamação, produzindo e liberando fatores pró-fibróticos (LIU et al., 2018).

As citocinas, como interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN) e o fator de crescimento transformador (TGF), são os principais marcadores de inflamação na DRC. Uma vez que, as citocinas são pequenas proteínas com função

de mensageiro e sinalização no sistema imunológico, quando ativado (PETRESKI et al., 2021).

As interleucinas são citocinas produzidas por uma vasta gama de células mesenquimais, endoteliais e fibroblastos. A IL-6 é a mais importante da superfamília em relação à DRC, uma vez que a sua síntese desregulada desencadeia inflamação crônica. A IL-6 é uma proteína produzida no estágio inicial da inflamação, promovendo a indução de proteínas de fase aguda e diferenciação de células da imunidade específica. Sendo assim, essa citocina regula respostas imunes inatas e adaptativas, de informações agudas e crônicas (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Em casos de DRC, quando a IL-6 está presente, essa se liga ao seu receptor (IL-6R) na membrana de células alvo, como por exemplo, as células tubulares, e então este complexo se remodela e têm como fim a ativação por fosforilação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), presente em situações de inflamação e fibrose renal (SCHELLER et al., 2011; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também é uma citocina responsável pela inflamação na DRC, entretanto é liberada especificamente pelos monócitos/macrófagos quando presentes em locais de inflamação. Ademais, os receptores de TNF (TNFR) têm diversas funções como: controle de regeneração do tecido e imunidade inata, conduzir a inflamação e o controle de morte celular. Logo, há um declínio na função renal quando níveis elevados de TNFR estão circulantes (WALLACH, 2017; PETRESKI et al., 2021).

Outro mediador importante é o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que regula a proliferação celular, podendo estimular ou inibir o crescimento celular, além de ter importante papel na homeostase das células imunes. Quando há o processo inflamatório as células endoteliais e epiteliais renais liberam mediadores inflamatórios, que recrutam células inflamatórias, as quais liberam o TGF- β . Após a liberação, esse fator induz a ativação de fibroblastos renais, que ocasiona a estimulação dos miofibroblastos para que produzam proteínas de matriz extracelular, o que corrobora com o aumento da expressão gênica de colágeno (PANG et al., 2010; PANIZO et al., 2021; LIU et al., 2017).

Sendo assim, esse fator é um dos principais reguladores que contribuem para a progressão da DRC desde a inflamação até a fibrose renal (PETRESKI et al., 2021).

2.2.3 Fibrose renal

A fibrose é um processo patológico originado de um reparo adaptativo mal sintetizado. Esse evento está diretamente relacionado à inflamação e regeneração tecidual. Ademais, a fibrose renal é uma manifestação terminal e um determinante da insuficiência renal comum por resultar em trauma do parênquima e perda irreversível da função renal, uma vez que se encontra um sistema desregulado (PANIZO et al., 2021; LIU, 2011).

A fibrose tubulointersticial dispõe da seguinte sequência de eventos: infiltração de células inflamatórias, ativação e sinalização de fibroblastos, produção e deposição de matriz extracelular, atrofia tubular, rarefação microvascular e hipóxia crônica (LIU, 2011).

O início do evento fibrogênico consiste na infiltração de células inflamatórias decorrentes da sinalização de citocinas. Nesse caso, os macrófagos pró-inflamatórios recrutados produzem quimiocinas e ROS. Esses danificam o tecido e estimulam a liberação de citocinas e fatores de crescimento, os quais ativam fibroblastos e induzem a transição das células epiteliais tubulares e endoteliais para células mesenquimais (RICARDO; VAN GOOR; EDDY, 2008; LIU, 2011).

Após o dano e a presença de citocinas e fibroblastos no local lesado, há a ativação dos miofibroblastos que podem ocorrer de diversas formas. Uma delas é pela ativação de fibroblastos intersticiais e diferenciação de pericitos vasculares. Sendo que, os fibroblastos adquirem um fenótipo de miofibroblasto quando expressam a alfa-actina de músculo liso (α SMA), uma proteína responsável pela cicatrização, remodelação tecidual e fibrose. Esses miofibroblastos são semelhantes às células musculares lisas e aos próprios fibroblastos ativados, pois são contráteis e produzem grande quantidade de componentes de MEC (LIU, 2011).

Já as células mesenquimais presentes no endotélio que fornecem estabilidade ao tecido são denominadas pericitos. Quando há lesão, normalmente por hipóxia, observa-se o desprendimento dos pericitos que migram, proliferam e diferenciam-se em miofibroblastos (LIU, 2011; SHAW et al., 2018).

Além desses, outros dois mecanismos induzidos normalmente por hipóxia, são capazes de dar origem aos miofibroblastos, mesmo que em menor quantidade, sendo o endotélio capilar e células tubulares responsáveis pela transição endotelial-mesenquimal e epitelial-mesenquimal, respectivamente (LIU, 2011; LEBLEU et al., 2013; WANG et al., 2022).

Estudos demonstraram que o mecanismo de transição endotelial-mesenquimal é incerto pela dificuldade de identificar os fibroblastos pela falta de marcadores específicos e pelas heterogeneidades fenotípicas (BARNES; GORIN, 2011; HUMPHREYS et al., 2010; LIU, 2011).

De acordo com Liu (2011), a origem de miofibroblastos ocorre de forma predominante pela proliferação local de fibroblastos teciduais e pela diferenciação de células-tronco mesenquimais em miofibroblastos, influenciado pelo TGF- β (LIU, 2011).

Além disso, as células epiteliais tubulares quando lesadas podem superexpressar Wnt1, que produz a proteína Wnt, a qual ativa fibroblastos, que contribuem para a fibrose. Essa sinalização sustentada justifica a ativação descontrolada de fibroblastos ativados, deposição de MEC e ativação do sistema renina-angiotensina (LIU, 2018).

Uma vez ativados, os miofibroblastos iniciam a produção de componentes de MEC intersticial em excesso, que resulta na formação de fibras colágenas, como colágeno tipo I e tipo III, e glicoproteínas, como a fibronectina. Além disso, é importante salientar, que a medula renal apresenta mais MEC que o córtex renal, sendo a primeira proporcionalmente mais afetada (BÜLOW; BOOR, 2019).

Para que haja uma maior deposição de MEC, dois fatores fibrinogênicos são essenciais, a angiotensina II e o TGF- β 1, pois estimulam a transcrição de genes de colágeno e fibronectina.

A angiotensina II atua nos receptores acoplados à proteína G nos rins e ativa o TGF- β 1. Esse fator de crescimento junto com a angiotensina II induzem a expressão de integrina β 1 e quinase ligada à integrina (ILK). A ILK realiza a montagem do complexo proteico ILK, PINCH, Parvin (IPP), o qual possibilita uma interação entre as actinas do citoesqueleto e as integrinas da MEC para a montagem extracelular da fibronectina. Uma vez que a ILK se liga a integrina β 1, a PINCH1 se liga a ILK, atuando como plataforma de ancoragem, e a proteína parvina

conecta-se a PINCH1 e a actina F do citoesqueleto (PANIZO et al., 2021; HAN et al., 2005).

Além disso, a superexpressão de ILK resulta na inativação por fosforilação do glicogênio sintase quinase 3β (GSK3 β), que consequentemente estabiliza a β -catenina, uma proteína que controla a transcrição da fibronectina e do inibidor do ativador do plasminogênio tecidual 1 (PAI-1). Quando o PAI-1 não está inibido, esse realiza o recrutamento de integrina e a ativação de ILK promovendo assim a expressão de colágeno I, promovendo a deposição de MEC (LIU, 2011).

Quanto aos mecanismos responsáveis pela consolidação da fibrose são observados: atrofia tubular, rarefação vascular e hipóxia crônica. A autodestruição excessiva das células tubulares por apoptose e transformação epitelial-mesenquimal, como já mencionado, são responsáveis por desencadear a atrofia tubular. Além de paradas do ciclo celular na fase G2/M, decorrentes da lesão tubular, que faz com que as células tubulares apresentem expressão aumentada de TGF- β , demonstrando outro efeito pró-fibrótico.

Já a redução do fluxo sanguíneo nos vasos, denominada rarefação microvascular, ocasionada pela perda de células endoteliais, que sofreram transição epitélio-mesenquimal, e pericitos também se faz presente na progressão da fibrose. Dessa forma, esse processo de redução do fluxo sanguíneo, além da inflamação, fibrose e estresse oxidativo, pode ocasionar a hipóxia crônica, que ativa a angiotensina II e os fibroblastos. A angiotensina II induz a transição epitelial-mesenquimal ou a apoptose celular e a deposição de MEC. Já os fibroblastos danificam capilares peritubulares e, também, induzem a deposição de MEC. Assim forma-se o ciclo de hipóxia crônica e insuficiência renal (LIU, 2011; WANG et al., 2022; LIU et al., 2017).

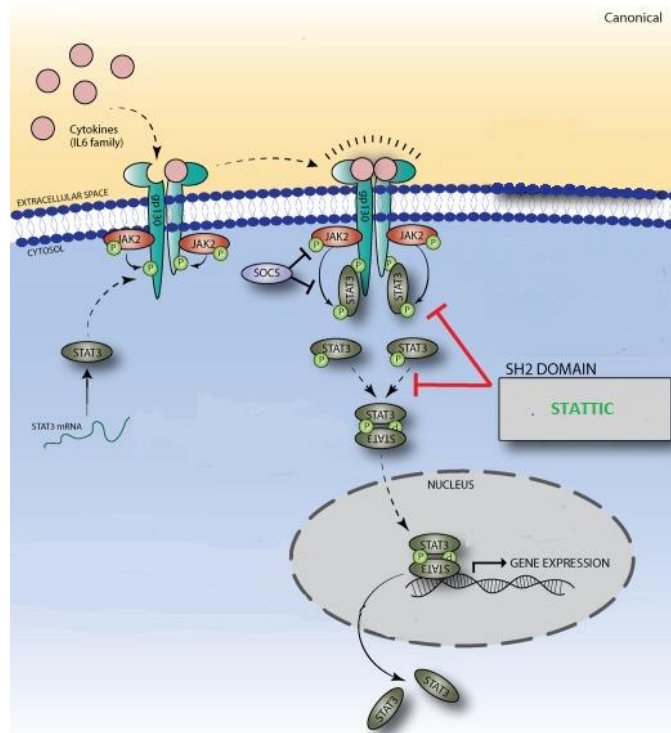
Com isso, o processo de fibrose reduz o suprimento sanguíneo, modifica reações bioquímicas das proteínas de matriz e arquitetura renal, prejudicando a função renal como um todo, visto que, a fibrose afeta desde a região túbulo-intersticial até os glomérulos e o sistema vascular, resultando na insuficiência renal irreversível (PANIZO et al., 2021; HUMPHREYS, 2018).

2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO E INIBIÇÃO DO TRANSDUTOR DE SINALIZAÇÃO E ATIVADOR DE TRANSCRIÇÃO 3

A STAT3 é um fator de transcrição e sua via de sinalização JAK/STAT apresenta uma variedade de processos celulares que incluem crescimento celular, diferenciação, proliferação, apoptose, angiogênese e respostas imunológicas. A via pode ser ativada por vários fatores como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e estresse oxidativo (TAKEDA et al., 1997; ARAKAWA et al., 2008; LEE et al., 2007; HUANG et al., 2007; ARANY et al., 2006).

Atualmente o modelo de sinalização JAK/STAT tem como principal ativador a IL-6, que se liga ao receptor de glicoproteína transmembrana do tipo I de citocinas e induz a dimerização dos receptores gp130. Essa dimerização resulta na ativação das tirosinas quinases Janus quinase (JAK) e, posteriormente, na fosforilação e dimerização da STAT3 citoplasmática, que é translocada para o núcleo. Esse evento promove a regulação da transcrição de genes específicos e ativa a expressão gênica (ARAKAWA et al., 2008) FIGURA 1.

FIGURA 1 – VIA DE SINALIZAÇÃO E INIBIÇÃO DE STAT3



FONTE: Modificada de PACE et al (2019).

Legenda: Representação da via de sinalização e inibição de STAT3. A via é ativada pela ligação de citocinas, como IL-6, ou fator de crescimento ao seu respectivo receptor, que gera a fosforilação e ativação das JAKs quinases. Esse evento resulta no recrutamento das proteínas STAT3 livres, que se ligam as fosfotirosinas do receptor intracelular, são fosforiladas e se dimerizam. Após a dimerização, as proteínas são translocadas para o núcleo, onde regulam genes alvo. Além disso, a droga

STAT3C, representada em verde, se liga ao domínio SH2 da STAT3, que gera o bloqueio da fosforilação, dimerização e translocação da STAT3 para o núcleo.

Os genes transcritos possuem papel relevante na progressão da DRC, pela modulação da fibrose renal e na comunicação das células tubulares e intersticiais pela elevada fosforilação e ativação de STAT3 nos túbulos renais com obstrução e fibrose (SCHELLER et al., 2011; PACE et al., 2019; PANG et al., 2010).

Quando há uma ligação entre as citocinas e seus respectivos receptores ocorre um rearranjo deste complexo para que as JAKs sejam reorganizadas e justapostas, e assim, ocorra fosforilação e consequentemente sua ativação. Com isso, é possível vislumbrar que apenas uma reorganização no complexo receptor-ligante é necessária para iniciar a sinalização intracelular responsável pela ativação da via STAT3, seguida de respostas inflamatórias e, uma possível fibrose na DRC (SCHELLER et al., 2011).

Um estudo, utilizando inibidor seletivo de STAT3, apresentou evidências de que a ativação da via de sinalização STAT3 é crucial para a expressão de TGF- β e do seu receptor, os quais são responsáveis pela infiltração de leucócitos e ativação e proliferação de fibroblastos na inflamação e fibrose (PANG et al., 2010).

Além dos fibroblastos, os miofibroblastos, decorrentes da fase de ativação da fibrose também expressam STAT3. Isso indica que a ativação da via de sinalização STAT3 desempenha um papel de extrema importância no aumento quantitativo de miofibroblastos, quando comparado com rim humano saudável. Outra correlação importante, que vale mencionar, é o grande número de células glomerulares com a via de sinalização STAT3 ativada, as quais apresentam também, vasto grau de inflamação e fibrose intersticial. O que demonstra a importância da ativação dessa via na lesão renal (ARAKAWA et al., 2008; BIENAIMÉ et al., 2016).

A sinalização da via STAT3 se mostrou aumentada também em glomérulos de pacientes com DRC. Segundo Takeda et al (1997) a sinalização da via STAT3 é encontrada aumentada em biópsia renal, além de ser encontrada também lesão podocitária e proliferação de células glomerulares (TAKEDA et al., 1997; ARAKAWA et al., 2008).

As proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS) são responsáveis por regular a via STAT3, visto que essas proteínas são induzidas logo

que a STAT é ativada por alguma citocina. O mecanismo desenvolvido pela SOCS1 responsável pela regulação da STAT3 é realizado por feedback negativo. A proteína supressora se liga na JAK bloqueando a ativação do complexo JAK/STAT3 (ENDO et al., 1997).

Já a inibição da STAT3 contribui para reduzir a proliferação de fibroblastos intersticiais e, conseqüentemente, inibe a produção excessiva de MEC (PANG et al., 2010).

Lu et al. (2009), realizou um estudo em camundongos com mutação homozigótica, alterando serina para alanina no resíduo 727 – sitio de fosforilação da proteína STAT3 -, o que impediu a ativação por fosforilação de STAT3 e sua atividade. Essa mutação, conseqüentemente, foi capaz de reduzir a albuminúria, expansão do mesângio renal e acúmulo de colágeno, quando comparado com os animais não mutados (LU et al., 2009).

Esse bloqueio pode ser realizado pelo inibidor seletivo *Stat Three Inhibitory Compound* (STATTIC), uma molécula pequena sintetizada para se ligar ao domínio SH2 da STAT3 e promover o bloqueio da fosforilação, dimerização e translocação para o núcleo da STAT3 (SCHUST et al., 2006). Logo, o bloqueio da via de sinalização STAT3 pode ser visto como uma possibilidade de abordagem terapêutica em pacientes com glomerulonefrite (ARAKAWA et al., 2008).

2.4 EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO

Antigamente, a prática de exercício físico não era recomendada para pacientes com DRC, pois se acreditava na possibilidade de uma piora maior da função renal ocasionada pela atividade simpática durante o exercício físico que diminui o fluxo sanguíneo renal. Atualmente, entretanto, estudos vêm demonstrando que praticar exercício físico não altera a taxa de filtração glomerular, mas pode diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, a qual é descrita como ativador de STAT3 (VILLANEGO et al., 2020; DI RAIMONDO et al., 2016). Dessa forma, a prática do exercício físico resistido pode ser recomendada, visto que é possível que o mesmo diminua o quadro inflamatório e a perda de massa e força muscular, gerados pela sinalização de STAT3 na DRC (LANG, 2005; GUADAGNIN; MÁZALA; CHEN, 2018).

A prática de exercício físico apresenta benefícios em diferentes quadros de caráter crônico, como obesidade, diabetes e DRC. Durante o curso da doença renal, alterações de componentes do sistema inflamatório estão presentes. A fim de contrabalancear estes efeitos, a prática de exercício físico resistido pode promover a redução de inflamação e fibrose tanto em modelos de animais quanto em humanos (SOUZA et al., 2018; TESTA et al., 2022).

Trabalhos com pacientes com DRC apontam os benefícios do EFR referente à melhora dos parâmetros como a saúde cardiovascular, aumento da massa muscular e da força muscular. Além disso, o EFR com cargas progressivas pode induzir a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Por isso, a falta de atividade física e a desnutrição são consideradas preocupantes quando associadas aos pacientes com DRC (NOOR; REID; SLEE, 2021).

3 METODOLOGIA

3.1 MODELO EXPERIMENTAL

Para esse experimento foram utilizados machos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c, originários do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os animais foram mantidos no biotério durante todo o experimento, em caixas com água e comida, sem restrição, em ciclo artificial claro/escuro de 12 horas/12 horas, e temperatura constante.

Os procedimentos realizados foram aprovados 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. Além de serem realizados com base na lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal.

3.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO

O protocolo de EFR foi adaptado de estudo presente na literatura (HORNBERGER JR.; FARRAR, 2004). Inicialmente, os camundongos foram submetidos a um período de adaptação antes do esforço físico e em seguida iniciou-se o protocolo de EFR com duração de 12 semanas. Para a adaptação, os animais

foram estimulados a subir a escada três vezes até alcançarem o topo, sem peso preso na cauda e com um intervalo de dois minutos entre as escaladas.

Após a adaptação, os camundongos foram submetidos a um teste de peso de carga máxima (PCM), o qual consiste em no máximo seis subidas ou até que o camundongo não conseguisse alcançar 90% da altura total da escada. Após cada subida cargas mais pesadas eram anexadas à cauda dos animais. No primeiro teste, a carga inicial foi fixada em 75% do peso corporal de cada animal, com um aumento progressivo de cinco gramas para cada subida subsequente e um intervalo de dois minutos entre as subidas. O valor base utilizado para os testes seguintes foi sempre a última soma de todos os pesos erguidos por cada camundongo. Esse teste de PCM foi realizado na primeira, quarta, oitava e décima segunda semanas de protocolo. Esse teste foi realizado para padronizar o peso fixado na cauda de cada animal.

O valor inicial de cada novo teste partiu do valor de 75% do último teste de PCM como primeira carga. Os animais fizeram o protocolo de EFR de 12 semanas, três dias por semana, intercalando-os. A carga de cada camundongo variou de 40 a 60% do PCM anteriormente realizado, para que fosse possível representar uma carga de treino de moderada intensidade, como recomendado para pacientes com doença crônica durante os estudos de tratamento com exercícios.

Desse modo, a cada dia do protocolo os animais realizaram um total de 20 escaladas, com dois minutos entre cada tentativa.

3.3 INDUÇÃO DA NEFROPATIA

Para o desenvolvimento da nefropatia em modelo animal experimental, foi utilizado o quimioterápico adriamicina (ADM, - Adriblastina®) com dose única de 10 mg/kg via intravenosa caudal de adriamicina da marca Pfizer (Pfizer™, Inc. Nova Iorque, USA) (WANG et al., 2015; LEE; HARRIS, 2011).

3.4 INIBIÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO STAT3

A via de sinalização STAT3 foi inibida pela droga STATTIC da marca Abcam (Abcam™, Inc., Cambridge, MA). As cinco aplicações foram realizadas após a

indução da nefropatia com dose de 2 mg/kg por via intravenosa caudal nos dias 3, 6, 10, 14 e 21 após a injeção de ADM.

3.5 COLETA DE URINA E PESAGEM

Nos dias 0, 4, 7, 14, 21 e 28, após a indução da ADM foram realizadas as coletas de urina e a pesagem dos animais.

Para a coleta de urina foram utilizadas caixas de acrílico com três placas de 96 poços novas, para cada animal, com restrição de água e comida, enquanto no momento de coleta.

Para a pesagem dos animais foi utilizada balança de precisão e um becker de 500 mL para comportar o animal, enquanto na balança, no momento da averiguação do valor.

3.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em dois grupos principais, de acordo com a realização (grupo EFR) e não realização do protocolo de exercício físico resistido (grupo sedentário). Além disso, estes dois grupos foram divididos em quatro subgrupos, de acordo com a administração das drogas, adriamicina e STATTIC, sendo divididos em: grupo 1) Controle, grupo 2) Adriamicina (ADM), grupo 3) Adriamicina + STATTIC (ADM+ST), grupo 4) STATTIC (ST). Os grupos e subgrupos são ilustrados na tabela abaixo TABELA 1.

TABELA 1: GRUPOS EXPERIMENTAIS

Subgrupos	Protocolo	
	EFR	Sedentário
Controle (<i>n</i>)	10	10
ADM (<i>n</i>)	10	10
ADM + ST (<i>n</i>)	10	10

ST (n)	10	10
--------	----	----

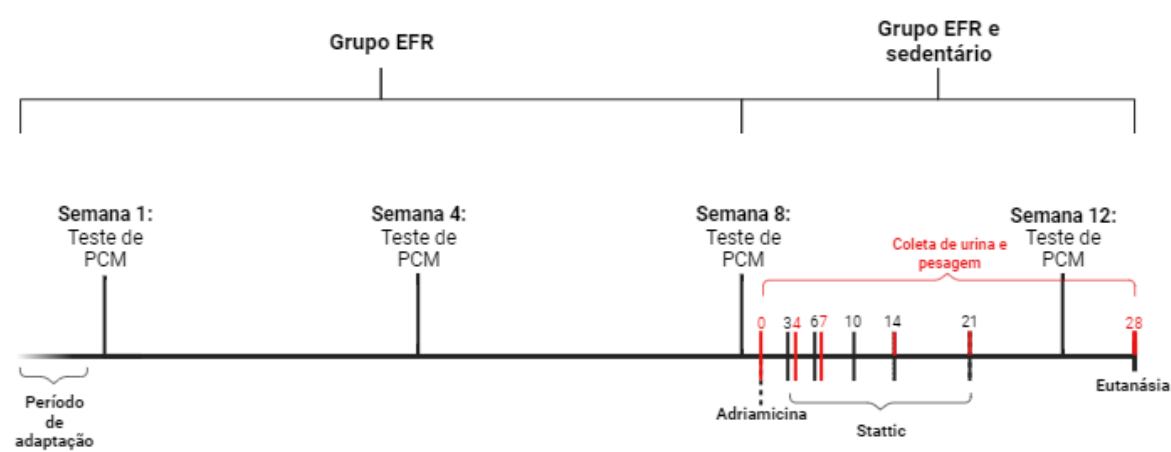
FONTE: SEIBT, P. M. (2023)

Os animais do grupo EFR foram submetidos ao protocolo de EFR, o qual durou 12 semanas, 3 dias por semana, em dias intercalados. Já o grupo sedentário permaneceu em caixas no Biotério durante as 12 semanas.

Em relação aos subgrupos, na oitava semana do protocolo de EFR, foi induzida a DRC via adriamicina nos subgrupos ADM e ADM + ST, em ambos os grupos (EFR e sedentário). Após a indução da adriamicina, houve a coleta de urina e a pesagem de todos os animais nos dias 0, 4, 7, 14, 21 e 28.

A inibição da via STAT3 ocorreu por meio da administração de STATTIC realizada nos dias 3, 6, 10, 14 e 21, após a indução da DRC, nos subgrupos ADM + ST e ST, em ambos os grupos (EFR e sedentário). Além disso, para simular o estresse nos subgrupos controles, que não receberam as drogas, fora administrada salina. Após 28 dias de acompanhamento os animais foram eutanasiados FIGURA 2.

FIGURA 2 – DESENHO EXPERIMENTAL



FONTE: SEIBT, P. M. (2023).

LEGENDA: A representação contempla os períodos de adaptação, protocolo de treinos de exercício físico resistido (EFR), testes de peso de carga máxima (PCM), administração das drogas, coleta de urina e pesagem e eutanásia, de acordo com as semanas e grupos envolvidos.

3.7 EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada 28 dias após a indução da nefropatia pela administração da ADM. Dessa forma, os animais foram eutanasiados com uma solução composta por xilazina (16 mg/kg) e cetamina (150 mg/kg), administrada via intraperitoneal e, posteriormente, foi realizada a coleta do rim direito de cada animal.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE ALBUMINA E CREATININA

A excreção urinária de albumina foi determinada por eletroforese com gel SDS-poliacrilamida a 10% (BRUNELLE; GREEN, 2014). As amostras de urina, primeiramente, foram diluídas com água destilada, e depois preparadas e processadas. As urinas foram diluídas a 5% e o padrão de albumina foi diluído a 10%. No preparado das amostras foi utilizado β -mercaptanol, agente redutor de pontes dissulfeto, que permite a desnaturação de proteínas e a passagem da amostra pelo gel durante a corrida. Em seguida, foi utilizado o corante Azul de Comassie para a coloração do gel. Por fim, foi feita a quantificação da albumina no fotodocumentador Amersham Imager 600 GE®.

A dosagem de creatinina urinária foi realizada utilizando o método de Jaffe modificado, com o kit da marca Labtest Diagnóstica S.A.®, que apresenta um índice de correção para minimizar interferentes. Esse método 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.

3.9 LÂMINAS HISTOLÓGICAS: COLORAÇÃO TRICRÔMICO DE MASSON

Após a eutanásia, o rim direito de cada animal foi retirado e seccionado longitudinalmente separando-o em duas porções. Após o corte, o órgão foi colocado em formol (10% v/v) por 48 horas. Depois deste tempo, foi lavado com água e colocado em álcool (70% v/v) até o momento que foi emblocado.

O emblocamento do órgão foi realizado 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 MEC e a avaliação do grau de fibrose intersticial (BÜLOW; BOOR, 2019).

Foram preparadas e coradas oito lâminas, cada uma representando um subgrupo (Sedentários: Controle, ADM, ADM+ST, ST; EFR: Controle, ADM, ADM+ST, ST) e em cada lâmina continha cinco cortes renais de diferentes animais do mesmo grupo. Para a análise foram capturados 20 campos aleatórios, com microscópio Olympus BX51, de cada corte histológico do córtex renal, que posteriormente foram analisadas. Sendo assim, os parâmetros da fibrose avaliados foram: a membrana basal espessa 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% quando houveram alterações leves; de 10 a 50% quando apresentaram alterações moderadas; acima de 50% quando dispuseram de intensas alterações.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de diferença entre as capacidades de carga erguida pelos animais foram submetidos a uma análise de Anova de medidas repetidas. Já os dados de variação de peso corporal dos animais foram obtidos em porcentagem e analisado por Anova de duas vias com teste de Tukey, sendo, para ambos, considerado significativo o valor de $p < 0.05$.

A razão albumina/creatinina foi submetida à análise estatística Anova não paramétrica com teste de Kruskal Wallis e posthoc de Dunn. Os dados referentes à fibrose, também, foram analisados entre grupos através de Anova não paramétrica com teste de Kruskal Wallis com múltiplas comparações, sendo considerado para as análises significativo o valor de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARGA MÁXIMA

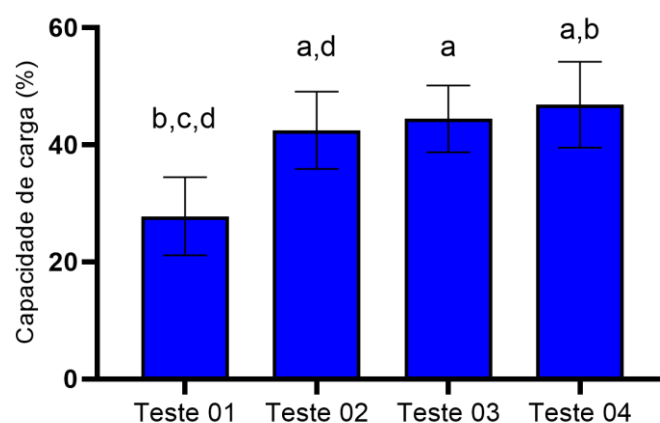
Ao analisar a carga máxima elevada pelos animais, foi observado um aumento progressivo da capacidade de carga, quando observados os testes 1, 2 e

4, exceto o terceiro teste (último do protocolo de exercício) que não apresentou variação em comparação com o segundo e quarto testes, de acordo com o GRÁFICO 1.

Dessa forma, fica evidente o aumento progressivo de carga sustentado pelos animais. Da mesma forma, ratos machos Munich-Wistar em modelo experimental de DRC submetidos à EFR demonstraram a eficácia do EFR por apresentarem um aumento da força muscular mesmo com a doença (SOUZA et al., 2018).

No modelo animal de tumor de Ehrlich, também foi possível observar essa progressão, pois os camundongos que passaram pelo exercício físico apresentaram um aumento da carga máxima, o que demonstra que o EFR é capaz de proteger, inclusive, contra a perda de força e massa muscular concomitante ao tumor (TESTA et al., 2022). Outro estudo realizado com pacientes com DRC submetidos ao EFR, com duração de 12 semanas, demonstrou em seus resultados o aumento da força muscular e capacidade funcional dos pacientes (HEADLEY et al., 2002). Com esses resultados é notória a importância da aplicação do EFR com cargas progressivas para uma melhora na qualidade de vida dos pacientes.

GRÁFICO 1 – CAPACIDADE DE CARGA DO GRUPO EFR



FONTE: SEIBT, P. M. (2023).

LEGENDA: Aumento progressivo da capacidade de carga de animais submetidos ao exercício físico resistido. n= 5 animais por grupo, valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média, a = diferença de carga quando comparado ao teste 1, b = diferença de carga quando

comparado ao teste 2, c = diferença de carga quando comparado ao teste 3, d = diferença de carga quando comparado ao teste 4, $p < 0,05$.

4.2 PESO CORPORAL

A perda de peso corporal foi uma das alterações encontradas nos camundongos, sendo essa uma das características e morbidade mais comum vista em modelo animal de nefropatia induzida por adriamicina (LEE; HARRIS, 2011).

Ao analisar o GRÁFICO 2-A é notável, que, sete dias após o início do protocolo de drogas há uma redução de peso corporal dos animais sedentários submetidos à administração de ADM e dos animais que receberam ambas as drogas, ou seja, ADM e STATTIC.

Quando observado o grupo de camundongos ADM submetidos ao EFR, esses demonstraram uma redução na perda de peso, que se torna mais evidente quando analisados em conjunto com os grupos sedentários ADM e ADM+ST, os quais apresentaram uma perda de peso elevada, nos dias 7, 14, 21 e 28 do protocolo, quando analisado o GRÁFICO 2 A-D.

Por outro lado, os animais sedentários ADM+ST demonstraram uma intensa perda de peso corporal quando comparados com os grupos controles (sedentários e EFR) e com os grupos ST (sedentários e EFR). Essa diferença foi observada em todos os dias analisados – 7, 14, 21, 28 dias, no GRÁFICO 2 A-D. Ademais, é possível constatar uma redução na perda de peso dos animais que receberam ADM (sedentários e EFR) em comparação com os camundongos sedentários ADM+ST, conforme demonstrado no GRÁFICO 2-D.

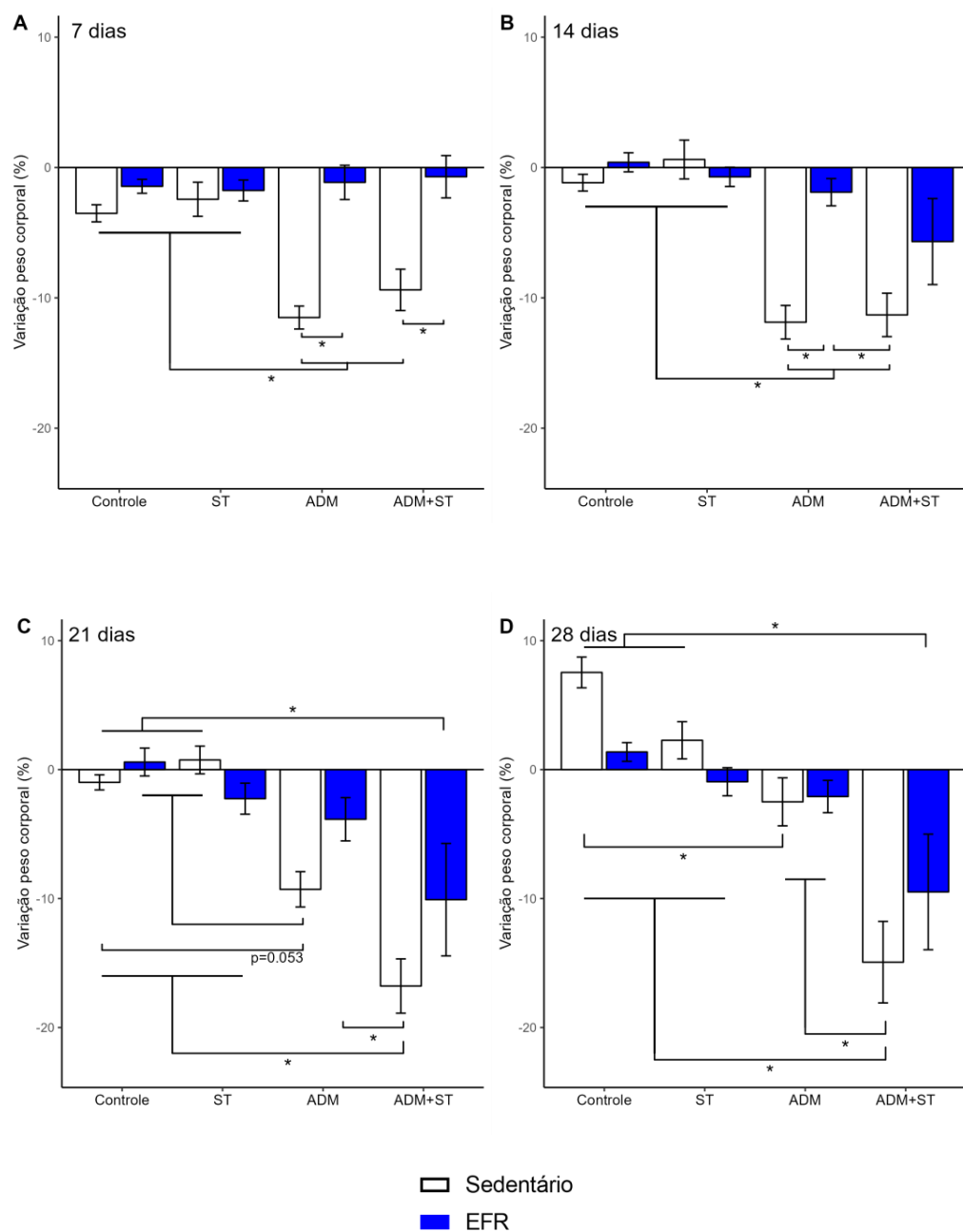
Desse modo, observou-se que a adriamicina enfraquece os animais logo nos primeiros dias de administração da droga, como evidenciado pela perda de peso. No 14º dia o menor peso corporal é atingido, no entanto, nos dias que se sucedem verifica-se uma recuperação sistêmica nos camundongos, visto em outros modelos de nefropatia como estudos com camundongos C57BL/6 e BALB/c (WANG et al., 2000; PEREIRA et al., 2012; BRYANT et al., 2022).

Apesar disso, o exercício físico resistido foi capaz de manter ou ao menos impedir uma perda drástica de peso dos animais, de mesmo modo que é visto no modelo de camundongos Swiss machos com câncer de mama submetidos à EFR (TESTA et al., 2022). Dessa forma, é possível avaliar que o exercício físico contribui

na atenuação da perda de peso corporal dos animais mesmo em quadros aversivos, como DRC.

Com isso, esses resultados demonstram que mesmo após a injeção de ADM, a qual contribui na redução do peso corporal pela lesão renal causada, o EFR previne a queda de peso dos camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico resistido.

GRÁFICO 2 – VARIAÇÃO DE PESO CORPORAL



FONTE: SEIBT, P. M. (2023).

LEGENDA: Variação de peso corporal em porcentagem dos animais sedentários e EFR, visto que ocorre uma redução ocasionada pela adriamicina e uma manutenção do peso pelo EFR. A- Animais sedentários e EFR no dia 7 do protocolo; B- Animais sedentários e EFR no dia 14 do protocolo; C- Animais sedentários e EFR no dia 21 do protocolo; D- Animais sedentários e EFR no dia 28 do protocolo. n= 10 animais por grupo, valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média, * = $p < 0,05$.

4.3 RAZÃO ALBUMINA/CREATININA URINÁRIA

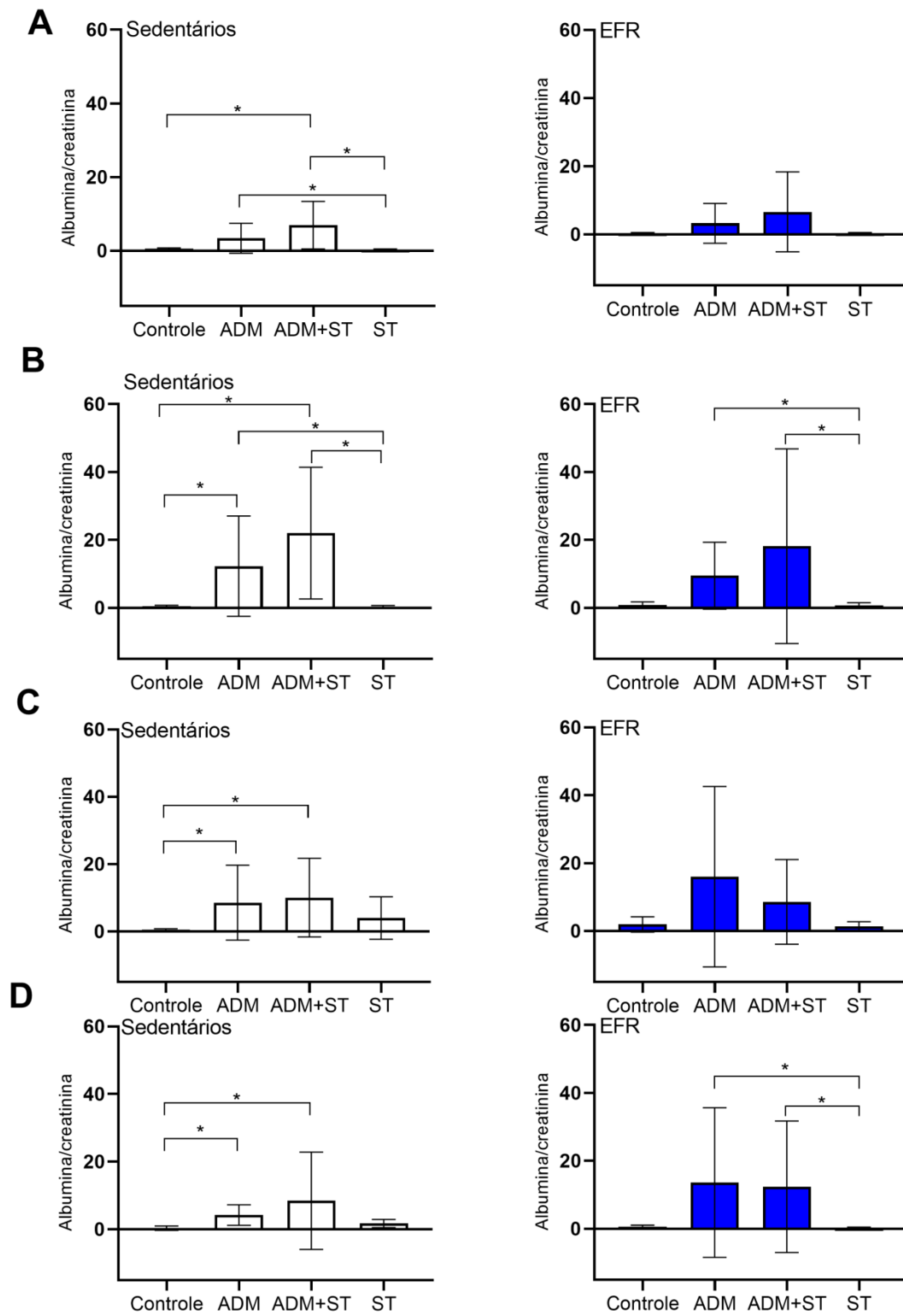
No que diz respeito à razão albumina/creatinina, representada no GRÁFICO 3, observa-se que os subgrupos do grupo sedentário obtiveram diferenças significativas nos quatro dias analisados, enquanto os subgrupos do grupo EFR exibiram algumas diferenças apenas nos dias 14 e 28 do protocolo.

Foi possível observar, até o 14º dia do protocolo, um aumento de proteinúria nos grupos sedentários ADM e ADM+ST em comparação com o grupo sedentário que recebeu STATTIC, como evidenciado no GRÁFICO 3-A e 3-B. Além disso, foi possível identificar um aumento significativo da razão albumina/creatinina nos camundongos sedentários, que receberam ADM e ADM+ST, quando comparados com o controle, conforme GRÁFICO 3 A-D.

Por outro lado, os grupos que foram submetidos ao exercício físico resistido apresentaram resultados significativos apenas nos dias 14 e 28 do protocolo. Nestes dias, os grupos EFR ADM e EFR ADM+ST dispuseram de uma razão albumina/creatinina maior que o grupo EFR ST, como rerepresentado no GRÁFICO 3-B e 3-D.

Os resultados demonstram que o tratamento com adriamicina causa um aumento da proteinúria nos animais a partir do sétimo dia do protocolo, como é vislumbrado em outros estudos com camundongos (WANG et al., 2000; JEANSSON et al., 2008; LEE; HARRIS, 2010; PEREIRA et al., 2012). Dessa forma, se faz importante salientar, que a albumina não é comumente encontrada na urina, portanto, a presença de albuminúria, indica a extensa lesão podocitária presente nos animais submetidos a nefropatia induzida por adriamicina, quadro condizente com DRC. Além disso, observou-se que a nefropatia apresentou progressão rápida e boa reprodutibilidade nos camundongos, como visto em outros trabalhos (PEREIRA, 2012; WANG et al., 2015).

GRÁFICO 3 – RAZÃO ALBUMINA/CREATININA EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS E EFR



FONTE: SEIBT, P. M. (2023).

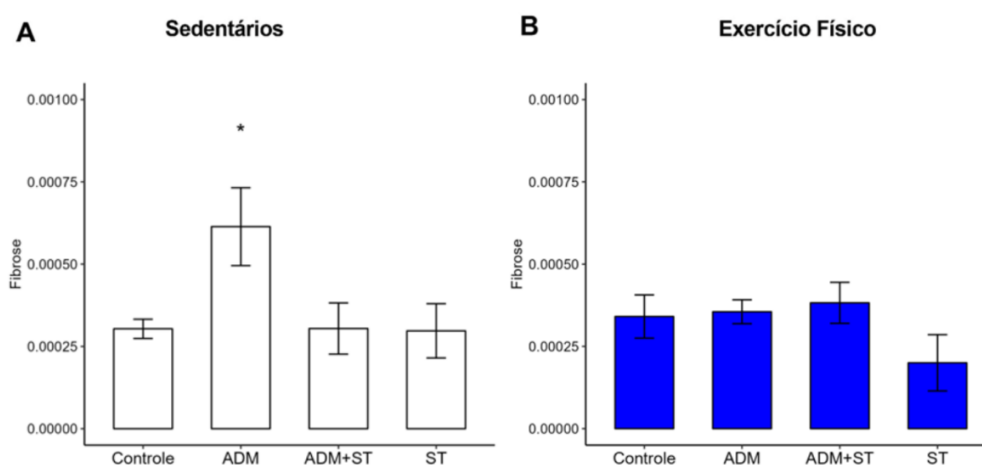
LEGENDA: O aumento da razão albumina/creatinina dos animais sedentários e EFR é ocasionada pela adriamicina. A- Representação de sedentários e EFR no dia 7 do protocolo; B- Representação de animais sedentários e EFR no dia 14 do protocolo; C- Representação de animais sedentários e EFR no dia 21 do protocolo; D- Representação de animais sedentários e EFR no dia 28 do protocolo. n= 10 animais por grupo, valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média, * = $p < 0,05$.

4.4 FIBROSE RENAL

Após a análise dos dados do grupo de animais sedentários, que receberam ADM, pode-se afirmar que houve a presença de fibrose significativa, o que demonstra a eficácia na indução de nefropatia pela ADM. Entretanto, a fibrose foi atenuada devido ao tratamento realizado com o inibidor seletivo STATTIC, conforme apresentado no GRÁFICO 4.

Os resultados obtidos sustentam as conclusões do estudo realizado por Bienaimé et al. (2016), que destacou o papel da ativação da via STAT3 na DRC, uma vez que resulta no aumento de fibroblastos e matriz intersticial, contribuindo para a formação da fibrose tubulointersticial. Além disso, o trabalho também elucidou a importância da inativação da via STAT3, que leva a uma redução da fibrose mesmo que os animais apresentem DRC. Dessa forma, os resultados referentes à fibrose, principalmente no grupo sedentário ADM+STATTIC indica que mesmo com a injeção de ADM, a qual contribui no processo de inflamação e fibrose pela nefropatia, o STATTIC mitiga a fibrose dos animais tratados com a mesma.

GRÁFICO 4 – FIBROSE EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS E EFR



FONTE: SEIBT, P. M. (2023).

LEGENDA: A administração de STATTIC atenua a fibrose renal induzida em animais tratados com ADM. A- avaliação de fibrose em animais sedentários, B-avaliação de fibrose em animais submetidos ao exercício físico. n= 5 animais por grupo, valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média, * = $p < 0,05$.

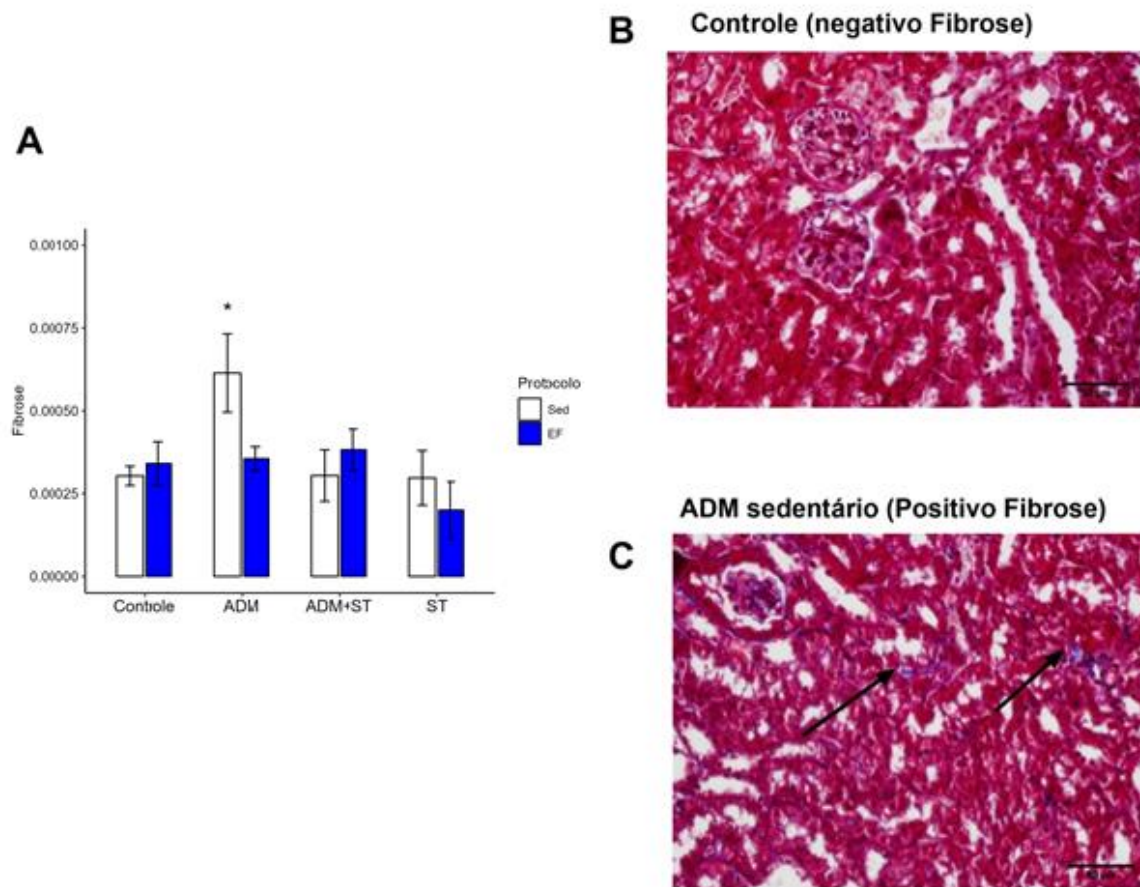
Conforme demonstrado no GRÁFICO 4-B os animais que realizaram o exercício físico resistido não desenvolveram fibrose significativa quando comparado com grupos sedentários que apresentaram nefropatia induzida por ADM. Da mesma forma, em modelo de ratos machos Munich-Wistar com DRC, submetidos ao treinamento resistido, foi observado a eficácia do EFR pela redução da fibrose quando comparados os grupos sedentários e exercício resistido (SOUZA et al., 2018).

Além disso, quando comparados todos os grupos, como elucidado no GRÁFICO 5, não houve diferença significativa entre o grupo de animais que realizaram EFR e tratados com STATTIC, de forma concomitante, com os outros grupos. Entretanto, foi observado que o grupo de animais que realizou atividade física e o grupo tratado com STATTIC, de maneira separada, apresentaram uma redução da fibrose quando comparado com os outros grupos.

Em outros modelos animais, como de infarto do miocárdio com camundongos C57BL/6J machos selvagens e knockout *para Fgf21*, e diabetes tipo 2 em camundongos db/db, também, foi observada a redução de fibrose, com a submissão dos animais à atividade física, demonstrando um efeito benéfico do EFR de proteger o sistema renal da fibrose (MA et al., 2021; MENGZHU et al., 2023).

Com isso, os resultados sugerem que tanto o exercício físico resistido quanto o tratamento com o bloqueador seletivo STATTIC, de forma separada, contribuem para uma melhora na função renal.

GRÁFICO 5 – FIBROSE NEGATIVA E POSITIVA



FONTE: SEIBT, P. M. (2023).

LEGENDA: Comparação entre todos para fibrose. A= gráfico de comparação entre todos os grupos, B= animal do grupo controle com resultado negativo para fibrose, C= animal do grupo adriamicina sedentário com resultado positivo para fibrose. n= 5 animais por grupo, valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média, * = $p < 0,05$.

Correlacionando todos os dados de perda de peso corporal, razão albumina/creatinina e fibrose é evidente que a nefropatia induzida por adriamicina é bem estabelecido em camundongos machos da linhagem BALB/c, por ser uma linhagem geneticamente homogênea, proporcionando boa reprodutibilidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos pelo estudo, conclui-se que o protocolo de exercício físico resistido se demonstrou eficaz, levando a um aumento significativo na capacidade de carga. Além disso, o exercício é uma proteção contra a lesão renal induzida pela ADM, uma vez que o peso corporal dos camundongos

submetidos ao protocolo de exercício não apresentou redução significativa em decorrência da lesão renal.

O exercício físico resistido, também, previne a lesão renal induzida pela ADM, uma vez que os camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico apresentaram uma redução da fibrose renal. Ademais, o tratamento com STATTIC se demonstrou eficaz, atenuando a fibrose de forma significativa no grupo submetido à nefropatia por ADM.

Com isso, pode-se afirmar que o modelo de EFR e o tratamento com STATTIC, não de forma concomitante, se apresentaram benéficos contra a fibrose presente no modelo de lesão renal induzida por adriamicina.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para confirmação do papel do exercício físico na progressão da nefropatia induzida por adriamicina, iremos avaliar o efeito do EFR na estrutura muscular dos animais, avaliar a expressão de marcadores de lesão por PCR em tempo real e análise de imuno-histoquímica.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AMMIRATI, A. L. Chronic Kidney Disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, n. suppl 1, p. s03–s09, 2020.
- ANDERSON, S. et al. Prediction, Progression, and Outcomes of Chronic Kidney Disease in Older Adults. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 6, p. 1199–1209, 1 jun. 2009.
- ARAKAWA, T. et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 11, p. 3418–3426, 1 nov. 2008.
- ARANY, I. et al. STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells. **Kidney International**, v. 70, n. 4, p. 669–674, ago. 2006.
- AYODELE, O. E.; ALEBIOSU, C. O. Burden of Chronic Kidney Disease: An International Perspective. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 17, n. 3, p. 215–224, maio 2010.
- BARNES, J. L.; GORIN, Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. **Kidney International**, v. 79, n. 9, p. 944–956, maio 2011.
- BIENAIMÉ, F. et al. Stat3 Controls Tubulointerstitial Communication during CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 12, p. 3690–3705, 6 maio 2016.
- BRUNELLE, J. L.; GREEN, R. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). **Methods in Enzymology**, v. 541, p. 151–159, 2014.

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.

DI RAIMONDO, D. et al. Preventive and Therapeutic Role of Muscle Contraction Against Chronic Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 30, p. 4686–4699, 7 set. 2016.

DOU, Y. et al. Baicalin alleviates adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis and proteinuria by inhibiting the Notch1-Snail axis mediated podocyte EMT. **Life Sciences**, v. 257, p. 118010, 15 set. 2020.

ENDO, T. A. et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 921–924, 26 jun. 1997.

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

FOGO, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 76–87, 2 dez. 2014.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of Inflammation. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1803, p. 57–79, 2018.

GLOBAL KIDNEY HEALTH ATLAS. [S. l.: s. n.], 2023. **International Society of Nephrology**. Disponível em: <<https://www.theisn.org/initiatives/global-kidney-health-atlas/>>. Acesso em: 22 e maio., 2023.

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.

HAN, S. Y. et al. High glucose and angiotensin II increase $\beta 1$ integrin and integrin-linked kinase synthesis in cultured mouse podocytes. **Cell and Tissue Research**, v. 323, n. 2, p. 321–332, 28 set. 2005.

HEADLEY, S. et al. Resistance training improves strength and functional measures in patients with end-stage renal disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 2, p. 355–364, ago. 2002.

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, 1 fev. 2004.

HUANG, J.-S. et al. Antioxidants attenuate high glucose-induced hypertrophic growth in renal tubular epithelial cells. **American Journal of Physiology-renal Physiology**, v. 293, n. 4, p. F1072–F1082, 1 out. 2007.

HUMPHREYS, B. D. et al. Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 1, p. 85–97, jan. 2010.

HUMPHREYS, B. D. Mechanisms of Renal Fibrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 80, n. 1, p. 309–326, 10 fev. 2018.

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, 10 dez. 2008.

LANG, R. Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection. **Immunobiology**, v. 210, n. 2-4, p. 63–76, ago. 2005.

LEBLEU, V. S. et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1047–1053, 30 jun. 2013.

LEE, V. W. S.; HARRIS, D. C. H. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology** 16, 30-38. 2011.

LEE, Y. J. et al. Interleukin-6 stimulates α -MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of STAT3, PI3K/Akt, MAPKs, and NF- κ B. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 293, n. 4, p. F1036–F1046, out. 2007.

LIU, B.-C. et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 93, n. 3, p. 568–579, mar. 2018.

LIU, M. et al. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 7, p. 1248–1259, 18 jan. 2017.

LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 12, p. 684–696, 18 out. 2011.

LU, T.-C. et al. Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy. **Kidney International**, v. 76, n. 1, p. 63–71, 1 jul. 2009.

MA, Y. et al. Exercise Training Alleviates Cardiac Fibrosis through Increasing Fibroblast Growth Factor 21 and Regulating TGF- β 1-Smad2/3-MMP2/9 Signaling in Mice with Myocardial Infarction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12341, 15 nov. 2021.

MENGZHU, N. et al. Study on the role and mechanism of the Notch/PTEN/AKT signaling pathway in treadmill exercise, reducing renal fibrosis in db/db mice. **Chinese Journal of Pathophysiology**, 2023, 39(5):863-873.DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2023.05.012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 14/03 – Dia Mundial do Rim: Saúde dos Rins Para Todos. [bvsms.saude.gov](https://bvsms.saude.gov.br/14-3-dia-mundial-do-rim-2019-saude-dos-rins-para-todos/), 2019. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/14-3-dia-mundial-do-rim-2019-saude-dos-rins-para-todos/>>. Acesso em: 22 de maio., 2023.

NERBASS, F. B. et al. Censo Brasileiro de Diálise 2021. **Brazilian Journal of Nephrology**, 4 nov. 2022.

NOOR, H.; REID, J.; SLEE, A. Resistance exercise and nutritional interventions for augmenting sarcopenia outcomes in chronic kidney disease: a narrative review. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, 28 set. 2021.

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

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.

PANIZO, S. et al. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 408, 2 jan. 2021.

PETRESKI, T. et al. Review on Inflammation Markers in Chronic Kidney Disease. **Biomedicines**, v. 9, n. 2, p. 182, 11 fev. 2021.

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, 30 dez. 2019.

RICARDO, S. D.; VAN GOOR, H.; EDDY, A. A. Macrophage diversity in renal injury and repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3522–3530, 3 nov. 2008.

ROSENBERG, A. Z.; KOPP, J. B. Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, 12(3), 502–517. 2017.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, fev. 2001.

SHELLER, 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.

SCHUST, J. et al. Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. **Chemistry & Biology**, v. 13, n. 11, p. 1235–1242, nov. 2006.

SHAW, I. et al. Pericytes in the renal vasculature: roles in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 8, p. 521–534, 25 jun. 2018.

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, 1 ago. 2018.

TAKEDA, K. et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 3801–3804, 15 abr. 1997.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. a016295–a016295, 4 set. 2014.

TESTA, M. T. DE J. et al. Resistance Training Attenuates Activation of STAT3 and Muscle Atrophy in Tumor-Bearing Mice. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 1 jul. 2022.

VILLANEGO, F. et al. Impacto del ejercicio físico en pacientes con enfermedad renal crónica: revisión sistemática y metaanálisis. **Nefrología**, abr. 2020.

WALLACH, D. The Tumor Necrosis Factor Family: Family Conventions and Private Idiosyncrasies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 10, p. a028431, 28 ago. 2017.

WANG, B. et al. Hypoxia and chronic kidney disease. **eBioMedicine**, v. 77, 1 mar. 2022.

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

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

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.